FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Sérgio Vítor Pires Barreira

SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS

Preparação, Caracterização Por Espectroscopia Vibracional, Propriedades E Aplicações

Dissertação para Doutoramento em Química
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

PORTO
Janeiro/2004

Sérgio Vítor Pires Barreira

SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

Dissertação para Doutoramento em Química
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



PORTO
Janeiro/2004

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Fernando Sousa da Silva, meu orientador, pelo convite para a participação neste projecto, pelos seus ensinamentos, pelo seu incentivo, apoio e amizade.

Ao Professor Doutor Robert M. Corn pela hospitalidade com que me recebeu no seu laboratório e pela ciência que me deu a conhecer.

Ao Doutor Carlos Pereira, à Doutora Ana Martins e ao Doutor Cosme Moura pela amizade, apoio prestado e disponibilidade para troca de ideias.

Ao Doutor Yufei Cheng pela amizade e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao Vladimir pela amizade e pelas intensas e profícuas discussões científicas.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela concessão de uma bolsa de doutoramento no âmbito do programa PRAXIS XXI, bem como pelas ajudas concedidas para viagens e participações em congressos.

Ao Ricardo, à Ana, ao Tiago, ao Miguel, ao Ricardo Silva, ao Pedro, ao Luís, ao Rodrigo, ao Ricardo "SLB", à Emily, ao Bryce, ao Matt e à Greta, companheiros de laboratório, pela camaradagem.

Por fim e muito especialmente, aos meus Pais, sem o apoio dos quais eu não teria chegado até aqui.

RESUMO

A presente dissertação descreve processos de modificação de superfícies com filmes de espessura molecular utilizando a automontagem com base na formação de ligações covalentes e a montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA). É dado particular ênfase à produção de superfícies com propriedades de reconhecimento molecular para serem utilizadas em sensores e biosensores.

A caracterização das superfícies modificadas por espectroscopia de infravermelho é discutida com detalhe. Mostra-se como, através de cálculos de MSEF e absorvâncias de reflexão, utilizando a teoria electromagnética clássica, é possível determinar as condições experimentais que permitem detectar a presença de quantidades inferiores a uma monocamada de moléculas na superfície usando uma geometria de reflexão externa.

No âmbito da modificação de superfícies através de SAMs foi desenvolvido um processo químico para síntese de superfícies de ouro terminadas com grupos tiol (–SH) a partir da conversão *in-situ* de monocamadas de alcanotióis terminados com grupos ω–NH_2. A reactividade destas superfícies relativamente a maleimidas foi utilizada para imobilizar na superfície moléculas derivatizadas com estes grupos. Através de reacções de permuta tiol-dissulfeto com dissulfetos de dipiridilo foi possível preparar uma superfície activada com grupos sulfeto de piridilo que foi utilizada para imobilizar ADN com uma densidade $\geq 1.5 \times 10^{12}$ moléculas/cm^2 e péptidos com resíduos cisteína.

Através de fotolitografia UV os SAMs de alcanotióis permitem o controlo espacial da química da superfície de ouro. Este facto foi aproveitado, em conjugação com os processos químicos de imobilização acima referidos, para fabricar um *array* de ADN que foi utilizado com sucesso em experiências de hibridização.

A adsorção electrostática da poli-L-arginina sobre superfícies de Au modificadas com alcanotióis com grupos ω ionizáveis foi utilizada com duas finalidades: construção de filmes multicamadas, através de LBLA, que resistem á dessorção mesmo em condições bastante alcalinas e criação de superfícies terminadas com grupos guanidino reactivos. Demonstra-se que os grupos guanidino retêm a capacidade para reagir com α-dicarbonilos formando produtos de adição na superfície. Esta reacção foi aproveitada para produzir uma superfície foto-reactiva que foi utilizada para foto-imobilizar proteínas, nomeadamente anticorpos, ligando-as à superfície sem perda da sua actividade biológica.

Através da caracterização electroquímica de superfícies de ouro modificadas com filmes multicamadas obtidos por LBLA, formados pelo polianião poli(4-estirenossulfonato) e os poliaminoácidos poli-L-histidina, poli-L-lisina e poli-L-arginina, procurou investigar-se a estrutura e propriedades de transporte destes filmes. A discussão dos resultados experimentais foi feita com base em dois modelos para descrever o transporte de massa das espécies electroactivas, para a superfície do eléctrodo, através do PEM. Um dos modelos associa a electroactividade à existência de zonas activas no filme através das quais o transporte é preferencialmente efectuado. O segundo modelo considera o caso do filme ser uniforme comportando-se como uma membrana. São apresentadas impedâncias de difusão correspondentes a estas duas descrições. Conclui-se que, para um número de camadas de polielectrólito inferior a onze, o processo de LBLA dos PEMs acima referidos, quando efectuado sobre eléctrodos de Au previamente modificados com uma monocamada de cisteamina, origina filmes heterogéneos relativamente ao transporte de espécies altamente carregadas através do filme. A diminuição da premeabilidade com o número de camadas, para estes filmes, está associada a uma progressiva redução da área activa do eléctrodo/filme.

ABSTRACT

The present thesis describes the modification of surfaces with films of molecular thickness obtained through self-assembly or layer-by-layer assembly (LBLA). Particular emphasis has been given to the production of molecular recognition surfaces to be used in sensors and biosensors.

Prior to the characterization of the modified surfaces using infrared spectroscopy, MSEF and reflection absorbance calculations were carried out to define the experimental conditions that make the detection of submonolayer amounts on the surface possible, in an external reflection geometry.

A novel surface modification procedure for the creation of sulfhydryl-terminated alkanethiols monolayers on gold surfaces is described. The reactivity of these surfaces towards maleimides was used to attach molecules containing these groups. The sulfhydryl groups on the surface were also able to participate in thiol-disulfide exchange reactions with 2,2'-dipyridyl disulfide creating a pyridyl sulfide terminated surface that was employed to immobilize DNA, with a density $\geq 1.5 \times 10^{12}$ molecules/cm^2, and cysteine-containing polypeptides.

An important application of the DNA surface attachment chemistry described in this thesis is the fabrication of DNA arrays on gold surfaces. It is demonstrated how such an array can be fabricated using a combination of self-assembly, photopatterning and the attachment chemistry proposed.

The electrostatic adsorption of poly-L-arginine onto ionisable alkanethiol modified gold surfaces was utilized with two purposes: construction of multilayer films, through layer-by-layer assembly, which are stable under very high pH and the creation of a guanidino-terminated surface. The availability of the surface guanidino groups for further derivatization with α-dicarbonyl compounds is demonstrated. This reaction yields stable heterocyclic condensation adducts on the surface and was employed to produce a photoreactive surface onto which proteins were photoimmobilized without loss of their biological activity.

Electrochemical measurements were performed at gold electrodes coated with polyelectrolyte multilayers (PEMs) fabricated with poly(4-styrene sulphonate) as the polyanion and the polyamino acids poly-L-histidine, poly-L-lisine and poly-L-arginine aiming to gain insight into the relation between structure of PEMs and permeability.. The discussion of the experimental results was made against two models to describe the mass transport of the electroactive species to the electrode surface across the PEM: one that considers the existence of active sites in the film through which the transport is preferentially made and another in which the film is treated as a homogeneous membrane. Diffusion impedances corresponding to these two descriptions are presented. It is demonstrated that, for a number of layers inferior to eleven, the LBLA process of the films referred above, when performed onto cisteamine modified electrodes, originates inhomogeneous films, with respect to the transport of highly charged species, and that the dependence of the permeability with the number of layers is connected with a progressive reduction in the active area of the film/electrode.

RÉSUMÉ

Dans la présente dissertation, on décrit la modification de surfaces par des films d'épaisseur moléculaire en utilisant l'auto-assemblage ayant pour base la formation de liaisons covalentes, et l'assemblage couche par couche ayant pour base des interactions électrostatiques (LBLA). On a accordé une importance particulière à la production de surfaces avec des propriétés de reconnaissance moléculaire dans le but de les utiliser pour des senseurs et biosenseurs.

La caractérisation des surfaces modifiées par spectroscopie d'infrarouge est discutée avec détail. On montre comment il est possible, par les calculs de MSEF et d'absorbances de réflexion et utilisant la théorie électromagnétique classique, de déterminer les conditions expérimentales qui permettent de détecter la présence de quantités inférieures à une monocouche de molécules sur la surface en employant une géométrie de réflexion externe.

Dans le cadre de la modification de surfaces par SAMs, on présente un nouveau processus chimique pour la synthèse de surfaces d'or terminées par un groupe thiol (-SH) à partir de la conversion *in-situ* de monocouches d'alcanethiols terminés par des groupes ω–NH_2. La réactivité de ces surfaces vis-à-vis des maléimides à été utilisée pour immobiliser des molécules dérivatisées avec ces groupes sur la surface, tandis que par réactions de permutation thiol-dissulfure avec des dissulfure de dipyridyles, on a préparé une surface activée avec des groupes sulfure de pyridyle qui a été utilisée pour immobiliser de l'ADN avec une densité supérieure à 1.5×10^{12} molécules/cm^2 et des peptides avec résidus cystéine.

Par photolitographie UV, les SAMs d'alcanethiols permettent le contrôle spatial de la chimie de la surface de l'or. On a tiré parti de ce fait, en combinaison avec les processus chimiques d'immobilisation cité au-dessus, pour fabriquer un *array* d'ADN qui a été utilisé avec succès dans des expériences d'hybridation.

L'adsorption électrostatique de la poly-L-arginine sur des surfaces d'or modifiées avec des alcanethiols possédant des groupes ω ionisables a été utilisée avec deux finalités : pour la construction de films multicouches, par LBLA, que résistent à la désorption même en conditions assez alcalines, et pour la préparation de surfaces terminées avec des groupes guanidines réactifs. On a montré que dans le cas de cette dernière application, les groupes guanidine retiennent leur capacité de réagir avec des α-dicarbonyles formant des produits d'addition sur la surface. On a profité de cette réaction pour produire une surface photo réactive qui a été utilisée pour photo-immobiliser des protéines, plus précisément des anticorps, en les liant à la surface sans perdre leur activité biologique.

Par caractérisation électrochimique des surfaces d'or modifiées par films multicouches obtenus par LBLA, formés par le polyanion poly(4-styrène sulphonate) et les polyaminoacides poly-L-histidine, poly-L-lisine et poly-L-arginine, on a cherché a examiner la structure et les propriétés de transport de ces filmes. La discussion des résultats expérimentaux s'est basée sur deux modèles pour décrire le transport de masse des espèces électroactives vers la surface de l'électrode à travers le PEM. L'un des modèles a associé l'électroactivité à l'existence de zones actives dans le film à travers desquelles le transport s'effectue préférentiellement, le second modèle considère que le film é uniforme et se comporte comme une membrane. Les impédances de diffusion correspondantes à ces deux descriptions ont été présentées. On a démontré que, pour un nombre de couches de poly-électrolyte inférieur à onze, le processus de LBLA des PEMs cités au-dessus, lorsqu'il est effectué sur des électrodes d'Au modifiées auparavant par une couche de cystéamine, origine des filmes hétérogènes relativement au transport des espèces hautement chargées à travers le fim. La diminution de la perméabilité au fur et à mesure que le nombre de couches augmente est associée, pour ces films, à une réduction progressive de l'aire active de l'électrode/film.

ÍNDICE

Agradecimentos *i*

Resumo *iii*

Abstract *v*

Résumé *vii*

Índice *ix*

Índice de figuras *xiii*

Índice de quadros *xx*

Índice de tabelas *xxi*

Lista de símbolos e abreviaturas *xxiii*

Capítulo

1 **1**

MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES COM FILMES AUTOMONTADOS, UMA INTRODUÇÃO **1**

1.1 Introdução 3

1.2 SAMs: definição, propriedades e aplicações 3

1.3 Filmes multicamadas obtidos por LBLA: definição, propriedades e aplicações 9

1.4 Apresentação e organização da tese 13

1.5 Bibliografia 16

Capítulo

2 **23**

ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO-ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DE SUPERFÍCIES MODIFICADAS QUIMICAMENTE **23**

2.1 Caracterização de superfícies modificadas 25

2.2 Espectroscopia de infravermelho de superfícies: conceitos e perspectiva histórica 26

2.3 Teoria óptica da espectroscopia de reflexão 31
2.3.1 Definições 31
2.3.2 Reflexão-absorção de radiação no infravermelho em superfícies de ouro 35
2.3.2.1 Cálculo da intensidade do campo eléctrico na interface ar/Au 35
2.3.2.2 Cálculos de reflectância para o sistema ar/filme/Au 41
2.3.3 Comparação entre transmissão e reflexão 49
2.3.4 Condições de máxima detectibilidade na experiência de IRRAS 51
2.4 Montagem experimental para FT-IRRAS 52
2.5 PM-FT-IRRAS 64
2.5.1 Teoria da modulação da polarização em FT-IRRAS 67
2.5.2 Montagem experimental para PM-FT-IRRAS 74
2.6 Procedimento experimental 80
I. Reagentes e Material 80
II. Modificação da superfície de Au com os filmes automontados 81
a. SAMs de alcanotióis 81
b. Filmes multicamadas de polielectrólitos 81
2.7 Bibliografia 82

Capítulo

3 **85**

SÍNTESE E APLICAÇÃO DE MONOCAMADAS TERMINADAS COM GRUPOS TIOL NA IMOBILIZAÇÃO DE ADN EM SUPERFÍCIES DE OURO **85**

3.1 Introdução 87
3.1.1 SAMs de alcanotióis: uma plataforma para imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro 87
3.1.2 Imobilização de ADN em superfícies: *microarrays* de ADN 90
3.2 Síntese e reactividade de superfícies terminadas com o grupo –SH 98
3.2.1 Síntese de SAMs terminados com o grupo –SH 98
3.2.2 Reacção com moléculas contendo grupos maleimida 101
3.2.3 Reacção com dissulfetos de dipiridilo. Imobilização de biomoléculas na superfície através de ligações dissulfeto 103
3.3 Fabrico do *microarray* de ADN 108
3.4 Conclusões 112
3.5 Procedimento experimental e instrumentação 113
I. Reagentes e Material 113
II. Química de modificação da superfície 114
a. Síntese da superfície terminada com o grupo –SH 114
b. Reacções da superfície terminada com o grupo tiol 114
III. Caracterização da superfície usando PM-FT-IRRAS 115
IV. Medições de fluorescência 115
V. Fabrico do *array* de ADN 116
VI. Medições de imagiologia de SPR 116
3.6 Bibliografia 118

Capítulo

4 **123**

MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES POR ADSORÇÃO ELECTROSTÁTICA DA POLI-L-ARGININA **123**

4.1 Introdução 125

4.1.1 Montagem com base em interacções electrostáticas: uma abordagem alternativa aos SAMs para funcionalizar superfícies com grupos reactivos 125

4.1.2 Imobilização de proteínas em superfícies 127

4.2 Adsorção electrostática da poli-L-arginina em superfícies de Au modificadas com monocamadas de alcanotióis com grupos ω ionizáveis 138

4.3 Reactividade de superfícies funcionalizadas com poli-L-arginina 143

4.3.1 Montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) 143

4.3.2 Reacção com α-dicarbonilos 147

4.4 Utilização da adsorção electrostástica da poli-L-arginina para imobilização de proteínas em superfícies de ouro 158

4.5 Imunoteste 163

4.6 Conclusões 165

4.7 Procedimento experimental e instrumentação 166
I. Reagentes e Material 166
II . Química de modificação da superfície 167
a. Adsorção electrostática da poli-L-arginina 167
b. Montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) dos filmes de polielectrólitos 167
c. Reacções de superfície 167
III. Caracterização da superfície usando FT-IRRAS 168
IV. Medição dos ângulos de contacto 168
V. Imunoteste 169

4.8 Bibliografia 170

Capítulo

5 **175**

IMPEDÂNCIA ELECTROQUÍMICA E VOLTAMETRIA CÍCLICA DE ELÉCTRODOS MODIFICADOS COM FILMES MULTICAMADAS DE POLIELECTRÓLITOS (PEMS) E SUA RELAÇÃO COM A ESTRUTURA DOS FILMES **175**

5.1 Introdução 177

5.2 Espectroscopia de Impedância Electroquímica 180

5.2.1 Resposta de frequência de um sistema 180

5.2.2 Sistema: célula electroquímica 182

5.2.2.1 Impedância da reacção de eléctrodo 183

5.2.2.2 O circuito de Randles 188

5.3 Caracterização dos filmes obtidos por LBLA usando FT-IRRAS 190

5.4 Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica no eléctrodo modificado com o PEM 194
5.5 Modelos de transporte de massa das espécies electroactivas, para a superfície do eléctrodo, através do PEM 202
5.5.1 O modelo dos *Caminhos Preferenciais* 204
5.5.1.1 Definição 204
5.5.1.2 Impedância de difusão para o modelo dos caminhos preferenciais 207
5.5.2 O modelo *Membrana* 211
5.5.2.1 Definição 211
5.5.2.2 Impedância de difusão para o modelo membrana 212
5.5.3 Análise da impedância de eléctrodos de Au modificados com PEMs 216
5.5.3.1 Análise usando o modelo dos caminhos preferenciais 217
5.5.3.2 Análise usando o modelo membrana 226
5.5.3.3 Comparação dos dois modelos 226
5.6 Conclusões 229
5.7 Procedimento experimental e instrumentação 230
I. Reagentes e Material 230
II. Modificação das superfícies com os filmes automontados 230
III. Caracterização da superfície usando FT-IRRAS 231
IV. Medições electroquímicas 231
5.8 Bibliografia 233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Um SAM pode ser formado pela imersão de um substrato numa solução de um surfactante apropriado. O tempo de imersão é normalmente de várias horas. 4

Figura 1.2: Reacções de superfície já observadas para SAMs de ω-hidroxialcanotiolatos da ref.4). 7

Figura 1.3: Diagrama de um biosensor piezoeléctrico que utiliza um SAM. (da ref. 44). O sensor é composto por um cantilever (Si_3N_4), eléctrodos, um filme de um material piezoléctrico (PZT) e uma superfície para reconhecimento molecular. Esta última foi construída a partir de um SAM misto em que uma das espécies está funcionalizada com um grupo capaz de interactuar com a molécula alvo. Quando tal interacção ocorre, o SAM sofre alteracções conformacionais impondo uma força de deformação sobre o cantilever, esta força, em combinação com a massa adicional da biomolécula que se liga, causam uma variação na frequência de oscilação do elemento piezoléctrico que é convertida numa diferença de potencial. 9

Figura 1.4: Representação esquemática do processo de deposição camada-a-camada (LBLA) de um filme com a arquitectura mais simples: $(A/B)_n$. A preparação começa com a imersão de um substracto carregado (por exemplo negativamente) (1), numa solução aquosa de um policatião o que causa a deposição de uma camada deste composto na superfície e a inversão da carga da superfície (2). A imersão subsequente do substracto numa solução da espécie polianiónica conduz à deposição de uma camada deste composto e a uma nova inversão da carga, (3). A repetição destas imersões várias vezes permite construir um filme multicamadas, (4). O tempo de adsorção por camada é normalmente de alguns minutos no caso de polielectrólitos mas pode chegar a várias horas para partículas coloidais. 10

Figura 1.5: Dois exemplos de aplicação dos filmes obtidos por LBLA: processamento de polímeros condutores para fabrico de díodos emissores de luz e fabrico de micro-cápsulas. 13

Figura 2.1: Fotografia de um dos slides de Au (18×18 mm) utilizados como substracto na maior parte das experiências apresentadas nesta dissertação. 28

Figura 2.2: Reflexão na interface ar/condutor. 33

Figura 2.3: Variações de fase, δ, provocadas pela reflexão numa superfície de Au para um feixe de luz monocromático ($\lambda = 5.6\,\mu m$) em função do ângulo de incidência e da polarização da luz. As figuras inseridas ilustram a orientação do vector campo eléctrico para variações de fase de 180° e 90°. 36

Figura 2.4: Reflectância da interface ar/Au a 5.6 μm em função do ângulo de incidência e da polarização da luz. 37

Figura 2.5: MSEFs da onda estacionária na interface ar/Au em função da distância à superfície, z, calculadas para luz monocromática, $\lambda = 5.6\,\mu m$ e para um ângulo de incidência, $\phi = 45°$. 38

Figura 2.6: MSEFs da onda estacionária na superfície do Au em função do ângulo de incidência. 39

Figura 2.7: MSEFs da onda estacionária na interface ar/Au em função da distância à superfície calculadas para luz monocromática no UV-Vis, $\lambda = 0.354\,\mu m$, para um ângulo de incidência, $\phi = 45°$. 40

Figura 2.8: MSEFs da onda estacionária na superfície do Au ($z = 0$) para luz na região do UV-Vis em função do ângulo de incidência. 41

Figura 2.9: Modelo de três fases usado nos cálculos de reflectância no caso de uma superfície de Au coberta por um filme. 42

Figura 2.10: Absorvância de reflexão teórica em função do ângulo de incidência e da polarização da luz para várias espessuras dum filme numa superfície de Au. $\lambda = 5.6\,\mu m$, $n_2 = 1.3$, $k_2 = 0.1$, (d/λ): 0.00001 (curva A), 0.0002 (curva B) e 0.0004 (curva C). 43

Figura 2.11: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme ($d/\lambda = 0.0001$) sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do número de onda. As constantes ópticas do filme são $n_2 = 1.3$ e $k_2 = 0.1$. Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*. 45

Figura 2.12: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do índice de refracção do filme ($\lambda = 5.6\,\mu m, d/\lambda = 0.0001, k_2 = 0.1$). Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*. 47

Figura 2.13: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do coeficiente de extinção do filme ($\lambda = 5.6\,\mu m, d/\lambda = 0.0001, n_2 = 1.3$). Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*. 48

Figura 2.14: Razão entre as absorvâncias de reflexão e transmissão teóricas em função do ângulo de incidência ($\lambda = 5.6\,\mu m$, $n_2 = 1.3$, $k_2 = 0.1$, $(d/\lambda) = 0.0002$). 50

Figura 2.15: Representação esquemática do sistema óptico construído para as medições de FT-IRRAS. 53

Figura 2.16: Fotografias do sistema óptico instalado para as medições de FT-IRRAS. 54

Figura 2.17: (A) Desenho do suporte para as amostras visto de frente. (B): Desenho do suporte para as amostras visto de trás e do tubo de Teflon utilizado para fixar a amostra. 55

Figura 2.18: Sistema CDA utilizado no tratamento do ar do trajecto óptico. 56

Figura 2.19: Espectros de FT-IRRAS de uma superfície de Au modificada com um SAM de MUA. 57

Figura 2.20: Possíveis estruturas formadas pelas moléculas do SAM de MUA devido ao estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos carboxilo. 58

Figura 2.21: Modos normais de vibração do grupo carboxilato (ref. 2). 59

Figura 2.22: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada dos filme pSS/pAH sobre uma superfície de Au modificada com um SAM de cisteamina. Os espectros dos filmes em que a camada de pSS é a camada terminal estão representados por linhas a ponteado. O espectro correspondente à superfície coberta por cisteamina está representado a tracejado. 61

Figura 2.23: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas do filme misto Au|MPSA/pHis/pSS/pLis/pGlu/pArg/pTir/pArg/pGlu/pLis/pSS/pHis sobre uma monocamada de MPSA. 65

Figura 2.24: Representação esquemática do funcionamento do modulador fotoelástico. 68

Figura 2.25: Intensidade teórica detectada para um feixe de luz monocromática incidindo numa superfície com $R_{\parallel} = 0.6$ e $R_{\perp} = 0.9$, para diferentes valores de ϕ_0. 70

Figura 2.26: Espectros de reflectância diferencial teóricos para uma superfície com uma diferença de reflectância, independente do comprimento de onda, igual a 5%. A linha contínua corresponde ao espectro obtido quando se utiliza o sistema de desmodulação proposto por Corn, a linha a ponteado quando se utiliza somente o 2º harmónico. Considerou-se $\phi_0 = \pi$ para $\lambda = 5.4\,\mu m$. 73

Figura 2.27: Representação esquemática do sistema óptico utilizado nas medições de PM-FT-IRRAS. 75

Figura 2.28: Fotografias do sistema utilizado nas medições PM-FT-IRRAS. 76

Figura 2.29: Espectro de reflectância diferencial para um SAM de MUA numa superfície de Au. 77

Figura 2.30: A) Ampliação do espectro da figura 2.25 entre 1000 e 2000 cm^{-1}, onde se mostra a linha de base a tracejado. B) Região 1000-2000 cm^{-1} após normalização (página seguinte). 78

Figura 3.1: Reactividade do grupo –SH. a) Arilação; alquilação, formação de ligações tioéter: b) reacção com α-haloacetatos, c) reacção com maleimidas (adição a ligações duplas activadas), d) reacção com aziridinas, e) reacção com derivados acriloil (adição a ligações duplas activadas); f) permuta tiol-dissulfeto; h) reacção com metais; i) oxidação; j) acilação. 90

Figura 3.2: O termo *array* refere-se ao arranjo sistemático de sequências na superfície. "Microspots" das chamadas moléculas "captura" são imobilizados em linhas e colunas num suporte sólido e expostas a amostras contendo as moléculas "alvo". Para se identificar uma molécula alvo faz-se uso de regras de reconhecimento molecular. No caso do ADN cada molécula tem a capacidade de reconhecer sequências complementares através do emparelhamento das bases. A observação da área da superfície a que molécula alvo se liga permite saber automaticamente qual a sua sequência de bases. 91

Figura 3.3: Representação esquemática da modificação da monocamada de MUAM. (A) reacção de tiolação com a molécula de SATP; (B) deacetilação com hidroxilamina obtendo-se uma superfície terminada com o grupo –SH; (C) A reacção da superfície com moléculas derivatizadas com grupos maleimida resulta na formação de ligações tioéter entre as moléculas e a superfície. 99

Figura 3.4: Espectros de PM-FT-IRRAS mostrando a modificação da monocamada de MUAM: (A) MUAM; (B) após reacção com a molécula de SATP; (C) superfície terminada com grupos –SH obtida após deacetilação; (D) após reacção da superfície de tiol com *N*-etil maleimida. 100

Figura 3.5: Espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes aos passos de "desprotecção" (A), e á reacção da superfície –SH com moléculas derivatizadas com grupos maleimida: *N*-etil maleimida (B) e corante azobenzeno (C). 102

Figura 3.6: Representação esquemática das reacções de permuta tiol-dissulfeto: (A) reacção de permuta que conduz à superfície activada com grupos piridil dissulfeto; (B) reacções de permuta entre a superfície terminada com grupos piridil dissulfeto e moléculas com grupos tiol (R–SH) em solução. Quando a superfície é exposta a DTT a ligação dissulfeto é quebrada, a molécula imobilizada é libertada e a superfície –SH é regenerada (C). 104

Figura 3.7: Espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes às reacções de permuta tiol-dissulfeto utilizadas para imobilizar péptidos e ADN: (A) superfície piridil sulfeto; (B) após reacção com o éster de cisteína; (C) após reacção com a glutationa; (D) após reacção com 5'-tiol ADN. A superfície de referência foi a terminada com o –SH. 105

Figura 3.8: Espectros de PM-FT-IRRAS que evidenciam a libertação das moléculas de glutationa e ADN da superfíce por exposição das superfícies a DTT. Os espectros de referência neste caso foram os das superfícies obtidas após imobilização da glutationa do ADN–SH. 107

Figura 3.9: Fabrico do *microarray* de ADN em superfícies de Au usando *patterning* hidrofóbico/hidrofílico. 109

Figura 3.10: Padrão do *microarray* usado nas experiências de hibridização. 110

Figura 3.11: Imagens e perfis de imagiologia de SPR das experiências de hibridização efectuadas com o *microarray* fabricado. A imagem 3.11A obtida após exposição à sequência 1'. Após desnaturação e lavagem a sequência 2' foi introduzida na célula de SPR obtendo-se a imagem 3.11B. 111

Figura 4.1: O aminoácido arginina. A geometria do grupo guanidino é planar devido à ressonância. 127

Figura 4.2: A fotólise dum fenil azeto com luz UV origina um nitreno extremamente reactivo. Os nitrenos podem reagir de diversas formas incluindo a inserção em ligações C–H ou N–H, a adição a ligações duplas ou triplas ou sofrer uma expansão do anel com a formação de uma dehidroazepina, que por sua vez é extremamente reactiva relativamente a nucleófilos, especialmente aminas (referências 60 a 63). 129

Figura 4.3: Espectros de FT-IRRAS da adsorção electrostática da poli-L-arginina sobre uma monocamada de um alcanotiol tendo como grupo ω um grupo carboxilo (MUA) (linha a ponteado), como representado esquematicamente na figura 4.4. A linha a tracejado mostra o espectro da superfície MUA/pArg após imersão numa solução pH 3 durante 2 hrs. A figura inserida mostra a absorvância da banda a 1679 cm^{-1} em função do pH da solução de deposição. 139

Figura 4.4: Representação esquemática da adsorção electrostática (ESA) da poli-L-arginina sobre uma monocamada de MUA. 140

Figura 4.5: Quando um líquido não molha completamente uma superfície forma-se o chamado ângulo de contacto (θ). Se não há interacção entre a superfície e o líquido o ângulo de contacto é de 180°. À medida que a interacção aumenta o líquido espalha-se até que θ = 0°. 141

Figura 4.6: Possíveis conformações adoptadas pela pArg quando adsorvida num estado de ionização quase total (A) ou parcial (B) 142

Figura 4.7: Espectros de FT-IRRAS da montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) do filme pArg/pGlu numa monocamada de MUA (as linhas a ponteado correspondem às camadas de pArg). A figura

inserida mostra a evolução, com o número de camadas depositadas, da absorvância das bandas amida I (1663 cm^{-1}), amida II (1553 cm^{-1}) e *stretching* dos carboxilatos (1400 cm^{-1}). 144

Figura 4.8: Espectros de FT-IRRAS do processo de LBLA, a partir de soluções pH 12, do filme pArg/pTir. A figura inserida mostra a evolução da intensidade das bandas amida I (1672 cm^{-1}), amida II (1540 cm^{-1}) e da banda a 1260 cm^{-1}, com o número de camadas depositadas. 146

Figura 4.9: Esquema reaccional para a formação dos aductos de condensação heterocíclicos (dihidoxiimidazolidinas) entre os grupos guanidino das moléculas de pArg adsorvidas electrostaticamente e os várias moléculas contendo grupos α-dicarbonilo: A – glioxal, B – fenilglioxal, C – *p*-azidofenil glioxal . A possibilidade da estabilização pelo borato é tida em conta. 148

Figura 4.10: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à reacção dos α-dicarbonilos com os grupos guanidino na superfície (linhas contínuas). A – glioxal, B – fenilglioxal, C – APG. Os asteriscos (*) assinalam as variações no espectro causadas pelo deslocamento do equílibrio de ionização do MUA no sentido $COO^- \rightarrow COOH$ devido à ocorrência das reacções de superfície. 149

Figura 4.11: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à reacção do APG com superfícies terminadas com pArg adsorvida a partir de soluções com diferentes pHs. 152

Figura 4.12: Espectros de FT-IRRAS resultantes da montagem electrostática duma camada de pSS (linhas contínuas) sobre a estrutura MUA/pArg (A), ou MPSA/pArg (B). O espectro C foi obtido após reacção do APG com a camada de pArg adsorvida sobre um SAM de MPSA. 154

Figura 4.13: Espectros FT-IRRAS da montagem camada-a-camada do filme pSS/pArg (as linhas a ponteado correspondem às camadas de pArg) numa monocamada de MUA. Os asteriscos assinalam as bandas com contribuição do grupo carboxilo do MUA. 155

Figura 4.14: Evolução, camada-a-camada, da intensidade das bandas a ~1676 cm^{-1} (A), ~1542 cm^{-1} (B) e ~1411 cm^{-1} (C) para filmes pSS/pArg construídos sobre monocamadas de MUA (quadrados) ou MPSA (círculos). 156

Figura 4.15: Esquema da ligação fotoquímica de proteínas a superfícies. Alguns grupos guanidino da pArg adsorvida electrostaticamente, reagem com o grupo α-dicarbonilo da molécula de APG resultando desta reacção uma superfície terminada por um grupo fotoreactivo arilazeto (A). Fotólise subsequente com luz UV, na presença da proteína alvo, conduz á sua imobilização na superfície por formação de ligações covalentes. 159

Figura 4.16: Espectros de FT-IRRAS da imobilização fotoquímica da poli-L-lisina, mostrando o desaparecimento das bandas do azeto durante a fotólise. A imobilização da poli-L-lisina é evidenciada pelo aumento das bandas amida. 160

Figura 4.17: Espectros de FT-IRRAS obtidos após foto-imobilização das proteínas poli-L-lisina (pLis) (baixo), glucose oxidase (GOx) (centro) HIgG (cima) e Gly-Gly-His (GGH) figura inserida. A superfície de referência foi a terminada com o APG. 161

Figura 4.18: Imagens e perfis de intensidade de fluorescência do imunoteste: A - superfície terminada pela HIgG sondada com anti-HIgG marcado com FTIC. B - experiência controlo onde se demonstra a insignificância da adsorção não específica. A mancha escura corresponde à solução contendo o secundário específico como na imagem A. Uma gota de uma solução contendo um

secundário não específico (anti-coelho IgG) marcada com FTIC) foi colocada na metade inferior do slide. 164

Figura 5.1: Modelo entrada/saída utilizado para estudar a dinâmica dos sistemas. 180

Figura 5.2: Diagramas de Nyquist para a impedância de Warburg entre 15 kHz e 0.1 Hz: área = 5 mm^2; A- $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 1$ mol m^{-3}; B- $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 2$ mol m^{-3}; C- $D_R = D_O = 3\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 1$ mol m^{-3}. 187

Figura 5.3: Circuito de Randles. R_Ω representa a resistência da solução, C_{dl} representa a capacidade da dupla camada eléctrica, R_{CT} representa a resistência de transferência de carga e Z_W a impedância de Warburg. 188

Figura 5.4: Diagramas de Nyquist para a circuito de Randles entre 15 kHz e 0.1 Hz. A- $R_\Omega = 200\ \Omega$, $C_{dl} = 1\ \mu F$, $R_{CT} = 100\ \Omega$, $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2s^{-1}; B- $R_{CT} = 1000\ \Omega$; C- $R_{CT} = 5000\ \Omega$. 189

Figura 5.5A: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada do filme pSS/pHis sobre uma superfície de Au modificada com uma monocamada automontada de cisteamina. Os espectros dos filmes em que a camada de pSS é a camada terminal estão representados a ponteado. O espectro correspondente à superfície de cisteamina está representado a tracejado. 191

Figura 5.5B: O mesmo que a figura 5.5A para o filme pSS/pLis. 191

Figura 5.5C: O mesmo que a figura 5.5A para o filme pSS/pArg. 192

Figura 5.6: Evolução, camada-a-camada, da intensidade das bandas amida I, amida II e *stretching* assimétrico do grupo benzenosulfonato, para filmes pSS/policatião construídos sobre Au modificado com cisteamina. 193

Figura 5.7A: Diagramas de Nyquist correspondentes à reacção de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5 mM) no eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pHis. O número de camadas depositadas sobre a monocamada automontada de cisteamina está assinalado pelos números. Os resultados experimentais estão representados pelos círculos e as curvas teóricas (modelo dos caminhos preferenciais) (secção 5.5) pelas linhas. 195

Figura 5.7B: O mesmo que a figura 5.7A neste caso para um eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pLis. 196

Figura 5.7C: O mesmo que a figura 5.7A neste caso para um eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pArg. 197

Figura 5.8A: Voltamogramas cíclicos correspondentes à reacção de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5 mM) no eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pHis. Velocidade de varrimento 50 mVs^{-1}. Os voltamogramas correspondentes aos filmes terminados com camadas de pSS estão representados por linhas a tracejado. *N* representa o número de camadas depositadas sobre a monocamada automontada de cisteamina. 199

Figura 5.8B: O mesmo que na figura 5.8A para o PEM de pSS/pLis. 200

Figura 5.8C: O mesmo que na figura 5.8A para o PEM de pSS/pArg. 201

Figura 5.9: Configuração das áreas activas e do perfil de difusão misto a elas associado, para um filme com poucas camadas de acordo com o modelo dos caminhos preferenciais. O significado dos símbolos é dado no texto. 204

Figura 5.10: Configuração das áreas activas para um filme com muitas camadas e do perfil de difusão do tipo esférico a elas associado, de acordo com o modelo dos caminhos preferenciais. 206

Figura 5.11: Representação dum *array* ideal de microeléctrodos e da evolução dos perfis de difusão com a frequência. 207

Figura 5.12: Curvas simuladas para a impedância de difusão dum *array* ideal de microeléctrodos (eq. 5.34) no intervalo 15 kHz - 0.1 Hz: $A = 5\,\mathrm{mm}^2$, $C_k^0 = 1\,\mathrm{mol\,m}^{-3}$, $K_k = 1$, $D_k^{(sol)} = 6\times10^{-10}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$; A- $\theta = 0.98$, $r_a = 3\,\mu m$; B- $\theta = 0.98$, $r_a = 1\,\mu\mathrm{m}$; C- $\theta = 0.90$, $r_a = 3\,\mu\mathrm{m}$; D- $\theta = 0.60$, $r_a = 9.48\,\mu\mathrm{m}$. 210

Figura 5.13: Representação do filme visto como uma membrana. L representa a espessura do filme. 212

Figura 5.14: Curvas simuladas para a impedância de difusão do modelo de membrana (eq. 5.55) no intervalo 15 kHz - 0.1 Hz: $A = 5\,\mathrm{mm}^2$, $C_k^0 = 1\,\mathrm{mol\,m}^{-3}$, $D_k^{(sol)} = 6\times10^{-10}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$; A- $D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 50\,\mathrm{nm}$; B- $D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$, $K_k^{(filme)} = 2.0$, $L = 50\,\mathrm{nm}$; C- $D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 10\,\mathrm{nm}$; D- $D_k^{(filme)} = 5\times10^{-13}\,\mathrm{m}^2 s^{-1}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 50\,\mathrm{nm}$. 215

Figura 5.15: Circuito equivalente para um eléctrodo modificado com um PEM. C_F representa a capacidade do filme, R_F representa a resistência do filme, $R_{CT}^{(ap)}$ (eq.5.40 ou 5.56) representa a resistência de transferência de carga aparente, R_m representa a resistência associada ao mecanismo de condução óhmica e Z_d representa a impedância de difusão (eq. 5.34 ou 5.55). Os restantes elementos têm o significado dado na figura 5.3. 216

Figura 5.16: Diagramas de Nyquist para as impedâncias de difusão correspondentes à figura 5.7A. 224

Figura 5.17: Ajustes teóricos (linhas contínuas) obtidos, usando o circuito equivalente representado na fig. 5.15, e a impedância de difusão do modelo de membrana, eq. 5.55, para filmes de pSS/pHis com diferente número de camadas (N). N = 3: C_F = 1.00 μF, C_{dl} = 1.20 μF, R_F = 3.1 kΩ, R_m= inf., $D^{(filme)} = 9.1\times10^{-12}\,\mathrm{m}^2\mathrm{s}^{-1}$, $K^{(filme)}$ = 0.4, L = 8 nm; N = 7: C_F = 0.39 μF, C_{dl} = 6.20 μF, R_F = 78.0 kΩ, R_m= 360 kΩ, $D^{(filme)} = 5.3\times10^{-13}\,\mathrm{m}^2\mathrm{s}^{-1}$, $K^{(filme)}$ = 0.020, L = 22 nm; N = 10: C_F = 0.41 μF, C_{dl} = 1.70 μF, R_F = 270 kΩ, R_m= inf., $D^{(filme)} = 2.5\times10^{-14}\,\mathrm{m}^2\mathrm{s}^{-1}$, $K^{(filme)}$ = 0.039, L = 31 nm. Para comparação também foram representadas as curvas obtidas usando o modelo dos caminhos preferenciais (linha a ponteado). 227

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1: Principais sistemas que originam SAMs. 5

Quadro 2.1: Blocos construtores utilizados na modificação de superfícies de Au nas experiências correspondentes aos espectros apresentados nas figuras 2.19, 2.22 e 2.23. 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a monocamada de MUA adsorvida quimicamente sobre uma superfície de Au. 59

Tabela 2.2: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para o filme multicamadas construído com o pSS como polianião e pAH como policatião. 62

Tabela 3.1: Processos químicos para imobilização de ADN em superfícies. 93

Tabela 3.2: Atribuição de bandas de PM-FT-IRRAS correspondentes à tiolação da monocamada de MUAM com SATP. 101

Tabela 3.3: Atribuição de bandas de PM-FT-IRRAS correspondentes às reacções de superfície das moléculas derivatizadas com grupos maleimida. 103

Tabela 3.4: Atribuição das bandas dos espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes à imobilização do ADN e glutationa através de reacções de permuta tiol-dissulfeto com a superfície activada com grupos piridil dissulfeto. 106

Tabela 4.1: Processos químicos para imobilização de proteínas em superfícies. 130

Tabela 4.2: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a camada de poli-L-arginina adsorvida sobre a monocamada de MUA. 141

Tabela 4.3: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para as superfícies modificadas com os filmes multicamadas constituídos com a poli-L-arginina e os polianiões poli-L-(ácido glutâmico) (pGlu) e poli-L-tirosina (pTir). 145

Tabela 4.4: Evolução dos ângulos de contacto com a modificação da superfície desde a monocamada de MUA até à modificação da camada de pArg com os α-dicarbonilos. 151

Tabela 4.5: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a superfície activada com o APG. 151

Tabela 4.6: Ângulos de contacto após a imobilização das proteínas. 161

Tabela 5.1: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para os filmes pSS/pHis e pSS/pLis obtidos por montagem camada-a-camada sobre uma superfície de Au modificada com uma monocamada de cisteamina. 192

Tabela 5.2A: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais obtidos através do ajuste das impedâncias experimentais medidas para os filmes pSS/pHis, usando o circuito equivalente representado na figura 5.15 e a impedância de difusão dada pela equação 5.34. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7A pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0045; N = 8, D_R = 0.0013; N = 9, D_R = 0.0016; N = 10, D_R = 0.0005. 218

Tabela 5.2B: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais para os filmes pSS/pLis. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7B pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0037; N = 8, D_R = 0.39; N = 9, D_R = 0.0046; N = 10, D_R = 0.0025. 218

Tabela 5.2C: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais para os filmes pSS/pArg. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7C pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0037; N = 8, D_R = 0.0024; N = 9, D_R = 0.0019; N = 10, D_R = 0.0011. 219

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	área do eléctrodo
A_R	absorvância de reflexão, $A_R = -\log[R(d)/R(0)]$
A_T	absorvância de transmissão, $A_T = -\log T$
C_O, C_R	concentração das espécies oxidante e redutor no interior da solução
$C_O(0), C_R(0)$	valor estacionário da concentração interfacial de oxidante e redutor
C_k^0	concentração da espécie k no interior da solução
C_{dl}	capacidade da dupla camada eléctrica
C_F	capacidade do filme
d	espessura do filme na superfície de Au
D_R, D_O	coeficientes de difusão do oxidante e redutor na solução
D_R	factor que multiplica os coeficientes de difusão e que traduz a difusão no filme, para filmes espessos, no modelo dos caminhos preferenciais
$D_k^{(sol)}$	coeficiente de difusão da espécie k no interior da solução
$D_k^{(filme)}$	coeficiente de difusão da espécie k no interior do filme
E	potencial
$\mathbf{E}$	vector campo eléctrico
$\mathbf{E}^0$	amplitude do vector campo eléctrico
$\mathbf{E}^\alpha$	vector campo eléctrico com polarização α
$\mathbf{E}_D$	vector campo eléctrico que chega ao detector
$\mathbf{E}_m$	vector campo eléctrico após passagem pelo modulador fotoelástico

$\mathbf{E}_j^+$, $\mathbf{E}_j^-$	vector campo eléctrico que se propaga na fase *j*
E_j^{0+}, E_j^{0-}	amplitudes das ondas que se propagam na fase *j*
E_j	amplitude da onda resultante na fase *j*
$\langle E_j^2 \rangle$	média quadrada da parte real do campo eléctrico (MSEF) na fase *j*
F	constante de Faraday (96485 $Cmol^{-1}$)
i	unidade imaginária, $i = \sqrt{-1}$
I	intensidade de corrente
I	intensidade de luz
I^0	intensidade de corrente de permuta
I_0	intensidade de luz à saída da fonte
I_D	intensidade de luz detectada
$I(\delta)$	interferograma (δ representa a retardação do interferómetro)
$I(\bar{\nu})$	espectro
J_n	funções de Bessel de ordem inteira
k_0	constante de velocidade padrão
k_a^0	constante de velocidade para a reacção anódica
K_a	constante de acidez
k_c^0	constante de velocidade para a reacção catódica
k_j	coeficiente de extinção da fase *j*
K_k	coeficiente de partição para a espécie *k* (modelo dos caminhos preferenciais)
$K_k^{(filme)}$	coeficiente de partição para a espécie *k* (modelo membrana)
L	espessura do filme (modelo de membrana)
n	número de electrões transferidos
n_j	índice de refracção da fase *j*
$\hat{n}_j$	índice de refracção quando a fase *j* é absorvente
N	número de camadas de um PEM
pH	$= -\log_{10} a(H_3O^+)$
pK_a	$= -\log_{10}(K_a)$

r	coeficiente de Fresnel de reflexão
R	constante dos gases perfeitos (8.314 $JK^{-1}mol^{-1}$)
R	reflectância
r_{jk}	coeficiente de Fresnel de reflexão para a interface entre as fases j e k
R_{jk}	reflectância da interface entre as fases j e k
$R(0)$	reflectância para o sistema ar/substracto
$R(d)$	reflectância para o sistema ar/filme (de espessura d)/substracto
r_{123}	coeficiente de Fresnel de reflexão para um sistema de três fases
R_{123}	reflectância para um sistema de três fases
r_a	raio de zona activa (modelo dos caminhos preferenciais)
r_b	raio de zona inactiva que rodeia cada zona activa (modelo dos caminhos preferenciais)
R_{CT}	resistência de transferência de carga
$R_{CT}^{(ap)}$	resistência de transferência de carga aparente
R_F	resistência do filme
R_m	resistência associada ao mecanismo de condução óhmica
R_Ω	resistência não compensada da solução
t	tempo
t_{jk}	coeficiente de Fresnel de transmissão para a interface entre as fases j e k
$t_{E\perp}$	coeficiente de Fresnel de transmissão, para radiação s, para um sistema de três fases
$t_{H\parallel}$	coeficiente de Fresnel de transmissão, para radiação p, para um sistema de três fases
T_{123}	transmitância de um sistema de três fases
Z	impedância, $Z = Z'+iZ''$
Z_d	impedância de difusão
Z_W	impedância de Warburg
α	coeficiente de transferência de carga
β	$= 2\pi\hat{n}_2 d\cos\phi_2 / \lambda$

δ	espessura da camada de difusão
δ_{jk}	variação de fase causada pela reflexão na interface entre as fases j e k
$\Delta R / R$	variação normalizada de reflectância, $\Delta R / R = \left[R(d) - R(0)\right] / R(0)$
$\Delta R / R$	espectro de reflectância diferencial, $\Delta R / R = (R_{\parallel} - R_{\perp}) / (R_{\parallel} + R_{\perp})$
ε_j	constante dieléctrica da fase j
$\hat{\varepsilon}_j$	constante dieléctrica quando a fase j é absorvente
θ	ângulo de contacto
θ	grau de cobertura (modelo dos caminhos preferenciais)
λ	comprimento de onda
μ_j	permeabilidade magnética da fase j
ξ_j	$= \hat{n}_j \cos\phi_j$
ν	frequência óptica
$\overline{\nu}$	número de onda
σ	coeficiente de Warburg, $\sigma = \sigma_O + \sigma_R$
$\sigma_k^{(p)}$	coeficiente de Warburg para a espécie k no modelo dos caminhos preferenciais
$\sigma_k^{(m)}$	coeficiente de Warburg para a espécie k no modelo de membrana
ϕ	diferença de fase entre as componentes do campo eléctrico orientadas segundo os eixos do modulador fotoelástico, após passagem pelo modulador fotoelástico
ϕ_0	diferença de fase máxima (modulador fotoelástico)
ϕ_j	ângulo de incidência na fase j
ω	frequência angular, $\omega = 2\pi\nu$ ou $\omega = 2\pi f$
ω_m	frequência angular fundamental de vibração do modulador fotoelástico

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
A/D	analógico/digital
AFM	microscopia de força atómica

APG	*p*-azidofenil glioxal
C	citosina
CV	voltametria cíclica ou voltamograma cíclico
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DTT	reagente de Cleland
EDTA	ácido etilenediaminotetracético
EFL	distância focal efectiva
EIS	espectroscopia de impedância electroquímica
ESA	automontagem com base em interacções electrostáticas
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FT-IR	infravermelho com transformada de Fourier
FT-IRRAS	espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier
G	guanina
GGH	Gly-Gly-His, glicina-glicina-histidina
GOx	glucose oxidase
HIgG	imunoglobulina G humana
Im	parte imaginária de um número complexo
IRRAS	espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção
LBLA	montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas
MCT	HgCdTe
MM	massa molar
MPSA	3-mercaptopropanossulfonato de sódio
MSEF	*mean square electric field*
MUA	ácido 11-mercaptoundecanóico
MUAM	11-mercaptoundecilamina
NHS	*N*-hidroxissuccinimido
ODT	1-octadecanotiol
pAH	polialilamina
pArg	poli-L-arginina
PBS	tampão fosfato salino
PCR	*polymerase chain reaction*
PEG	polietilenoglicol

PEM	filme multicamadas de polielectrólitos
PEM	modulador fotoelástico
pGlu	poli(ácido-L-glutâmico)
pHis	poli-L-histidina
pLis	poli-L-lisina
pSS	poli(4-estirenossulfonato)
pTir	poli-L-tirosina
PM-FT-IR	infravermelho com transformada de Fourier e modulação da polarização
PM-FT-IRRAS	espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier e modulação da polarização
Re	parte real de um número complexo
REFL	distância focal de reflexão efectiva
SA	automontagem com base na formação de ligações covalentes
SAM	monocamada automontada
SATP	*N*-succinimidil *S*-acetiltiopropionato
SDS	dodecilsulfato de sódio
SPR	*Surface Plasmon Resonance*
S/R	razão sinal-ruído
SSPE	tampão fosfato de sódio-EDTA salino
T	timina
TEA	trietanolamina
u.a.	unidades arbitrárias
UV-Vis	ultravioleta-visível
VDW	van der Waals

Nota do autor:

No domínio da química das superfícies modificadas existem muitos termos, designações, conceitos e expressões em língua inglesa, cuja tradução em língua portuguesa ainda não existe nem é fácil. Embora consciente das críticas que possam surgir pela utilização dos termos em língua inglesa, optei por mantê-los para não cometer erros de má tradução.

SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

Capítulo 1

Modificação de Superfícies com Filmes Automontados, uma Introdução

1.1 Introdução

1.2 SAMs: definição, propriedades e aplicações

1.3 Filmes multicamadas obtidos por LBLA: definição, propriedades e aplicações

1.4 Apresentação e organização da tese

1.5 Bibliografia

1.1 Introdução

A descoberta do processo de automontagem baseado na adsorção química (*self-assembly*, SA) por Nuzzo e Allara em 1983[1] e mais recentemente (1991) da montagem camada-a-camada devido a interacções electrostáticas (*layer-by-layer assembly* (LBLA) ou *electrostatic self-assembly* (ESA)), por Decher *et al.*,[2] constituíram marcos decisivos para o desenvolvimento de nanoestruturas funcionais e para a integração em estruturas inorgânicas sólidas de interfaces biológicas activas. Estas duas tecnologias permitem a deposição de camadas unimoleculares em suportes sólidos com um controle do arranjo molecular pelo menos na direcção normal à superfície, satisfazendo desta forma um dos pré-requesitos de qualquer mecanismo macroscópico funcional: uma relação fixa entre a ordem nanoscópica e a orientação macroscópica. Para ser possível explorar completamente as propriedades moleculares em mecanismos macroscópicos é necessário conhecer-se a localização e/ou orientação de todas as moléculas, não só umas em relação às outras mas também em relação a uma coordenada macroscópica.[3]

As duas tecnologias são em certa medida complementares. A descoberta do LBLA aumentou consideravelmente o número de materiais susceptíveis de serem processados em filmes multicamadas mas, por outro lado, o SA origina filmes com um maior grau de organização.

Desde a sua descoberta, a utilização destas duas tecnologias não tem abrandado e estendeu-se aos vários domínios da ciência e tecnologia desde a Química, Física e Biologia, à Ciência dos Materiais e Microelectrónica.

1.2 SAMs: definição, propriedades e aplicações

O processo de automontagem com base na formação de ligações covalentes é representado esquematicamente na figura 1.1.

Quando determinados substractos são postos em contacto com um surfactante apropriado forma-se um SAM (*self-assembled monolayer*): ou seja a superfície é coberta por uma monocamada de moléculas que exibe um elevado grau de orientação e

ordem.[4] Este fenómeno é despoletado pela formação de uma ligação covalente entre a molécula e o substracto e a organização resulta da acção de forças intermoleculares (forças de van der Waals (VDW), dipolo-dipolo, etc).

O termo automontagem (*self-assembly*, SA) é utilizado para designar este processo porque o sistema adquire um arranjo molecular ordenado e estável sem influência humana.

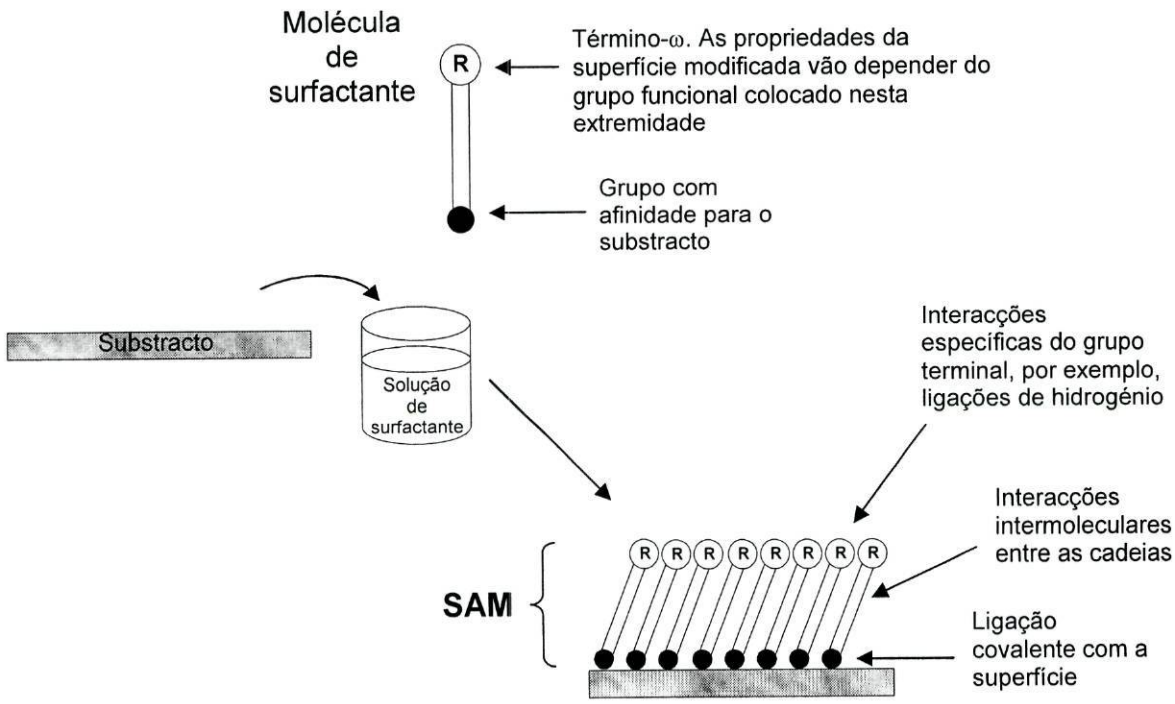
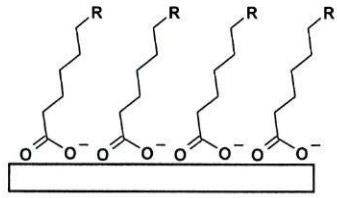
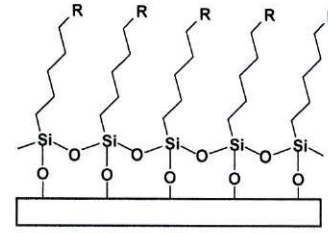
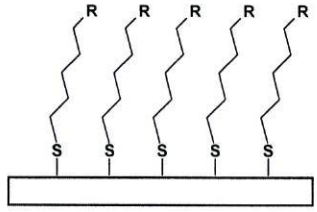
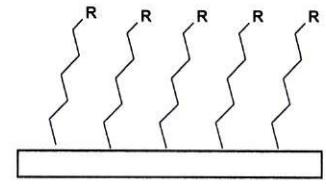
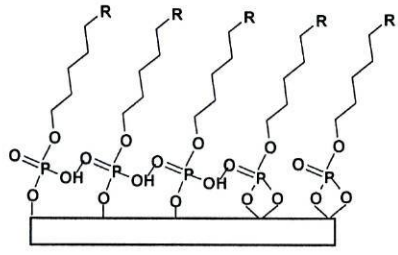


Figura 1.1: Um SAM pode ser formado pela imersão de um substrato numa solução de um surfactante apropriado. O tempo de imersão é normalmente de várias horas.

Existem diversas combinações molécula/substracto que originam SAMs, quadro 1.1.

Quadro 1.1: Principais sistemas que originam SAMs.

A 	**B** 
Surfactante: ácidos *n*-alcanóicos **Substracto:** AgO, Al_2O_3, CuO_2	**Surfactante:** alquilclorossilanos, alquilalcoxissilanos, alquilaminossilanos **Substracto:** superfícies terminadas com grupos hidroxilo.
C 	**D** 
Surfactante: alcanotióis, dissulfetos de alquilo, xantatos de alquilo, sulfetos de alquilo, dialquiltiocarbamatos **Subtracto:** Au, Ag, Cu, Pt	**Surfactante:** 1-alcenos e 1-alcinos **Substracto:** Si, diamante
E 	
Surfactante: alcanofostatos e alcanofosfonatos **Substracto:** TiO_2, Ta_2O_5, Nb_2O_5, Al_2O_3, ZnO_2, Ferro	

A reacção responsável pela automontagem de ácidos *n*-alcanóicos de cadeia longa ($C_nH_{2n+1}COOH$) em superfícies como óxido de alumínio,[5] óxido de prata [6, 7] e

óxido de cobre[7] (quadro 1.1A), por exemplo, é uma reacção ácido-base que resulta na formação do carboxilato do catião metálico na superfície. Os SAMs de alquilclorossilanos, alquilalcoxissilanos e alquilaminossilanos (quadro 1.1B), por seu lado, obtêm-se em superfícies hidroxiladas. A força motriz para a sua automontagem é a formação *in-situ* do poli(siloxano) ligado aos grupos hidroxilo da superfície (–MOH) através de ligações Si–O–M. Estes SAMs já foram preparados em vidro,[8] óxido de silício,[9] óxido de alumínio,[10] quartzo,[11] mica,[12] seleneto de zinco,[13] óxido de germânio,[13] e ouro.[14] Dos diversos compostos orgânicos de enxofre que originam monocamadas auto-organizadas em diversos substractos (quadro 1.1C),[15, 16] os SAMs de alcanotióis em ouro são indubitavelmente os mais investigados. A reacção que desencadeia a formação do SAM neste caso é a formação do tiolato de Au(I), $(RS^{-}Au^{+} \cdot Au_{n}^{0})$. A descoberta da automontagem de alcenos e alcinos em superfícies de silício terminadas com átomos de hidrogénio (Si–H) (quadro 1.1D) data de 1995.[17] Nestes SAMs a ligação das moléculas à superfície ocorre através da formação de ligações Si–C e é activada termicamente,[17, 18] ou por luz UV.[18b] Mais recentemente (1997) foi demonstrado que alcanofosfatos e alcanofosfonatos formam SAMs com vários óxidos de metais de transição (quadro 1.1E).[19] Supõe-se que os grupos fosfato (fosfonato) se ligam à superfície de óxido metálico através da formação de ligações coordenadas com os átomos do metal.

Também é possível fabricar SAMs mistos (por exemplo contendo dois alcanotióis com diferentes funcionalidades ω,[20] ou diferente tamanho da cadeia[21]) expondo o substracto a uma solução contendo várias espécies[15, 20, 21] ou através de uma reacção de permuta na qual as espécies originalmente automontadas são parcialmente substituídas por espécies da solução $((-SR)_{\text{superfície}} + R'-SH_{\text{solução}} \rightarrow (-SR')_{\text{superfície}} + R-SH_{\text{solução}})$.[15, 22] Em ambos os casos é possível controlar a composição do SAM actuando em variáveis como a concentração das espécies, solvente, tempo de deposição e temperatura.[15]

O papel importante desempenhado pelas interacções intermoleculares (VDW dipolo-dipolo, etc) é evidenciado pelo efeito do tamanho da cadeia de metilenos na estutura dos SAMs. Verifica-se, por exemplo, que a automontagem de *n*-alcanotióis do tipo $(CH_3(CH_2)_nSH)$ com $n < 5$ origina SAMs desordenados com um grau de cobertura baixo, ao passo que os SAMs das moléculas de cadeia longa onde as interacções

intermoleculares são mais intensas ($n > 11$) são perfeitamente ordenados e possuem um empacotamento denso.[23]

Em princípio não existem limitações à natureza de R ou seja à natureza da superfície que se pode obter através de SAMs embora seja intuitivo e esteja experimentalmente demonstrado que grupos R volumosos, por exemplo, dificultam ou impedem a automontagem devido à difusão lenta para o substracto e a uma menor estabilização pelas interacções intermoleculares.[15] Nestes casos pode sempre recorrer-se a reacções de superfície para modificar a natureza dos grupos terminais das moléculas do SAM *in-situ*. Há contudo que ter em consideração a possibilidade da reactividade de um grupo pertencente à monocamada ser diferente da do mesmo grupo em solução. Existem estudos que dão conta de uma redução da reactividade em superfície devido ao congestionamento estereoquímico[10, 24] e de um aumento devido ao efeito favorável da orientação.[15] Tipicamente, as reacções em SAMs são mais lentas que as reacções em solução e menos frequentemente resultam numa menor conversão,[25] a maior parte das reacções em solução continua ainda assim, a ser útil como reacção de superfície.[4,10,15,26] Por exemplo, os SAMs de alcanotióis terminados por grupos –OH têm sido utilizados em diversas reacções de modificação da superfície, figura 1.2.[4]

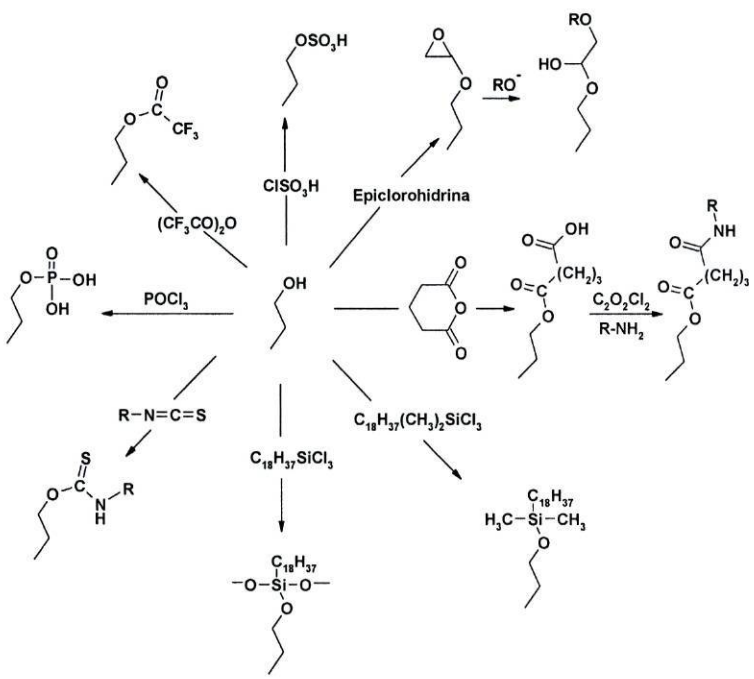


Figura 1.2: Reacções de superfície já observadas para SAMs de ω-hidroxialcanotiolatos (da referência 4).

A forma simples como se obtém uma superfície de composição bem definida, estável e organizada via automontagem baseada na adsorção química tem sido utilizada nas mais diversas aplicações. A possibilidade de controlar a distância ao nível do angstrom variando o número de grupos metileno foi explorada em investigação fundamental como no estudo do efeito de túnel,[27] *coulomb staircase*[28] e mecanismo de operação do transistor de um só electrão.[29] O facto dos SAMs possuírem uma estrutura densa e poderem incorporar uma larga variedade de grupos quer na cadeia alquílica quer como grupo terminal torna-os adequados para produzir uma larga variedade de superfícies o que têm sido explorado no controlo da molhagem,[16b, 30] da lubrificação[31] e adesão,[32] no controlo da resposta biológia a biomateriais (compatibilidade sanguínea e biocompatibilidade),[33] em *patterning* de superfícies[34] (para aplicação em microelectrónica,[34a] na construção do "*lab on a chip*",[35] e no desenvolvimento de sensores com formato *array* (*arrays* de ADN[36] e proteínas,[37] por exemplo)), na criação de superfícies com gradientes químicos,[38] em computação com ADN,[39] na prevenção da corrosão,[40] em nanotecnologia (para estabilizar e organizar nanoclusters),[41] em dispositivos electro-ópticos para geração de 2°s harmónicos[42] e no desenvolvimento de sensores e biosensores.[43] Esta última aplicação tem vindo ser crescentemente explorada dada a demanda de miniaturização.

De facto, os SAMs constituem uma plataforma, em muitos aspectos ideal, para fabrico da nova geração de sensores biológicos: em primeiro lugar, porque proporcionam um micro-ambiente favorável para a imobilização de biomoléculas (enzimas, anticorpos, ADN) em superfícies sem perda de actividade, permitindo a integração das propriedades de reconhecimento das biomoléculas com as mais variadas superfícies em transdutores electroquímicos,[43d,e,f] ópticos,[43c,d,h,e] e piezoeléctricos,[43d,e,g] (figura 1.3) e depois porque os SAMs consomem muito poucos recursos: uma monocamada é composta por $\sim 10^{13}$ moléculas/cm^2, (10^{-7} moles/cm^2). Dada a dificuldade em obter alguns produtos biológicos, esta é uma vantagem importante.

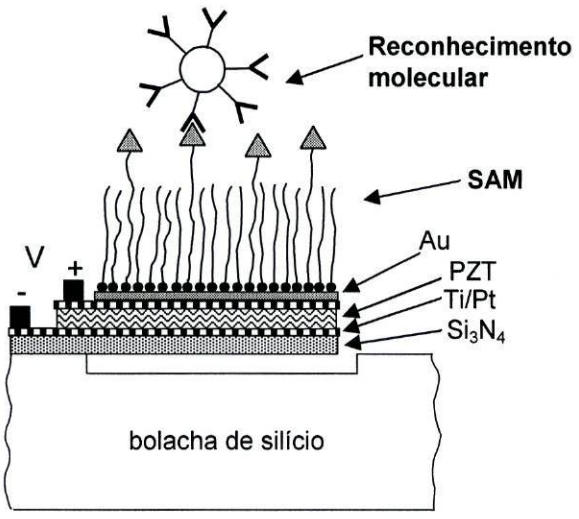


Figura 1.3: Diagrama de um biosensor piezoeléctrico que utiliza um SAM. (da ref. 44). O sensor é composto por um cantilever (Si_3N_4), eléctrodos, um filme de um material piezoléctrico (PZT) e uma superfície para reconhecimento molecular. Esta última foi construída a partir de um SAM misto em que uma das espécies foi derivatizada com um grupo capaz de interactuar com a molécula alvo. Quando tal interacção ocorre, o SAM sofre alterações conformacionais impondo uma força de deformação sobre o cantilever, esta força, em combinação com a massa adicional da biomolécula que se liga, causam uma variação na frequência de oscilação do elemento piezoléctrico que é convertida numa diferença de potencial.

1.3 Filmes multicamadas obtidos por LBLA: definição, propriedades e aplicações

As possibilidades no controlo da Química das superfícies e no desenvolvimento de sensores e novos materiais, foram consideravelmente aumentadas com a introdução do conceito de montagem com base em interacções electrostáticas, LBLA. Esta tecnologia permite a obtenção de filmes multicamadas em superfícies, com controlo da espessura ao nível nanométrico, pela simples repetição da imersão alternada de um substracto carregado em soluções de poliiões com carga oposta, figura 1.4.

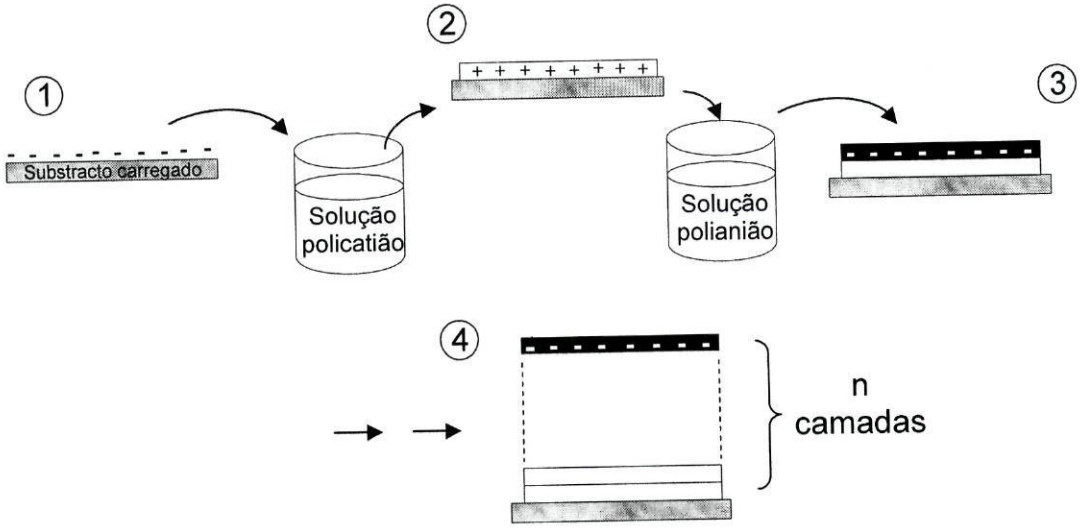


Figura 1.4: Representação esquemática do processo de deposição camada-a-camada (LBLA) de um filme com a arquitectura mais simples: $(A/B)_n$. A preparação começa com a imersão de um substracto carregado (por exemplo negativamente) (1), numa solução aquosa de um policatião o que causa a deposição de uma camada deste composto na superfície e a inversão da carga da superfície (2). A imersão subsequente do substracto numa solução da espécie polianiónica conduz à deposição de uma camada deste composto e a uma nova inversão da carga, (3). A repetição destas imersões várias vezes permite construir um filme multicamadas, (4). O tempo de adsorção por camada é normalmente de alguns minutos no caso de polielectrólitos mas pode chegar a várias horas para partículas coloidais.

O processo é extremamente simples e baseia-se no facto da adsorção de uma molécula possuindo múltiplas cargas do mesmo sinal permitir a inversão da carga da superfície: aquilo que passou a ser designado por sobrecompensação de carga.[3, 45] Este fenómeno é responsável pela repulsão de moléculas com a mesma carga o que confere auto-regulação ao processo restringindo a adsorção a uma só camada de moléculas e, por outro lado, possibilita a adsorção de uma camada de moléculas de carga contrária num segundo passo. Como as moléculas adsorvem somente até ao momento em que passam a ser repelidas (isto é, até ocorrer inversão da carga da superfície) o "verdadeiro equílibrio" de adsorção (correspondente à situação de saturação dos pontos de ligação na superfície) não é atingido. Este facto, juntamente com o efeito cooperativo dos inúmeros pares iónicos formados, explica a estabilidade dos filmes.[46] A formação dos

pares iónicos entre os poliiões e a superfície tende a excluir do filme os iões pequenos do electrólito de suporte e conduzir a uma situação de compensação intrínseca, isto é, em que a carga dos policatiões na multicamada é exactamente compensada pela carga dos polianiões.[47] Esta situação pode ser alterada posteriormente para outra com diferentes graus de compensação extrínseca, quando o filme é exposto a soluções salinas.[47]

A espessura e a morfologia das camadas individuais depositadas por ESA pode ser controlada variando a densidade de carga das moléculas, a força iónica da solução de deposição, e a temperatura de deposição.[48] Regra geral, a espessura aumenta com a diminuição da densidade de carga, aumento da força iónica e aumento da temperatura. O efeito da densidade de carga e da força iónica são explicados com base em alterações conformacionais, transição *rod-coil*, das moléculas em solução. À medida que diminui a densidade de carga as moléculas adoptam uma conformação mais enovelada (*coil*) devido à diminuição das repulsões electrostáticas entre os seus grupos laterais.[48c] Os iões da solução têm o mesmo efeito devido à blindagem das cargas das cadeias. O aumento da temperatura de deposição também conduz a filmes mais espessos, por promover a dissociação localizada de pares iónicos, aumentando o número de cadeias que se projectam para fora do filme.[48g]

Embora estratificados, no sentido em que a posição de uma molécula no filme está relacionada com o passo em que foi depositada, na maior parte dos filmes multicamadas de polieletrólitos (PEMs) não existe uma verdadeira estrutura interna em camadas devido à forte interpenetração das cadeias dos polielectrólitos que tende a suavizar as variações de composição na direcção perpendicular à superfície. Aquilo que se observa é um ordenamento de longo alcance, entre quatro a seis camadas.[3, 49] Obtêm-se filmes multicamadas com maior ordenamento interno combinando polieletrólitos e aluminossilicatos coloidais[50] ou usando policatiões da família dos ionenos.[51]

O facto desta técnica utilizar a atracção electrostática como força motriz para a automontagem confere-lhe uma enorme flexibilidade já que de todas as ligações químicas a ligação electrostática é a que menos requesitos estereoquímicos possui. Enquanto que a automontagem baseada na formação de ligações covalentes e a técnica de Langmuir-Blodgett só podem ser utilizadas com certas classes de compostos e substractos no LBLA não há limitação quanto à natureza dos compostos, à natureza, tamanho e topologia do substracto. Uma outra vantagem importante é o facto do LBLA

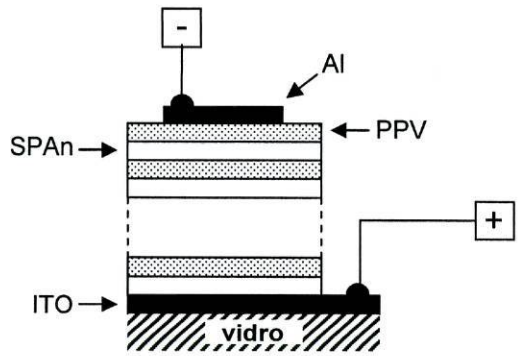
ocorrer a partir de soluções aquosas. Por outro lado o LBLA não origina estruturas tão ordenadas como os SAMs ou os filmes Langmuir-Blodgett.

Convém salientar que o fabrico de filmes funcionais utilizando esta técnica não requere que a molécula funcional seja um poliião. Quando esta é neutra, ou não possui carga suficiente para permitir a automontagem sequencial, pode optar-se pela deposição de um polielectrólito enxertado com moléculas funcionais,[52] ou pela difusão pós-preparação das moléculas funcionais para o interior de uma multicamada.[53]

A actividade de um determinado filme pode ser finamente controlada variando o número de camadas funcionais depositadas ou mesmo a sua posição no filme.[54]

Após a descoberta da automontagem com base em interacções electrostáticas verificou-se que a metodologia camada-a-camada (LBLA) também podia ser utilizada para construir filmes multicamadas com base noutro tipo de interacções nomeadamente ligações de hidrogénio[53c, 55] e bioespecíficas.[56]

Desde a sua descoberta a tecnologia de montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas já foi aplicada na construção de filmes dos mais diversos materiais como polielectrólitos sintéticos,[45-49, 53] ácidos nucleicos,[57] enzimas,[58] proteínas,[59] vírus,[60] polímeros condutores,[61] nanopartículas,[62] aluminossilicatos,[50,63] corantes,[64] e dendrímeros;[65] com aplicação em sensores e biosensores,[52a, 54, 58a, 58e, 66] membranas de separação,[67] optoelectrónica (figura 1.5),[61a, 68] "patterning" de superfícies (além das técnicas usuais de "patterning" como a fotolitografia, a impressão de micro-contacto (μCP), ou a impressão de jacto de tinta (IJP), o LBLA permitiu o desenvolvimento da técnica baseada na colagem polímero-sobre-polímero (*polymer-on-polymer stamping* (POPS)),[69] catálise,[57a, 58b, 70] prevenção da corrosão,[71] controlo da adesão,[72] revestimentos para artérias danificadas,[73] fabricação de micro-cápsulas[74] (utilizadas por exemplo, na libertação controlada de fármacos[74a,c] ou como nanoreactores[74d,e]) (figura 1.5).



Representação do díodo emissor de luz construído por Onoda e Yoshino (ref.61a) a partir de um filme multicamadas de dois polímeros condutores: o policatião poli(*p*-fenileno vinileno) (PPV) e o polianião polianilina sulfonada (SPAn).

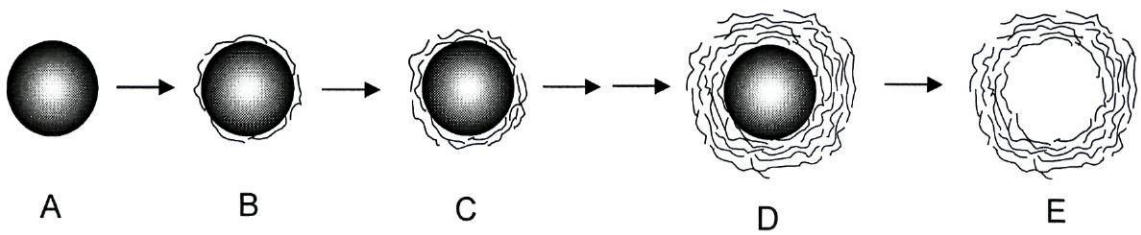


Ilustração esquemática do modo de preparação de cápsulas por LBLA: um suporte esférico carregado (partículas de latex ou coloidais) é usado no processo de LBLA (A-D). Após a deposição de um determinado número de camadas o suporte é removido por dissolução (por exemplo) com um solvente apropriado (E) (figura adaptada da ref. 74b).

Figura 1.5: Dois exemplos de aplicação dos filmes obtidos por LBLA: processamento de polímeros condutores para fabrico de díodos emissores de luz e fabrico de micro-cápsulas.

1.4 Apresentação e organização da tese

Nesta dissertação são apresentados e discutidos resultados de experiências com SAMs e filmes obtidos por LBLA.

No capítulo 3, "Síntese e aplicação de monocamadas terminadas com grupos tiol na imobilização de ADN em superfícies de ouro", é apresentado um novo processo químico para imobilizar ADN e péptidos em superfícies de Au baseado em SAMs; no capítulo 4, "Modificação de superfícies por adsorção electrostática da poli-L-arginina", é descrito um novo processo químico para imobilizar proteínas em superfícies que utiliza filmes obtidos por automontagem com base em interacções electrostáticas para criar

superfícies terminadas com grupos guanidino reactivos; e no capítulo 5 "Impedância electroquímica e voltametria cíclica de eléctrodos modificados com filmes multicamadas de polielectrólitos (PEMs) e sua relação com a estrutura dos filmes" é apresentado um estudo de caracterização de eléctrodos cobertos com filmes obtidos por LBLA usando as técnicas electroquímicas de espectroscopia de impedância electroquímica e voltametria cíclica.

Embora já fosse uma área de intensa investigação, a descodificação do genoma humano fez disparar a procura de novos sensores para os genes e para os seus produtos, as proteínas. Em qualquer sensor que implique a imobilização de biomoléculas numa superfície, esta e o processo químico utilizado na imobilização são, em larga medida, responsáveis pela sensibilidade e como tal são parâmetros que é preciso optimizar, daí que exista actualmente um enorme interesse em descobrir processos químicos para imobilizar ADN e proteínas. Os estudos apresentados nos capítulos 3 e 4 constituem novas opções nesta área.

A electroquímica é sensível ao transporte de massa e à estrutura da interface. Este facto tem sido explorado em eléctrodos modificados para avaliar por exemplo, a estrutura de SAMs,[75] as propriedades dieléctricas de tintas[76] e o transporte de massa e carga em polímeros condutores.[77] Uma estratégia semelhante foi utilizada no estudo apresentado no capítulo 5. Através da monitorização do efeito da montagem de um filme multicamadas na reacção de eléctrodo procurou-se investigar um fenómeno ainda pouco compreendido: o transporte de massa em filmes multicamadas de polielectrólitos (PEMs).

Para caracterizar SAMs ou filmes obtidos via LBLA são necessárias técnicas de análise especialmente sensíveis já que a superfície é modificada com quantidades mínimas de matéria (da ordem das 10^{13} moléculas/cm^2). Para levar a cabo a caracterização das superfícies usadas nas experiências referidas nos parágrafos anteriores e ao mesmo tempo dotar o Laboratório da Electroquímica e Química Analítica (LEQA) de uma técnica de análise de superfícies complementar às técnicas electroquímicas, o plano de trabalhos incluiu também a implementação de um sistema FT-IRRAS (espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier), tendo como ponto de partida um espectrofotómetro de transmissão já existente no laboratório. No capítulo que se segue são apresentadas a teoria óptica e as condições

experimentais relevantes na experiência de FT-IRRAS e é descrita a montagem experimental que foi construída.

1.5 Bibliografia

(1) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.

(2) (a) Decher, G.; Hong, J. D. *Makromol. Chem., Makromol. Symp.* **1991**, *46*, 321-327. (b) Decher, G.; Hong, J.-D.; Schmitt, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210/211*, 831-835.

(3) Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.

(4) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.

(5) Allara, D. L.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* **1985**, *1*, 45-52.

(6) Schlotter, N. E.; Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132*, 93-98.

(7) Lin, S.-Y.; Tsai, T.-K.; Lin, C.-M.; Chen, C.-H. *Langmuir* **2002**, *18*, 5473-5478.

(8) Fall, B. I.; Eberlein-König, B.; Behrendt, H.; Niessner, R.; Ring, J.; Weller, M. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 556-562.

(9) Efimenko, K.; Novick, B.; Carbonell, R. G.; DeSimone, J. M.; Genzer, J. *Langmuir* **2002**, *18*, 6170-6179.

(10) Kurth, D. G.; Bein, T. *Langmuir* **1993**, *9*, 2965-2973.

(11) Brandiss, S.; Margel, S. *Langmuir* **1993**, *9*, 1232-1240.

(12) Schwartz, D. K.; Steinberger, S.; Israelachvili, J.; Zasadzinski, Z. A. N. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *69*, 3354-3357.

(13) Gun, J.; Sagiv, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *112*, 457-472.

(14) Sabatani, E.; Rubinstein, I.; Maoz, R.; Sagiv, J. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *219*, 365-371.

(15) Chechik, V.; Stirling, C. J. M. em *The Chemistry of Organic Derivatives of Gold and Silver*; Editores, Saul Patai e Zvi Rappoport; John Wiley & Sons: Chichester, 1999; Cap. 15.

(16) (a) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y.-T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152-7167. (b) Wenzl, I.; Yam, C. M.; Barriet, D.; Lee, T. R. *Langmuir* **2003**, *19*, 10217-10224. (c) Weckenmann, U.; Mittler, S.; Naumann, K.; Fischer, R. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 5479-5486. (d) Jiang, P.; Liu, Z.-F.; Cai, S.-M. *Langmuir* **2002**, *18*, 4495-4499.

(17) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3145-3155.

(18) (a) Saito, N.; Hayashi, K.; Sugimura, H.; Takai, O. *Langmuir* **2003**, *19*, 10632-10634. (b) Linford, M. R.; Chidsey, C. E. D. *Langmuir* **2002**, *18*, 6217-6221.

(19) (a) Mäge, I.; Jähne, E.; Henke, A.; Adler, H.-J. P.; Bram, C.; Jung, C.; Stratmann, M. *Makromol. Symp.* **1998**, *126*, 7-24. (b) Textor, M.; Ruiz, L.; Hofer, R.; Rossi, A.; Feldmann, K.; Hähner, G.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2000**, *16*, 3257-3271.

(20) (a) Ostuni, E.; Grzybowsky, B. A.; Mrksich, M., Roberts, C. S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1861-1872. (b) Twardowski, M.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* **2003**, *19*, 9781-9791.

(21) Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. **1997**, *13*, 6485-6490.

(22) Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782-3789.

(23) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3567.

(24) (a) van Ryswyk, H.; Turtle, E. D.; Watson-Clark, R.; Tanzer, T. A.; Herman, T. K.; Chong, P. Y.; Waller, P. J.; Taurog, A. L.; Wagner, C. E. *Langmuir*, **1996**, *12*, 6143-6150. (b) Chechik, V.; Stirling, C. J. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 6354-6356.

(25) Schönherr, H.; Feng, C.; Shovsky, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 10843-10851.

(26) Duevel, R. V.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 337-342.

(27) (a) Becka, A. M.; Miller, C. J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 2657-2668. (b) Napper, A. M.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7699-7707. (c) Smalley, J. F.; Finklea, H. O.; Chidsey, C. E. D.; Linford, M. R.; Creager, S. E.; Ferraris, J. P.; Chalfant, K.; Zawodzinsk, T.; Feldberg, S. W.; Newton, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2004-2013.

(28) (a) Andres, R. P.; Bein, T.; Dorogi, M.; Feng, S.; Henderson, J. I.; Kubiak, C. P.; Mahoney, W.; Osifchin, R. G.; Reifenberger, R. *Science*, **1996**, *272*, 1323-1325. (b) Chen, S.; Ingram, R. S.; Hostetler, M. J.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Schaaff, T. G.; Khoury, J. T.; Alvarez, M. M.; Whetten, R. L. *Science* **1997**, *280*, 2098-2101.

(29) Feldhein, D. L.; Keating, D. C. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 1-12.

(30) Yang, J.; Han, J.; Isaacson, K.; Kwok, D. Y. *Langmuir* **2003**, *19*, 9231-9238.

(31) Shon, Y.-S.; Lee, S.; Colorado Jr., R.; Perry, S. S.; Lee, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7556-7563.

(32) (a) Vanderah, D. J.; Valincius, G.; Meuse, C. W. *Langmuir* **2002**, *18*, 4674-4680. (b) Quian, X.; Metallo, S. J.; Choi, I. S.; Wu, H.; Liang, M. N.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1805-1810.

(33) (a) Ratner, B. D. em *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*; Editores Buddy D. Ratner e David G. Castner; Plenum Press: Nova Iorque, 1997; pag. 1. (b) Tosatti, S.; Michel, R.; Textor, M.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2002**, *18*, 3537-3548.

(34) (a) Kumar, A.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1498-1511. (b) Wang, X.; Hu, W.; Ramasubramaniam, R.; Bernstein, G. H.; Snider, G.; Lieberman, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 9748-9758. (c) Wouters, D.; Schubert, U. *Langmuir* **2003**, *19*, 9033-9038. (d) Hong, L.; Sugimura, H.; Furukawa, T.; Takai, O. *Langmuir* **2003**, *19*, 1966-1969. (e) Pardo, L.; Wilson, Jr., W. C.; Boland, T. *Langmuir* **2003**, *19*, 1462-1466.

(35) Hinder, S. J.; Connell, S. D.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 3151-3158.

(36) (a) Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8044-8051. (b) Gillmor, S. D.; Thiel, A. J.; Strother, T. C.; Smith, L. M.; Lagally, M. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 7223-7228.

(37) Veiseh, M.; Zareie, M. H.; Zhang, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 6671-6678.

(38) Morgenthaler, S.; Lee, S.; Zürcher, S.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2003**, *19*, 10459-10462.

(39) (a) Smith, L. M.; Corn, R. M.; Condon, A. E.; Lagally, M. G.; Frutos, A. G.; Liu, Q.; Thiel, A. J. *J. Comput. Biol.* **1998**, *5*, 255-267. (b) Liu, Q.; Wang, L.; Frutos, A. G.; Condon, A. E.; Corn, R. M.; Lloyd M. Smith, L. M. *Nature* **2000**, *403* 175-179.

(40) (a) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9022-9028. (b) Mäge, I.; Jähne, E.; Henke, A.; Adler, H.-J. P.; Bram, C.; Jung, C.; Stratmann, M. *Progr.Org. Coat.* **1998**, *34*, 1-2. (c) Felhősi, I.; Telegdi, J.; Pálinkás, G.; Kálmán, E. *Electrochim. Acta* **2002**, *47*, 2335-2340.

(41) (a) Brust, M.; Walker, M.; Bethel, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802. (b) Yang, J.; Lee, J. Y.; Deivaraj, T. C.; Too, H.-P. *Langmuir* **2003**, *19*, 10361-10365.

(42) (a) Heflin, J. R.; Figura, C.; Marciu, D.; Liu, D.; Claus, R. O. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *74*, 495-497. (b) van der Boom, M. E.; Evmenenko, G.; Yu, C.; Dutta, P.; Marks, T. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 10531-10537.

(43) (a) Flink, S.; Boukamp, B. A.; van der Berg, A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4652-4657. (b) Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Kubota, L. T. *Quím. Nova*, **2003**, *26*, 381-389. (c) Spinke, J.; Liley, M.; Guder, H.-J.; Angermaier, L.; Knoll, W. *Langmuir* **1993**, *9*, 1821-1825. (d) Wink, T.; van Zuilen, S. J.; Bult, S. J.; van Bennekom, W. P. *Analyst* **1997**, *122*, 43R-50R. (e) Chaki, N. K.; Vijayamohanan, K. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1-12. (f) Kerman, K.; Morita, Y.; Takamura, Y., Tamiya, E. *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 887-891. (g) Pinnaduwage, L. A.; Hawk, J. E.; Boiadjiev, V.; Yi, D.; Thundat, T. *Langmuir* **2003**, *19*, 7841-7844. (h) Smith, E. A;

Erickson, M. G.; Ulijasz, A. T.; Weisblum, B.; Corn, R. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1486-1492.

(44) McGlennen, R. C. *Clin.Chem.* **2001**, *47*, 393-402.

(45) (a) Hoogeveen, N. G.; Stuart, M. A. C.; Fleer, G. J. *Langmuir* **1996**, *12*, 3675-3681. (b) Netz, R. R.; Joanny, J.-F. *Macromolecules* **1999**, *32*, 9013-9025. (c) Ladam, G.; Schaad, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G.; Cuisinier, F. *Langmuir* **2000**, *16*, 1249-1255. (d) Schwarz B.; Schönhoff, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 2964-2966.

(46) (a) Lowack, K.; Helm, C. A. *Macromolecules* **1998**, *31*, 823-833. (b) Castelnovo, M. Joanny, J.-F. *Langmuir* **2000**, *16*, 7524-7532.

(47) (a) Schlenoff, J. B.; Ly, H.; Li, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7626-7634. (b) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Langmuir* **2001**, *17*, 7725-7727.

(48) (a) Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213-4219. (b) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3736-3740. (c) Steitz, R.; Jaeger, W.; Klitzing, R. v. *Langmuir* **2001**, *17*, 4471-4474. (d) Schoeler, B.; Kumaraswamy, G.; Caruso, F. *Macromolecules* **2002**, *35*, 889-897. (e) Büsher, K.; Graf, K.; Ahrens, H.; Helm, C. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 3585-3591. (f) Plunkett, M. A.; Claesson, P. M.; Ernstsson, M.; Rutland, M. W. *Langmuir* **2003**, *19*, 4673-4681. (g) Tan, H. L.; McMurdo, M. J.; Pan, G.; Van Patten, P. G. *Langmuir* **2003**, *19*, 9311-9314.

(49) Schmitt, J.; Grünewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K.; Lösche, M. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7058-7073.

(50) Glinel, K.; Laschewsky, A.; Jonas, A. M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 5267-5274.

(51) Arys, X.; Fischer, P.; Jonas, A. M.; Koetse, M. M.; Laschewsky, A.; Legras, R.; Wischerhoff, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1858-1865.

(52) (a) Lee, S.-H.; Kumar, J.; Tripathy, S. K. *Langmuir* **2000**, *16*, 10482-10489. (b) Wang, H.; He, Y.; Tuo, X.; Wang, X. *Macromolecules* **2004**, *37*, 135-146

(53) (a) Wang, T. C.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. *Langmuir* **2002**, *18*, 3370-3375. (b) Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Donath, E.; Möhwald, H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2317-2328. (c) Quinn, J. F.; Caruso, F. *Langmuir* **2004**, *20*, 20-22.

(54) Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3427-3433.

(55) (a) Wang, L.; Cui, S.; Wang, Z.; Zhang, X. *Langmuir* **2000**, *16*, 10490-10494. (b) Fu, Y.; Chen, H.; Qiu, D.; Wang, Z.; Zhang, X. *Langmuir* **2002**, *18*, 4989-4995.

(56) Anzai, J.-i.; Nishimura, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1887-1889

(57) (a) Lvov, Y. M.; Lu, Z.; Schenkman, J. B.; Zu, X.; Rushling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4073-4080. (b) Shi, X.; Sanedrin, R. J.; Zhou, F. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1173-1180. (c) Jin, Y.; Shao, Y.; Dong, S. *Langmuir* **2003**, *19*, 4771-4777.

(58) (a) Anzai, J.-i.; Takeshita, H.; Kobayashi, Y.; Osa, T.; Hoshi, T. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 811-817. (b) Caruso, F.; Schüler, C. *Langmuir* **2000**, *16*, 9595-9603. (c) Calvo, E. J.;

Danilowicz, C.; Wolosiuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2452-2453. (d) Forzani, E. S.; Pérez, M. A.; Teijelo, M. L.; Calvo, E. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 9867-9873. (e) Constantine, C. A.; Mello, S. V.; Dupont, A.; Cao, X.; Santos, D.; Oliveira, Jr., O. N.; Strixino, F. T.; Pereira, E. C.; Cheng, T.-C.; Defrank, J. J.; Leblanc, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1805-1809.

(59) (a) Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117-6123. (b) Ladam, G.; Gergely, C.; Senger, B.; Decher, G.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 674-687. (c) Szyk, L.; Schaaf, P.; Gergely, C.; Voegel, J.-C.; Tinland, B. *Langmuir* **2001**, *17*, 6248-6253. (d) Ladam, G.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Voegel, J.-C. *Langmuir* **2001**, *17*, 878-882.

(60) Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Möhwald, H. *Langmuir* **1994**, *10*, 4232-4236.

(61) (a) Onoda, M.; Yoshino, K. *J. Appl. Phys.* **1995**, *78*, 4456-4462. (b) Baba, A.; Park, M.-K.; Advíncula, R. C.; Knoll, W. *Langmuir* **2002**, *18*, 4648-4652. (c) Lukkari, J.; Salomäki, M.; Viinikanoja, A.; Ääritalo, T.; Paukkunen, J.; Kocharova, N.; Kankare, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6083-6091.

(62) (a) Malikova, N.; Pastoriza-santos, I.; Schierhorn, M.; Kotov, N.A.; Liz-Marzán, L.M. *Langmuir* **2002**, *18*, 3694-3697. (b) Sennerfors, T.; Bogdanovic, G.; Tiberg, F. *Langmuir* **2002**, *18*, 6410-6415. (c) He, J.-A.; Mosurkal, R.; Samuelson, L. A.; Li, L.; Kumar, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 2169-2174. (d) Cant, N. E.; Zhang, H.-L.; Critchley, K.; Mykhalyk, T. A.; Davies, G. R.; Evans, S. D. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13557-13562.

(63) Glinel, K.; Moussa, A.; Jonas, A. M.; Laschewsky, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 1408-1412.

(64) (a) Laschewsky, A.; Wischerhoff, E.; Kauranen, M.; Persoons, A. *Macromolecules* **1997**, *30*, 8304-8309. (b) Linford, M. R.; Auch, M.; Möhwald, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 178-182.

(65) (a) Kim, B. Y.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 94-99. (b) Li, C.; Mitamura, K.; Imae, T. *Macromolecules*, **2003**, *36*, 9957-9965.

(66) Constantine, C. A.; Gattás-Asfura, K. M.; Mello, S. V.; Crespo, G.; Rastogi, V.; Cheng, T.-C.; DeFrank, J. J.; Leblanc, R. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 9863-9867.

(67) (a) Leväsalmi, J.-M.; McCarthy, T. J. *Macromolecules* **1997**, *30*, 1752-1757. (b) Krasemann, L.; Tieke, B. *Langmuir* **2000**, *16*, 287-290. (c) Bruening, M.; Sullivan, D. M. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3833-3837. (d) Jin, W.; Toutianoush, A.; Tieke, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 2550-2553. (e) Rmaile, H. H.; Schlenoff, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6602-6603.

(68) (a) Wu, A.; Yoo, D.; Lee, J.-K.; Rubner, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4883-4891. (b) Locklin, J.; Youk, J. H.; Xia, C.; Park, M.-K.; Fan, X.; Advincula, R. C.

Langmuir **2002**, *18*, 877-883. (c) Li, W.; Hooks, D. E.; Chiarelli, P.; Jiang, Y.; Xu, H.; Wang, H.-L. *Langmuir* **2003**, *19*, 4639-4644.

(69) (a) Wang, T. C.; Chen, B.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. *Langmuir* **2001**, *17*, 6610-6615. (b) Guo, T.-F.; Chang, S.-C.; Pyo, S.; Yang, Y. *Langmuir* **2002**, *18*, 8142-8147. (c) Berg, M. C.; Choi, J.; Hammond, P.T.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2003**, *19*, 2231-2237.

(70) Zhou, Y.; Li, Z.; Hu, N.; Zeng, Y.; Rusling, J. F. *Langmuir* **2002**, *18*, 8573-8579.

(71) Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *Electrochem. Sol. State Lett.* **2002**, *5*, B13-B15.

(72) Kumar, G.; Wang, Y. C.; Co, C.; Ho, C.-C. *Langmuir* **2003**, *19*, 10550-10556.

(73) Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Tabrizian, M. *J. Am. Chem. Soc.***2003**, *125*, 7494-7495.

(74) (a) Caruso, F.; Yang, W.; Trau, D.; Renneberg, R. *Langmuir* **2000**, *16*, 8932-8936. (b) Caruso, F. *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 349-353. (c) Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Möhwald, H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2281-2284. (d) Radtchenco, I. L.; Giersig, M.; Sukhorukov, G. B. *Langmuir* **2002**, *18*, 8204-8208. (e) Briseno, A. L.; Han, S.; Rauda, I. E.; Zhou, F.; Toh, C.-S.; Nemanick, J.; Lewis, N. S. *Langmuir* **2004**, *20*, 219-226.

(75) (a) Sabatani, E.; Cohen-Boulakia, J.; Bruening, M.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 2974-2981. (b) Bandyopadhyay, K.; Vijayamohanan, K.; Shekhawat, G. S.; Gupta, R. P. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *447*, 11-16. (c) Boubour, E.; Lennox, R. B. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9004-9010.

(76) Domingues, L.; Oliveira, C.; Fernandes, J. C. S; Ferreira, M. G. S. *Electrochim. Acta* **2002**, *47*, 2253-2258.

(77) Martin, C. R.; Van Dyke, L. S. em *Molecular Design of Electrode Surfaces*; Editor, Royce W. Murray; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1992; Cap. 9.

Capítulo 2

Espectroscopia de Reflexão-Absorção no Infravermelho de superfícies modificadas quimicamente

2.1 Caracterização de superfícies modificadas

2.2 Espectroscopia de infravermelho de superfícies: conceitos e perspectiva histórica

2.3 Teoria óptica da espectroscopia de reflexão

2.3.1 Definições

2.3.2 Reflexão-absorção de radiação no infravermelho em superfícies de ouro

2.3.2.1 Cálculo da intensidade do campo eléctrico na interface ar/Au

2.3.2.2 Cálculos de reflectância para o sistema ar/filme/Au

2.3.3 Comparação entre transmissão e reflexão

2.3.4 Condições de máxima detectibilidade na experiência de IRRAS

2.4 Montagem experimental para FT-IRRAS

2.5 PM-FT-IRRAS

2.5.1 Teoria da modulação da polarização em FT-IRRAS

2.5.2 Montagem experimental para PM-FT-IRRAS

2.6 Procedimento experimental

2.7 Bibliografia

2.1 Caracterização de superfícies modificadas

Na caracterização de uma superfície modificada quimicamente há normalmente várias questões que se colocam:

- qual a natureza do adsorbato? A monitorização da composição química é essencial mesmo no caso de filmes sintéticos, nem que seja somente para assegurar que a reacção de superfície ocorreu com sucesso. A reacção pretendida pode ocorrer em simultâneo com reacções laterais ou adsorção de impurezas. A identificação de todas as espécies presentes na superfície é quase sempre necessária para utilizar com sucesso superfícies modificadas;

- qual a natureza da interacção adsorbato-superfície? Um dos requisitos mais importantes de qualquer química de modificação é originar filmes termodinamicamente estáveis o que depende da força e estabilidade da interacção superfície-adsorbato. Daqui resulta a importância de saber como as moléculas que constituem o filme se ligam à superfície, qual a natureza da ligação, química ou física (?), qual o átomo ou grupo de átomos que se ligam à superfície (?), se a ligação é simples ou múltipla (?). Por outro lado, a identificação dos grupos funcionais que formam ligações com superfícies é essencial para o desenho e síntese de novas moléculas para utilizar na modificação de superfícies.

- qual o grau de cobertura da superfície? O efeito da presença do filme depende da extensão da modificação. A determinação do grau de cobertura é uma das medições importantes quando se caracteriza uma superfície modificada.

- qual a organização das moléculas na superfície? Existem várias propriedades macroscópicas que dependem directamente da estrutura e ordenamento molecular tais como a molhagem, lubrificação, adesão ou permeabilidade. Também existe evidência experimental que os trajectos reaccionais dependem da orientação das moléculas na superfície.[1]

Para responder a estas questões são necessárias técnicas de análise de superfícies extremamente sensíveis e capazes de obter informação ao nível molecular.

Uma das técnicas que satisfaz estas exigências e que se afirmou neste campo, durante as últimas duas décadas, foi a espectroscopia de reflexão externa no infravermelho.

2.2 Espectroscopia de infravermelho de superfícies: conceitos e perspectiva histórica

A energia dos *quanta* na região do infravermelho é comparável à requerida para transições entre estados vibracionais das moléculas. O número de vibrações possíveis para uma molécula não-linear com N átomos é de $3N-6$ ao passo que para uma molécula linear é de $3N-5$. Cada uma destas vibrações é denominada um modo normal de vibração. A absorção de radiação está sujeita a regras de selecção.[2] A interacção da radiação electromagnética no infravermelho com a molécula involve a interacção do campo eléctrico da radiação com um momento dipolar eléctrico oscilante na molécula, portanto, para que a molécula absorva radiação infravermelha como energia de excitação vibracional, tem que ocorrer uma variação (da direcção ou intensidade) do momento dipolar da molécula à medida que ela vibra. Uma segunda regra de selecção diz que só as transições para as quais $\Delta\upsilon = +1$ (em que υ representa o número quântico vibracional podem ocorrer.

À temperatura ambiente e a temperaturas inferiores, se o número de onda do modo normal for $\geq 500\,cm^{-1}$,[3] só o estado vibracional fundamental está ocupado. Um espectro de absorção no infravermelho típico consiste então numa série de picos cada um correspondendo à transição entre o estado vibracional fundamental e o primeiro estado excitado de cada modo normal de vibração. De facto, a situação é um pouco mais complexa devido aos graus de liberdade rotacionais no caso de amostras gasosas: a ocorrência da excitação ou relaxação de estados rotacionais resulta no aparecimento de estrutura fina, sendo o espectro composto por muitas centenas de linhas.

Há vários factores que fazem com que o número de picos que aparecem no espectro seja diferente do previsto pelo cálculo do número de modos normais. Um número inferior é encontrado quando a simetria das moléculas é tal que não ocorre variação do momento dipolar em resultado de uma dada vibração (primeira regra de selecção), quando as energias de duas ou mais vibrações são idênticas, quando a

intensidade da banda de absorção é demasiado baixa para ser detectável ou quando a energia da vibração sai fora do intervalo de trabalho do espectrofotómetro usado. Ocasionalmente o espectro contém mais picos do que os calculados devido à ocorrência de *overtones*, correspondendo a transições entre o estado vibracional fundamental e o 2° ou 3° estados excitados (como se trata de transições proíbidas pela segunda regra de selecção as suas intensidades são muito baixas), ou ao aparecimento de bandas de combinação que resultam da excitação simultânea de dois modos vibracionais distintos.

A natureza de um espectro no infravermelho não depende do estado físico da amostra mas quando uma molécula é imobilizada numa superfície há alterações no aspecto do espectro. Em resultado da imobilização os três graus de liberdade translacionais e os três graus de liberdade rotacionais são convertidos em graus de liberdade vibracionais originando os chamados modos normais externos de vibração;[4] obviamente a estrutura fina (caso existisse) desaparece; os modos externos misturam-se com os modos internos com a mesma simetria alterando a sua frequência; e, além disso, como a imobilização na superfície é sempre acompanhada por uma redução de simetria (qualquer plano de reflexão paralelo à superfície ou centro de inversão desaparecem) é de esperar que o número de modos activos no infravermelho aumente.

Um dos aspectos que tornam a espectroscopia de infravermelho tão interessante para o Químico prende-se com o facto dos diversos grupos funcionais absorverem num intervalo de frequências estreito independentemente do resto da molécula de que fazem parte, o que faz com que a presença ou ausência de um dado pico no espectro possa ser utilizada para fins de identificação e caracterização. Estas frequências características permitem por exemplo distinguir o modo deformação (ou *bending*) –OH do modo deformação do grupo –CH, o modo estiramento (ou *stretching*) C=C do modo estiramento $C \equiv C$, um grupo $-CH_3$ dum grupo $-CF_3$, etc. A posição exacta dos picos é ainda afectada por diversos factores como o acoplamento vibracional, a conjugação, interacções intermoleculares e intramoleculares e a intensidade está relacionada com o número de osciladores e com a sua orientação, por exemplo. No seu conjunto esta informação faz da espectroscopia de infravermelho uma técnica extremamente poderosa capaz de providenciar informação detalhada a nível molecular. Se juntarmos a esta especificidade molecular, a elevada sensibilidade, o facto de se tratar duma técnica não-destrutiva, a versatilidade e facilidade de utilização, a capacidade de análise *in-situ* e a existência de informação estrutural abundante e detalhada devido à longa história da

técnica de transmissão, temos alguns dos motivos que tornam a espectroscopia de infravermelho tão atractiva para a análise de superfícies.

O principal obstáculo a ultrapassar na aplicação da espectroscopia de infravermelho no estudo de superfícies é a elevada sensibilidade requerida nesta análise. Tem que ser possível detectar quantidades inferiores à monocamada de moléculas (aproximadamente 10^{13} átomos ou moléculas), figura 2.1. Em outras áreas da Química e Física os investigadores têm normalmente disponíveis cerca de 10^{20} átomos ou moléculas. O reduzido tamanho da amostra fomentou o desenvolvimento de diversas técnicas de medição para estudo de superfícies através de espectroscopia de infravermelho. Uma discussão das diversas técnicas para medição de espectros de infravermelho de superfícies pode ser encontrada no capítulo 17 da referência 5.

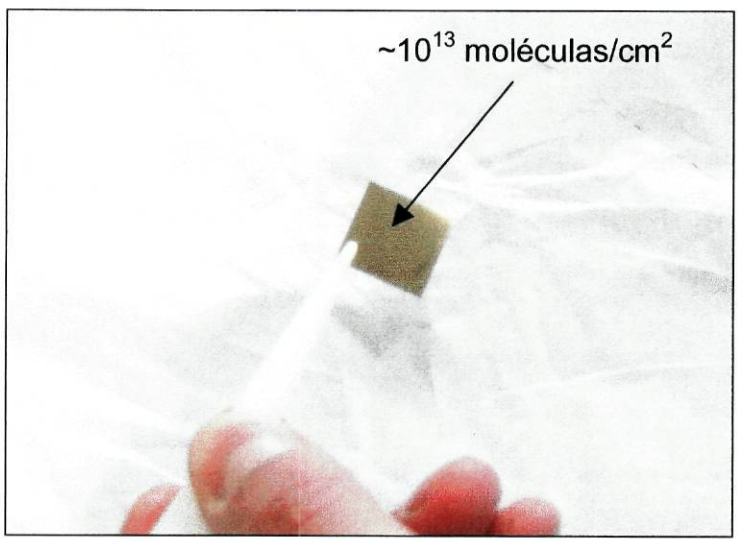


Figura 2.1: Fotografia de um dos slides de Au (18×18 mm) utilizados como substracto na maior parte das experiências apresentadas nesta dissertação.

A transmissão foi a primeira técnica de medição a ser utilizada com sucesso na análise de superfícies por espectroscopia de infravermelho, por Eischens, Pliskin e Francis para medir o espectro de CO adsorvido em catalizadores de Ni, Pd, Pt e Cu suportados em sílica.[6] Nestas medições a área efectiva, logo o número de moléculas de adsorbato, eram elevados em resultado da elevada dispersão do metal na amostra,

permitindo a obtenção de espectros de qualidade mesmo com os espectrofotómetros de baixa sensibilidade da altura (fontes de baixa emissividade e detectores pouco sensíveis). Considerando contudo, as limitações impostas por esta técnica, nomeadamente a necessidade de utilização de suportes e o facto de estar confinada à região de números de onda em que o suporte é transparente, não é de surpreender que não fosse tida como de aplicação generalizada na análise de superfícies. Para amostras opacas com área reduzida como é o caso de superfícies metálicas macias (figura 2.1) era necessário outra técnica de medição.

Os primeiros passos no sentido da aplicação da reflexão especular foram dados por Francis, Ellison[7] e Eckstrom[8] que desenvolveram células de reflexões múltiplas para ultrapassar o problema da baixa sensibilidade. O trabalho de Francis e Ellison é particularmente significativo. Utilizando expressões aproximadas para a variação normalizada da reflectância, $\Delta R / R = [R(d) - R(0)] / R(0)$ (onde $R(0)$ representa a reflectância do substracto sem adsorbato e $R(d)$ a do conjunto filme/substracto), estes investigadores previram que a absorção da componente de radiação perpendicular ao plano de incidência, no caso dum filme fino adsorvido numa superfície metálica, não seria detectável e portanto que só os modos vibracionais produzindo variações do momento dipolar com direcção perpendicular à superfície poderiam ser excitados por radiação paralela ao plano de incidência, com as maiores variações de reflectância a ocorrerem a ângulos de incidência elevados. Os espectros de reflexão poderiam, portanto, proporcionar informação acerca da orientação das moléculas na superfície. Francis e Ellison confirmaram as suas previsões teóricas com resultados experimentais: mediram o espectro de filmes de monocamadas e multicamadas, preparados pela técnica de Langmuir-Blodgett em espelhos metálicos (Ni, Ag, Pt e aço inox), usando quatro reflexões com um ângulo de incidência de 72° obtendo espectros de qualidade mesmo para os filmes de monocamadas.

Os cálculos teóricos preliminares de Francis e Ellison foram posteriormente completados por Greenler que foi o primeiro a denominar este novo método de espectroscopia de *infrared reflection-absorption spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção) ou IRRAS.[9] Este investigador calculou a intensidade duma banda de absorção no infravermelho para um filme adsorvido numa superfície metálica para ambos os estados de polarização da luz incidente, para vários valores das constantes ópticas do adsorbato e metal, várias espessuras do filme e vários

ângulos de incidência, concluindo que, para elevados ângulos de incidência, a absorção da radiação polarizada paralelamente ao plano de incidência chega a ser 5000 vezes mais intensa que a absorção de radiação polarizada perpendicularmente.

A demonstração teória da sensibilidade da técnica de IRRAS contribuiu de forma decisiva para impulsionar a sua utilização na análise de superfícies durante a década de 70,[10-12] mas havia ainda limitações que era necessário ultrapassar antes da técnica adquirir a relevância que tem actualmente. A necessidade de reflexões múltiplas devia-se à ineficácia dos detectores e espectrofotómetros dispersivos utilizados na altura e restringia a aplicação da IRRAS a superfícies com área elevada. Essas limitações foram removidas com a introdução dos espectrofotómetros FT-IR durante a década de 80[13] (resultando na técnica de FT-IRRAS, *Fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier)), e de detectores criogénicos de sensibilidade elevada. Os espectrofotómetros FT-IR apresentam diversas vantagens sobre os espectrofotómetros dispersivos nomeadamente: a vantagem Fellgett, a vantagem Jacquinot e a vantagem Connes[5] que proporcionam maior rapidez, maior fiabilidade e sobretudo maior sensibilidade na determinação de um espectro. Para o mesmo tempo de medição e resolução, a razão sinal-ruído num espectrofotómetro FT-IR chega a ser uma ordem de grandeza superior à obtida com um espectrofotómetro dispersivo.[4] A par dos avanços na intrumentação a sensibilidade na medição do espectro de reflexão de uma superfície também foi aumentada com a utilização de técnicas de dupla modulação como a modulação do potencial em medições espectro-electroquímicas e a modulação da polarização e que deram origem às técnicas de SNIFTIRS[14] (espectroscopia interfacial de infravermelho com transformadas de Fourier normalizadas subtractivamente) e PM-FT-IRRAS (espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier e modulação da polarização).[15]

Actualmente a técnica de FT-IRRAS em conjunto com as suas variantes são das mais utilizadas na análise de superfícies modificadas quimicamente. Embora inicialmente desenvolvida para analisar superfícies metálicas de elevada reflectância a sua utilização depressa foi alargada às superfícies não-metálicas como o silício,[16] carbono vítreo,[17] ou água.[18]

As condições de máxima sensibilidade, isto é, o ângulo de incidência e polarização da luz, que conduzem à maior absorvância, nas medições de FT-IRRAS

dependem marcadamente da natureza da superfície (substracto e adsorbato) e em menor grau do intervalo de frequências analisado. Por exemplo, o ângulo óptimo ronda os 60° para superfícies de silício,[16] enquanto que para superfícies de cobre se situa à volta dos 88°.[16b] O primeiro passo cada vez que se se analisa um substracto ou filme diferentes, deve consistir na resolução do problema de reflexão/absorção para essa superfície. A secção seguinte é consagrada a esta análise para o caso de superfícies de Au modificadas. Esta análise é fundamental, não só para determinar as condições de máxima sensibilidade, como foi referido, mas também para se poder interpretar os espectros medidos, nomeadamente, para separar os deslocamentos, variações de intensidade e forma de bandas, causados pelos chamados "efeitos ópticos", [16b,19] dos devidos a variações na estrutura e ligações químicas decorrentes da imobilização das moléculas na superfície.

2.3 Teoria óptica da espectroscopia de reflexão[20-26]

2.3.1 Definições

Quando uma onda electromagnética plana se propaga num meio não absorvente, o valor instantâneo do vector campo eléctrico é dado pela solução das equações de Maxwell independente do tempo

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}^0 \exp\left[i\left(\omega t - \frac{2\pi n}{\lambda} \mathbf{s} \bullet \mathbf{r} \right) \right] \tag{2.1}$$

onde $\mathbf{E}^0$ representa a amplitude da onda, ω a frequência angular, $\mathbf{r}$ é um vector posição referido a um sistema de coordenadas arbitrário, $\mathbf{s}$ é o versor da direcção de propagação e λ é o comprimento de onda. O índice de refracção do meio, n, é definido por:

$$n = \frac{\mathsf{C}}{\mathsf{V}} = (\varepsilon\mu)^{1/2} \tag{2.2}$$

em que c representa a velocidade da luz no vazio e v a velocidade de fase da onda no meio e ε e μ são, respectivamente, a constante dieléctrica das frequências ópticas e a permeabilidade magnética do meio. Quando o meio é absorvente, a onda é atenuada exponencialmente à medida que se propaga de forma que

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}^0 \exp\left[i\left(\omega t - \frac{2\pi n}{\lambda} \mathbf{s} \bullet \mathbf{r} \right) \right] \exp\left(- \frac{2\pi k}{\lambda} \mathbf{s} \bullet \mathbf{r} \right) \tag{2.3}$$

onde o coeficiente de extinção k é ≥ 0. Por analogia com a equação 2.1 é possível definir o índice de refracção complexo

$$\hat{n} = n + ik . \tag{2.4}$$

Numa fase absorvente a constante dieléctrica também é complexa,

$$\hat{\varepsilon} = \varepsilon' + i\varepsilon'' \tag{2.5}$$

onde ε' e ε'' são a parte real e imaginária de $\hat{\varepsilon}$. Como

$$\hat{n} = (\mu\hat{\varepsilon})^{1/2} \tag{2.6}$$

$$\varepsilon' = \frac{(n^2 - k^2)}{\mu} \tag{2.7}$$

e

$$\varepsilon'' = \frac{2nk}{\mu} . \tag{2.8}$$

A permeabilidade magnética é usualmente considerada igual a 1 na gama das frequências ópticas.

As propriedades ópticas dum material são completamente especificadas por um dos seguintes conjuntos de constantes ópticas: μ, ε' e ε'' ou alternativamente μ, n e k.

A taxa de dissipação de energia da onda por unidade de volume do meio absorvente *j* é dada de acordo com o teorema de Poynting por:

$$-\dot{W}_j = \sigma_j(\nu)\left\langle E_j^2 \right\rangle = \frac{c}{4\pi} n_j \alpha_j \left\langle E_j^2 \right\rangle = \frac{\omega}{4\pi} \varepsilon_j'' \left\langle E_j^2 \right\rangle \tag{2.9}$$

em que $\sigma_j(\nu)$ é a condutividade eléctrica à frequência ν, α_j é o coeficiente de absorção da fase *j* definido por $\alpha_j = (4\pi k_j / \lambda)$ e $\left\langle E_j^2 \right\rangle$ é a média quadrada da parte real do campo eléctrico (MSEF) (*mean square electric field*) no meio.

Quando a luz é reflectida numa superfície metálica figura 2.2, o vector campo eléctrico incidente, $\mathbf{E}_1^+$, combina-se com o vector campo eléctrico reflectido, $\mathbf{E}_1^-$ produzindo um campo eléctrico estacionário na superfície

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{E}_1^+ + \mathbf{E}_1^- \tag{2.10}$$

A amplitude (E_1) e consequentemente a intensidade da onda estacionária vão depender da polarização e do ângulo de incidência da luz.

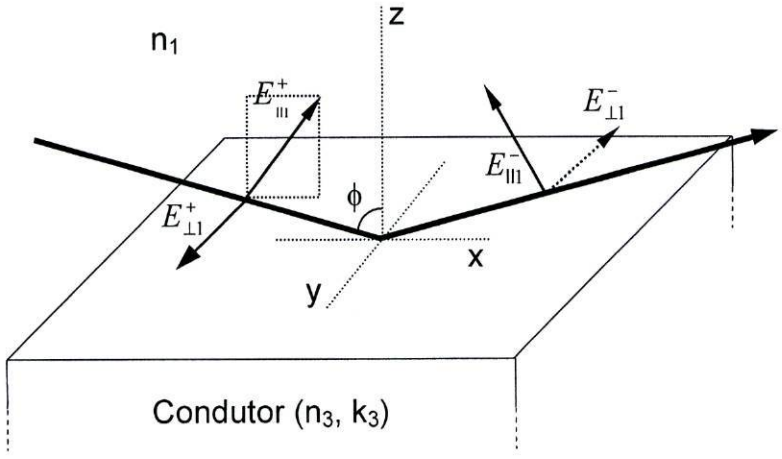


Figura 2.2: Reflexão na interface ar/condutor.

O vector campo eléctrico que se propaga da direcção negativa do eixo dos zz é representado pelo índice superior + e os que se propagam na direcção positiva pelo

índice superior -. Na fase metálica não há ondas reflectidas já que se trata duma fase semi-infinita. As amplitudes das resultantes que se propagam em cada uma das fases j são representadas por E_j^{0+} e E_j^{0-}.

Por definição, luz com o vector campo eléctrico orientado paralelamente ao plano de incidência (i.e o plano que contém as ondas incidente e reflectida) é denominada polarizada paralelamente e representada com o índice inferior p ou $\parallel$. Por outro lado, luz com o vector campo eléctrico perpendicular ao plano de incidência é representada pelos índices inferiores s ou $\perp$. Notar que para radiação polarizada p existem componentes paralelas e perpendiculares à superfície mas ambas estão sobre o plano de incidência. De acordo com o sistema de coordenadas da figura 2.2, $E_{\parallel 1}^{+} = E_{1x}^{+} + E_{1z}^{+} = E_1^{+}\cos\phi + E_1^{+}\sin\phi$. Para radiação polarizada perpendicularmente, por outro lado, o campo eléctrico permanece paralelo à superfície para todos os ângulos de incidência, $E_{\perp 1}^{+} = E_{1y}^{+}$. Equações análogas podem ser escritas para $E_{\parallel 1}^{-}$ e $E_{\perp 1}^{-}$.

Com a reflexão o estado de polarização do campo eléctrico não é afectado mas a amplitude e a fase variam. Os coeficientes de Fresnel, r_{jk}, quantificam as amplitudes das ondas reflectida e transmitida que emanam da interface e são derivados a partir das equações de Maxwell por aplicação das condições fronteira que requerem a continuidade das componentes tangenciais do campo eléctrico e magnético na interface entre duas fases contíguas:

$$r_{jk} = \frac{E_j^{0-}}{E_j^{0+}} \tag{2.11}$$

Os coeficientes de reflexão de Fresnel da interface entre as fases j e k para radiação polarizada perpendicularmente e paralelamente são dados por:

$$r_{\perp jk} = \frac{\mu_k \xi_j - \mu_j \xi_k}{\mu_k \xi_j + \mu_j \xi_k} \tag{2.12}$$

$$r_{\parallel jk} = \frac{\hat{\varepsilon}_k \xi_j - \hat{\varepsilon}_j \xi_k}{\hat{\varepsilon}_k \xi_j + \hat{\varepsilon}_j \xi_k} \tag{2.13}$$

onde

$$\xi_j = \hat{n}_j \cos\phi_j = \left(\hat{n}_j^2 - n_1^2 \sin^2 \phi_1\right)^{1/2} \tag{2.14}$$

Se a fase j for absorvente o ângulo ϕ_j é complexo.

As equações anteriores podem ser escritas na forma polar

$$r_{\perp jk} = \left|r_{\perp jk}\right| e^{i\delta_{\perp jk}} \tag{2.15}$$

$$r_{\parallel jk} = \left|r_{\parallel jk}\right| e^{i\delta_{\parallel jk}} \tag{2.16}$$

onde $\delta_{\perp jk}$ e $\delta_{\parallel jk}$ representam as variações de fase da radiação polarizada perpendicularmente e paralelamente, respectivamente, e são dadas por:

$$\delta_{jk} = \arg(r_{jk}) = \tan^{-1}\left[\frac{\mathrm{Im}(r_{jk})}{\mathrm{Re}(r_{jk})}\right] \tag{2.17}$$

A reflectância da interface, R_{jk}, definida como a razão entre os fluxos reflectido e incidente, é dada por:

$$R_{jk} = \left|r_{jk}\right|^2 = r_{jk} r_{jk}^* \tag{2.18}$$

2.3.2 Reflexão-absorção de radiação no infravermelho em superfícies de ouro

2.3.2.1 Cálculo da intensidade do campo eléctrico na interface ar/Au

Na figura 2.3 estão representadas as variações de fase em função do ângulo de incidência e polarização calculadas para reflexão dum feixe de luz monocromático na região do infravermelho ($\lambda = 5.6\,\mu\mathrm{m}, \mathrm{n}_{\mathrm{Au}} = 4.6, \mathrm{k}_{\mathrm{Au}} = 34.3$) na interface ar/Au.

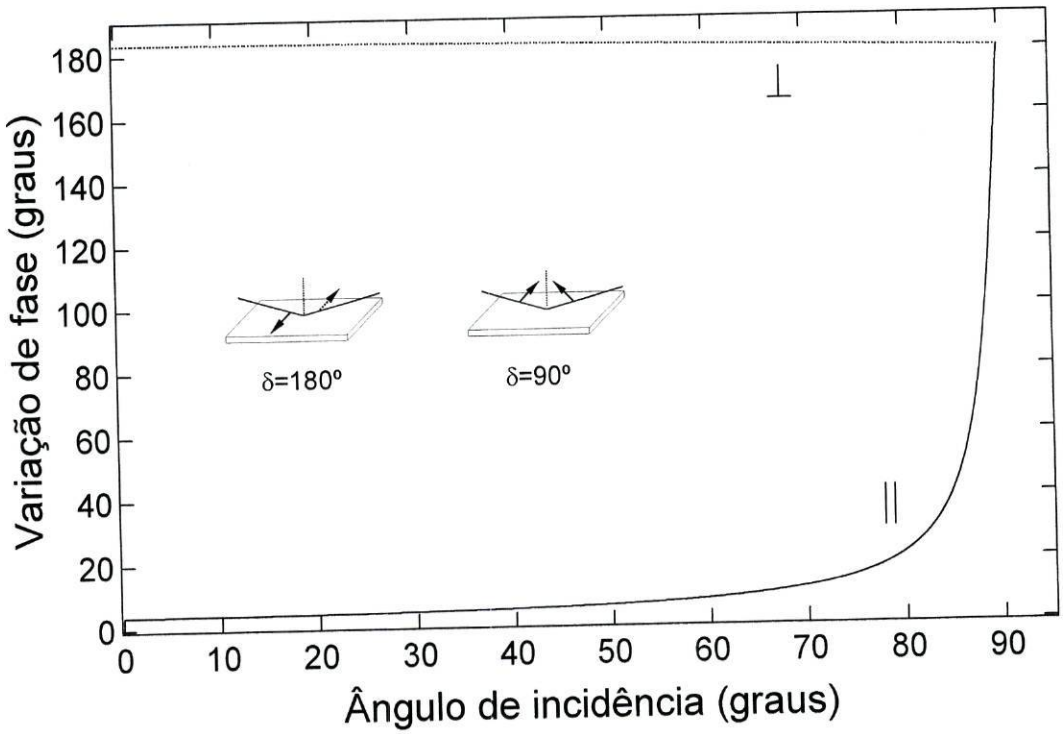


Figura 2.3: Variações de fase, δ, provocadas pela reflexão numa superfície de Au para um feixe de luz monocromático ($\lambda = 5.6\,\mu m$) em função do ângulo de incidência e da polarização da luz. As figuras inseridas ilustram a orientação do vector campo eléctrico para variações de fase de 180° e 90°.

Como se pode observar, a variação de fase para a radiação polarizada perpendicularmente (radiação *s*) é de aproximadamente 180° para todos os ângulos de incidência ao passo que $\delta_{\parallel}$ é pequeno exceptuando próximo da incidência rasante. Isto antecipa desde já que para luz polarizada *s* o campo eléctrico na superfície de Au seja practicamente nulo para qualquer ângulo de incidência, já que os vectores do campo eléctrico incidente e reflectido se cancelam. Por outro lado, e com base na variação de fase, a soma dos vectores do campo eléctrico da onda incidente e da onda reflectida para a componente paralela ao plano de incidência deve originar um vector campo eléctrico na superfície com grandeza mensurável.

A variação da reflectância com o ângulo de incidência e a polarização está representada na figura 2.4. Como se pode observar pouca energia é dissipada durante a reflexão de radiação infravermelha numa superfície de Au, a maior parte dela aparece na onda reflectida. Para ambas as polarizações a reflectância é elevada, independentemente do ângulo de incidência o que é característico dos metais.[20]

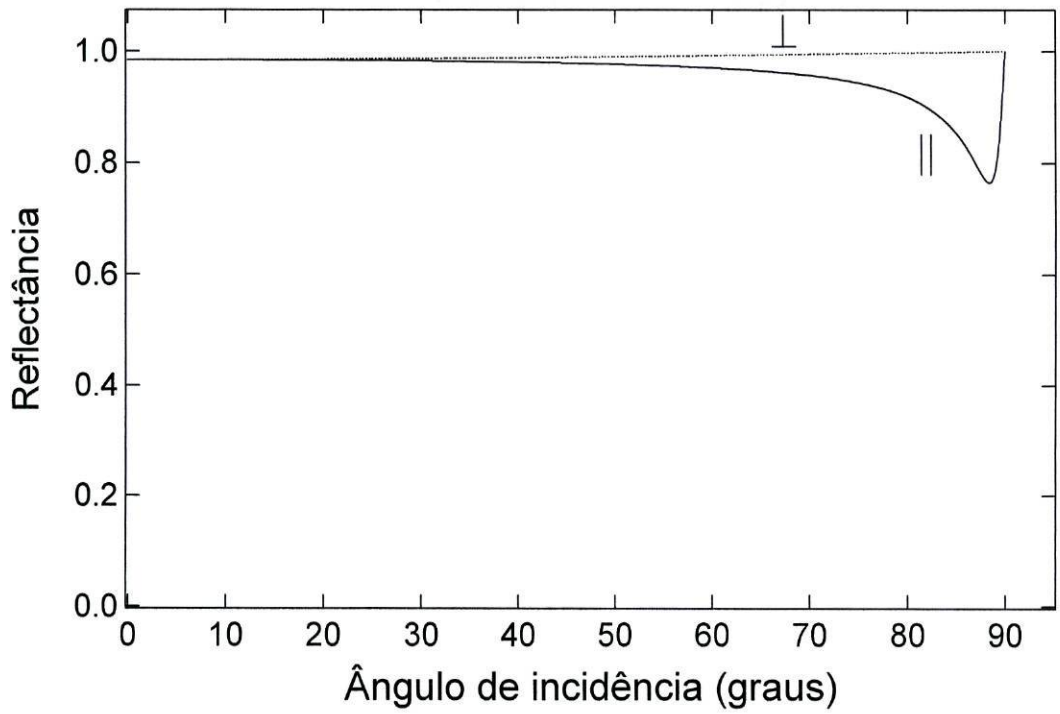


Figura 2.4: Reflectância da interface ar/Au a 5.6 μm em função do ângulo de incidência e da polarização da luz.

Uma vez conhecidos os valores dos coeficientes de Fresnel de reflexão e das variações de fase, a MSEF da onda estacionária na superfície pode ser calculada,[26]

$$\left\langle E_j^2 \right\rangle = \left\langle \left[\mathrm{Re}(\mathbf{E}_j) \right]^2 \right\rangle \tag{2.19}$$

obtendo-se,

$$\left\langle E_{\perp 1}^2 \right\rangle = \left\{ \frac{1}{2}(1+R_\perp) + R_\perp^{1/2} \cos\left[\delta_\perp - 4\pi \left(\frac{z}{\lambda} \right) \xi_1 \right] \right\} E_{\perp 1}^{+2} \tag{2.20}$$

$$\left\langle E_{1\mathrm{I}x}^2 \right\rangle = \cos^2 \phi_1 \left\{ \frac{1}{2}(1+R_\parallel) - R_\parallel^{1/2} \cos\left[\delta_\parallel - 4\pi \left(\frac{z}{\lambda} \right) \xi_1 \right] \right\} E_{\mathrm{I}1}^{+2} \tag{2.21}$$

$$\left\langle E_{1\mathrm{I}z}^2 \right\rangle = \sin^2 \phi_1 \left\{ \frac{1}{2}(1+R_\parallel) + R_\parallel^{1/2} \cos\left[\delta_\parallel - 4\pi \left(\frac{z}{\lambda} \right) \xi_1 \right] \right\} E_{\mathrm{I}1}^{+2} \tag{2.22}$$

A figura 2.5 mostra a forma dos padrões da onda estacionária calculados para luz ($\lambda = 5.6\,\mu m$) incidindo na interface ar/Au com um ângulo $\phi = 45°$. Observa-se que $\langle E^2_{\perp 1} \rangle$ e $\langle E^2_{III x} \rangle$ têm nodos na superfície ao passo que $\langle E^2_{III z} \rangle$ tem um antinodo, como seria de esperar tendo em conta as respectivas variações de fase. Também se observa que a distância do anti-nodo ao nodo adjacente para as componentes paralelas à superfície é de 19 432 Å, ou seja, muito superior à espessura duma monocamada (dezenas de angstrons). Esta distância aumenta com o ângulo de incidência (não mostrado).

Para a radiação polarizada paralelamente e cuja componente é perpendicular à superfície a razão $\langle E^2_{III z} \rangle / \langle E^{+2}_{III z} \rangle \big|_{z=0}$ pode atingir aproximadamente 4.0 a elevados ângulos de incidência, figura 2.6.

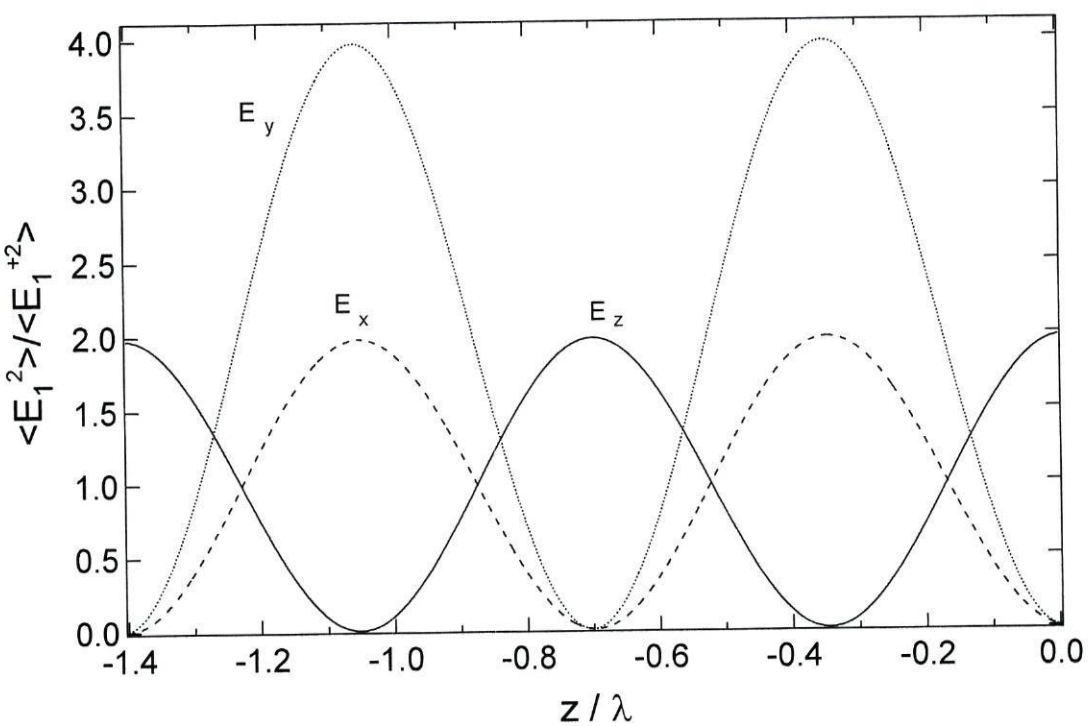


Figura 2.5: MSEFs da onda estacionária na interface ar/Au em função da distância à superfície, z, calculadas para luz monocromática, $\lambda = 5.6\,\mu m$ e para um ângulo de incidência, $\phi = 45°$.

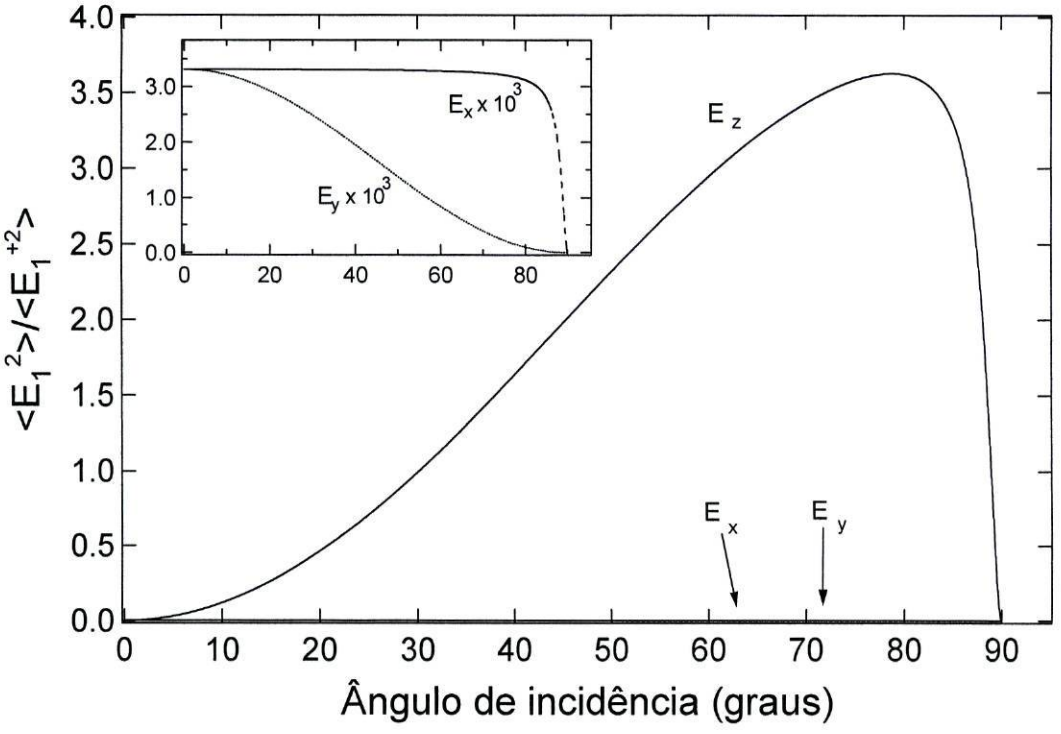


Figura 2.6: MSEFs da onda estacionária na superfície do Au em função do ângulo de incidência.

Como é óbvio a radiação só pode interactuar com um filme adsorvido se a amplitude do campo eléctrico for diferente de zero no filme (eq. 2.9). Assim sendo conclui-se que a capacidade da radiação polarizada *s* para produzir bandas de absorção, no caso de um filme com poucas dezenas de angstrons de espessura adsorvido numa superfície de Au, é praticamente nula qualquer que seja o ângulo de incidência. Pelo contrário para a radiação polarizada *p* a sensibilidade é consideravelmente aumentada quando se utilizam elevados ângulos de incidência já que ocorre um aumento da intensidade do campo eléctrico com orientação perpendicular à superfície, figura 2.6. A MSEF da onda na superfície chega a atingir 3.62 vezes a da onda incidente para $\phi = 79^{\circ}$.

Como a principal resultante do vector campo eléctrico na superfície têm orientação perpendicular à superfície (E_z) também se pode concluir que os modos vibracionais cujos momentos dipolares de transição tenham componentes orientadas perpendicularmente à superfície vão ser preferencialmente excitados, ou seja, além das condições enunciadas em 2.2, para que ocorra absorção no infravermelho por parte duma molécula adsorvida numa superfície de Au a molécula tem que possuir dipolos

orientados perpendicularmente à superfície. Esta condição é a chamada regra de selecção de superfície, observa-se para as superfícies metálicas[21-23, 25] e pode ser explorada para avaliar a orientação de moléculas simples na superfície.[27]

Quando se faz o mesmo tipo de análise para luz na região do ultravioleta-visível obtêm-se resultados bastante distintos, figuras 2.7 e 2.8. Em contraste com o que se passa no infravermelho as componentes tangenciais, $\langle E_{\perp 1}^2 \rangle$ e $\langle E_{\parallel 1x}^2 \rangle$ não exibem nodos na superfície, possuindo grandeza suficiente para interactuar com um filme adsorvido, o que aumenta consideravelmente a capacidade de detecção nesta gama de frequências em comparação com o infravermelho.[24] Não admira portanto que a espectroscopia de reflexão especular tenha sido aplicada com sucesso no UV-Vis bem antes do infravermelho.[28]

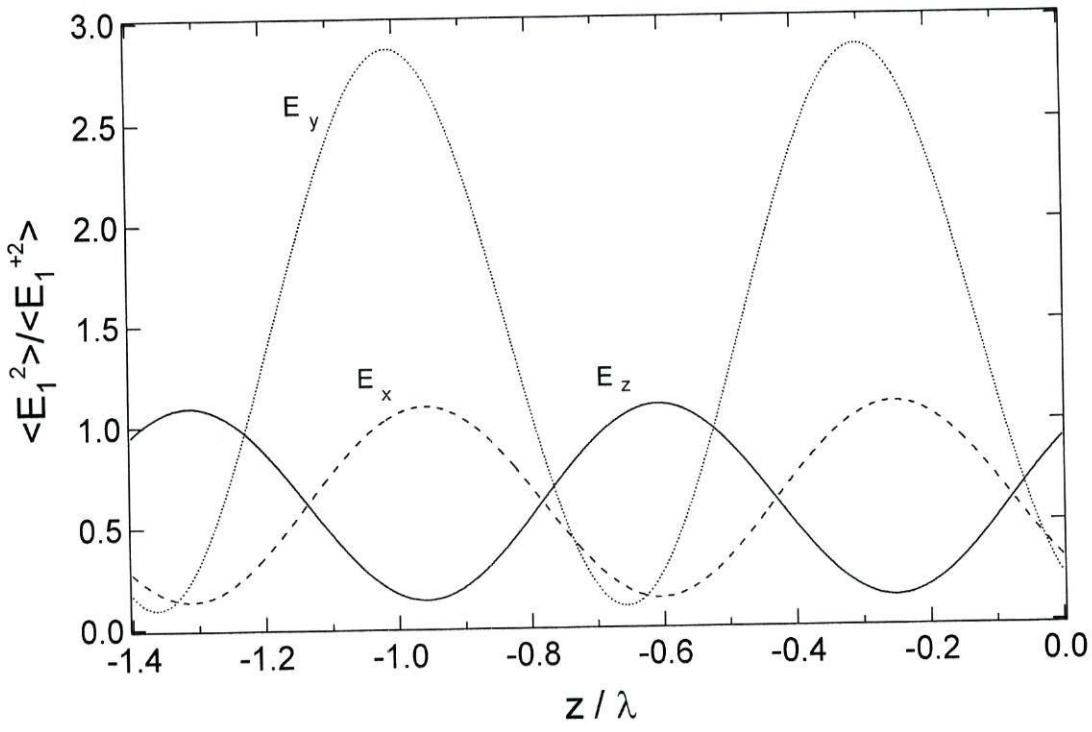


Figura 2.7: MSEFs da onda estacionária na interface ar/Au em função da distância à superfície calculadas para luz monocromática no UV-Vis, $\lambda = 0.354\,\mu m$, para um ângulo de incidência, $\phi = 45°$.

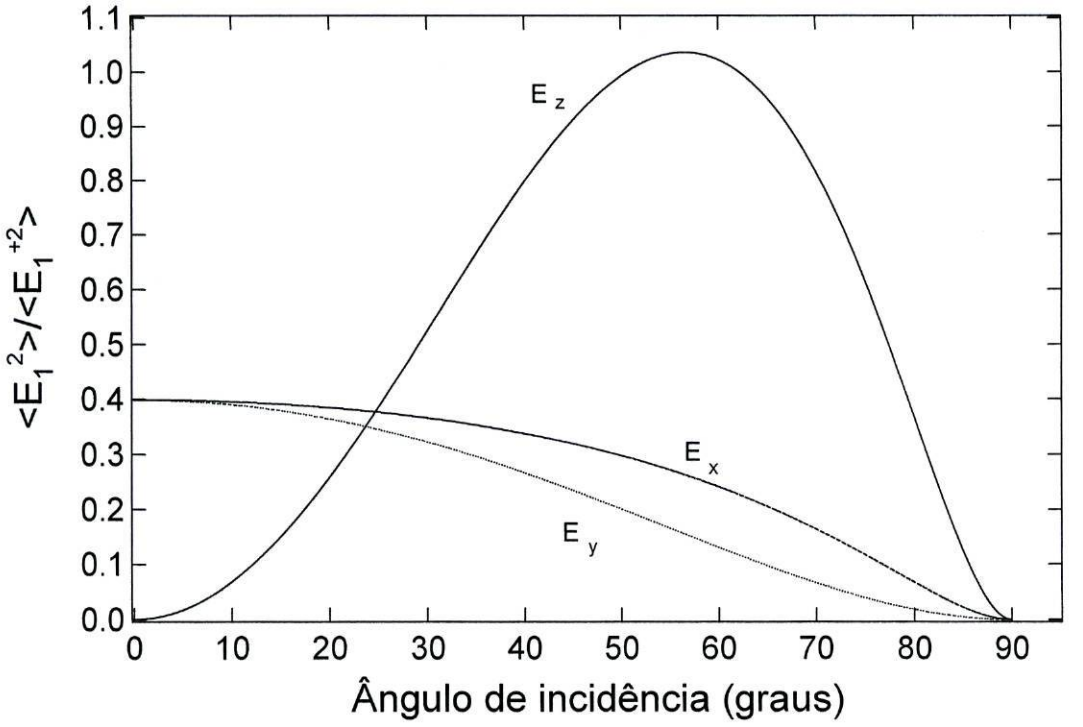


Figura 2.8: MSEFs da onda estacionária na superfície do Au ($z = 0$) para luz na região do UV-Vis em função do ângulo de incidência.

2.3.2.2 Cálculos de reflectância para o sistema ar/filme/Au

Os resultados anteriores permitem ter a noção da importância do ângulo de incidência e da polarização da luz para maximizar a sensibilidade em espectroscopia de reflexão usando radiação infravermelha. O campo eléctrico define a quantidade de energia que pode ser absorvida. As tendências anteriores mantêm-se quando sobre a superfície se adsorve um filme ultrafino $d << \lambda$ já que a variação de fase causada pelo filme é muito pequena e o campo é muito pouco atenuado pela presença do filme.[23, 24]

Experimentalmente o que se medem são absorvâncias de reflexão ou variações de reflectância normalizada interessando portanto, analisar o valor destas gandezas.

Na figura 2.9 representa-se esquematicamente a reflexão especular numa superfície metálica coberta por um filme adsorvido de espessura uniforme, d. Considera-se que as três fases são homogénas e isótropicas e que o ar e o metal são fases semi-infinitas. Todas as interfaces são planas e paralelas entre si. $\mathbf{E}_2^+$ é utilizado para representar a resultante instantânea da soma de todos os vectores campo eléctrico

de todas as ondas que se propagam, no filme, na direcção negativa do eixo dos zz e $\mathbf{E}_2^-$ a resultante de todas as ondas multirreflectidas que se propagam no filme na direcção oposta.

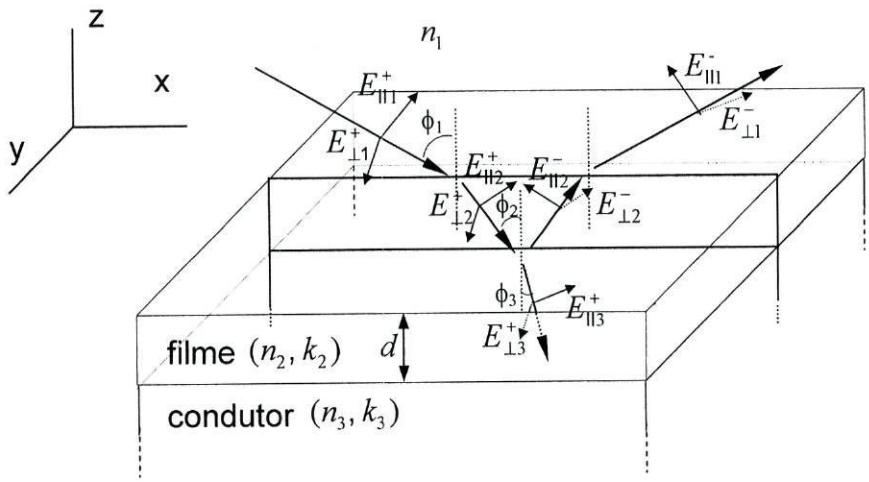


Figura 2.9: Modelo de três fases usado nos cálculos de reflectância no caso de uma superfície de Au coberta por um filme.

Os coeficientes de reflexão de Fresnel para um sistema multifásico são definidos por analogia com o sistema de duas fases como a razão das amplitudes das ondas incidente e reflectida na primeira fase transparente. Para um sistema de três fases: ar(1)/filme(2)/substracto(3), o coeficiente de Fresnel de reflexão é dado por[26]

$$r_{123} = \frac{E_1^{0-}}{E_1^{0+}} = \frac{r_{12} + r_{23} e^{2i\beta}}{1 + r_{12} r_{23} e^{2i\beta}} \tag{2.23}$$

onde β é uma quantidade complexa que representa a variação de fase e amplitude do feixe devido ao atravessamento do filme de espessura d

$$\beta = \frac{2\pi \hat{n}_2 d \cos\phi_2}{\lambda} \tag{2.24}$$

consequentemente a reflectância do sistema de três fases é dada por :

$$R_{123} = |r_{123}|^2 = \frac{R_{12} + R_{23}e^{-4\,\mathrm{Im}\,\beta} + 2R_{12}^{1/2}R_{23}^{1/2}e^{-2\,\mathrm{Im}\,\beta}\cos(\delta_{12} - \delta_{23} + 2\,\mathrm{Re}\,\beta)}{1 + R_{12}R_{23}e^{-4\,\mathrm{Im}\,\beta} + 2R_{12}^{1/2}R_{23}^{1/2}e^{-2\,\mathrm{Im}\,\beta}\cos(\delta_{12} + \delta_{23} - 2\,\mathrm{Re}\,\beta)} \tag{2.25}$$

Como a reflectância do sistema de duas fases (ar/substracto), R_{13}, é idêntica à do sistema de três fases em que $d = 0$ pode escrever-se $R_{13} = R(0)$ e $R_{123} = R(d)$ e definir uma absorvância de reflexão como,

$$A_R = -\log\left[\frac{R(d)}{R(0)}\right] \tag{2.26}$$

A figura 2.10 mostra a variação desta grandeza com o ângulo de incidência, polarização da luz e espessura do filme.

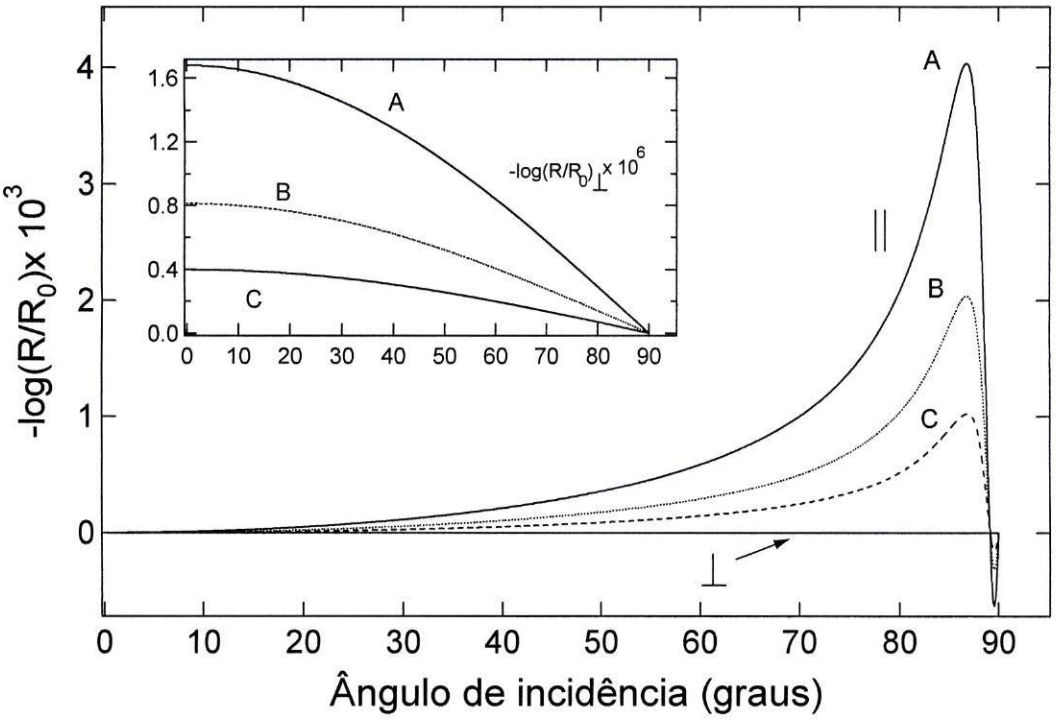


Figura 2.10: Absorvância de reflexão teórica em função do ângulo de incidência e da polarização da luz para várias espessuras dum filme numa superfície de Au. $\lambda = 5.6\,\mu\mathrm{m}$, $n_2 = 1.3$, $k_2 = 0.1$, (d/λ) : 0.00001 (curva A), 0.0002 (curva B) e 0.0004 (curva C).

Em conformidade com a análise anterior relativa ao campo eléctrico da onda estacionária na superfície de Au, a sensibilidade para a detecção do filme para radiação p aumenta exponencialmente com o ângulo de incidência, ϕ_1, atingindo um máximo a 86.8°. Por exemplo, $-\log(R/R_0)_{\parallel}$ é 2517 vezes maior a 86.8° que a incidência normal para $(d/\lambda) = 0.0002$ (curva B). Por outro lado os valores de $-\log(R/R_0)_{\perp}$ decrescem monotonicamente de 8.10×10^{-7} a 0° até 4.52×10^{-8} a incidência quase rasante. Este valor é menor que o valor de $-\log(R/R_0)_{\parallel}$ de um factor de 4.5×10^{4} !
Na figura também se mostra que a variação de $-\log(R/R_0)$ é praticamente linear com a d/λ. Na realidade esta dependência desvia-se da linearidade para filmes espessos.[9]

Estes cálculos permitem ter a noção das variações mínimas em questão na medição do espectro de reflexão no infravermelho. Mesmo no ângulo de incidência óptimo a absorvância de reflexão é somente 2.0×10^{-3} para uma banda considerada de média intensidade no infravermelho ($k_2 = 0.1$) e para um filme com 1.12 nm de espessura. Na prática ângulos de incidência acima de 80° são difíceis de implementar devido à divergência do feixe e tamanho da amostra o que significa que há que contar com bandas ainda menos intensas, da ordem de 10^{-4}. No UV-Vis as bandas são usualmente uma ordem de grandeza superiores.[24]

As figuras seguintes ilustram a dependência da absorvância de reflexão das propriedades ópticas do substracto (n_3, k_3), e propridades ópticas do filme (n_2, k_2).

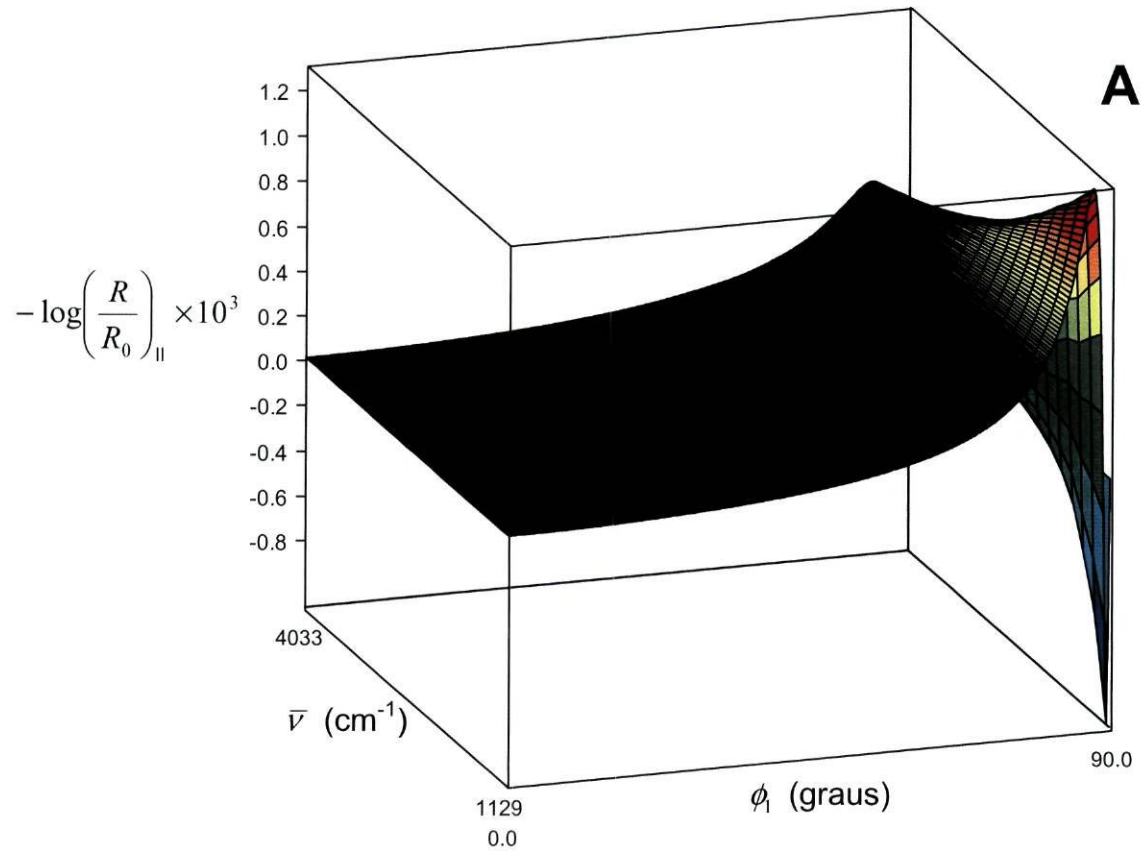
A figura 2.11 mostra a variação de $-\log(R/R_0)_{\parallel}$ e $-\log(R/R_0)_{\perp}$ com o ângulo de incidência para um filme sobre uma superfície de Au no intervalo de comprimentos de onda entre 4033 e 1129 cm^{-1}. As constantes ópticas para cálculo das reflectâncias representadas foram retiradas da referência 29. Como se pode verificar, para todos os comprimentos de onda, o valor de $-\log(R/R_0)_{\parallel}$ aumenta com o ângulo de incidência atingido um máximo a elevados ângulos de incidência. O ângulo a que é atingido este máximo não varia muito (84.6° para $\bar{\nu} = 4033\,cm^{-1}$, 87.5° para $\bar{\nu} = 1129\,cm^{-1}$). Para números de onda mais baixos, além do máximo começa a aparecer um mínimo para ângulos de incidência superiores a 88°, a presença do filme produz um aumento da reflectância originando uma banda de "emissão". Para o ângulo de incidência correspondente ao máximo observa-se que o valor de $-\log(R/R_0)_{\parallel}$ aumenta

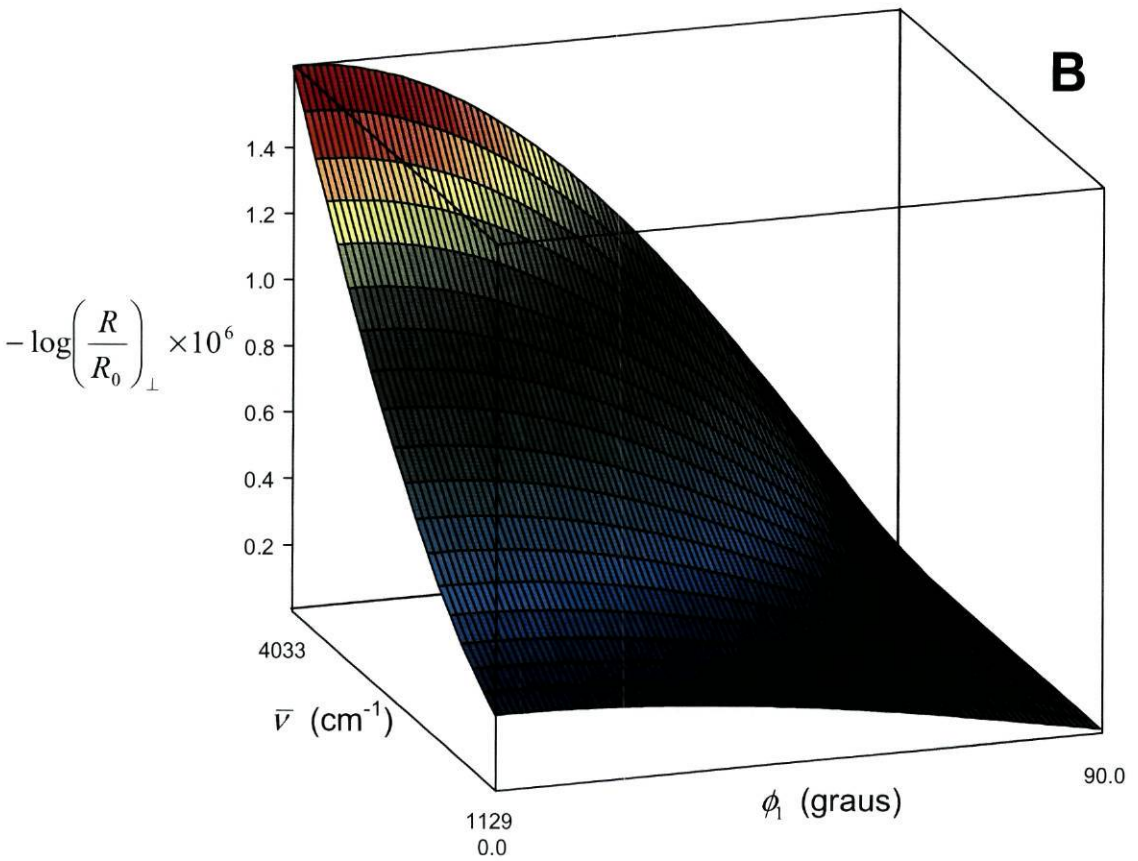
ligeiramente com a diminuição do número de onda ($-\log(R/R)_{II}|_{4033} = 0.0005$, $-\log(R/R_0)_{II}|_{1129} = 0.0013$). As figuras 2.12 e 2.13 ilustram a variação da absorvância de reflexão em função do índice de refracção, n_2, e coeficiente de extinção do filme, k_2. Para ambas as constantes os maiores valores de $-\log(R/R_0)_{II}$ são atingidos para ângulos de incidência elevados. Para valores de n_2 compreendidos entre 1.2 e 2.2 há inversão do sinal de $-\log(R/R_0)_{II}$. As curvas exibem um máximo seguido de um mínimo a ângulos mais elevados separados de 3 ou 4 graus. É também neste intervalo que os valores de $|-\log(R/R_0)_{II}|$ são menores. $|-\log(R/R_0)_{II}|$ decresce acentuadamente com n_2 entre 1.0 e 1.6. A partir de $n_2 = 2.4$, $-\log(R/R_0)_{II}$ passa a ser praticamente insensível a variações em n_2. A variação de $-\log(R/R_0)_{II}$ com o coeficiente de extinção do filme no intervalo analisado, $0.0 < k_2 < 1.5$, não é monótona. O valor absoluto da absorvância de reflexão cresce com k_2 atingindo um valor máximo próximo de $k_2 = 0.7$.

Independentemente dos valores das constantes ópticas do substracto ou filme pode constatar-se que a radiação *s* no infravermelho não tem qualquer sensibilidade para detectar filmes ultrafinos numa superfície de ouro.

Na página seguinte:

Figura 2.11: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme ($d/\lambda = 0.0001$) sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do número de onda. As constantes ópticas do filme são $n_2 = 1.3$ e $k_2 = 0.1$. Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*.


A
$-\log\left(\frac{R}{R_0}\right)_{\parallel} \times 10^3$
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
4033
$\bar{\nu}$ (cm^{-1})
1129
0.0
ϕ_1 (graus)
90.0


B
$-\log\left(\frac{R}{R_0}\right)_{\perp} \times 10^6$
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
4033
$\bar{\nu}$ (cm^{-1})
1129
0.0
ϕ_1 (graus)
90.0

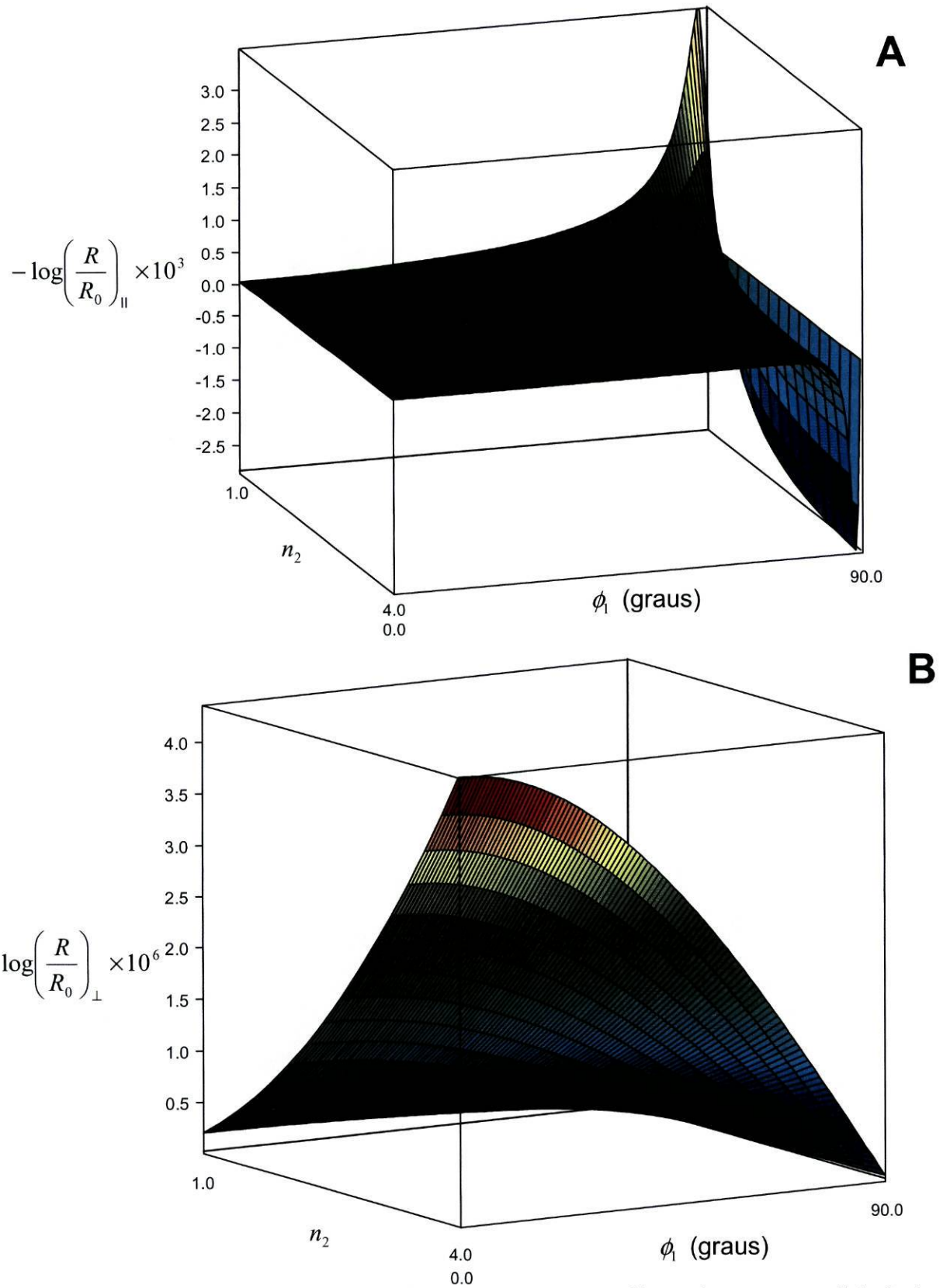


Figura 2.12: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do índice de refracção do filme ($\lambda = 5.6\,\mu\text{m}$, $d/\lambda = 0.0001$, $k_2 = 0.1$). Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*.

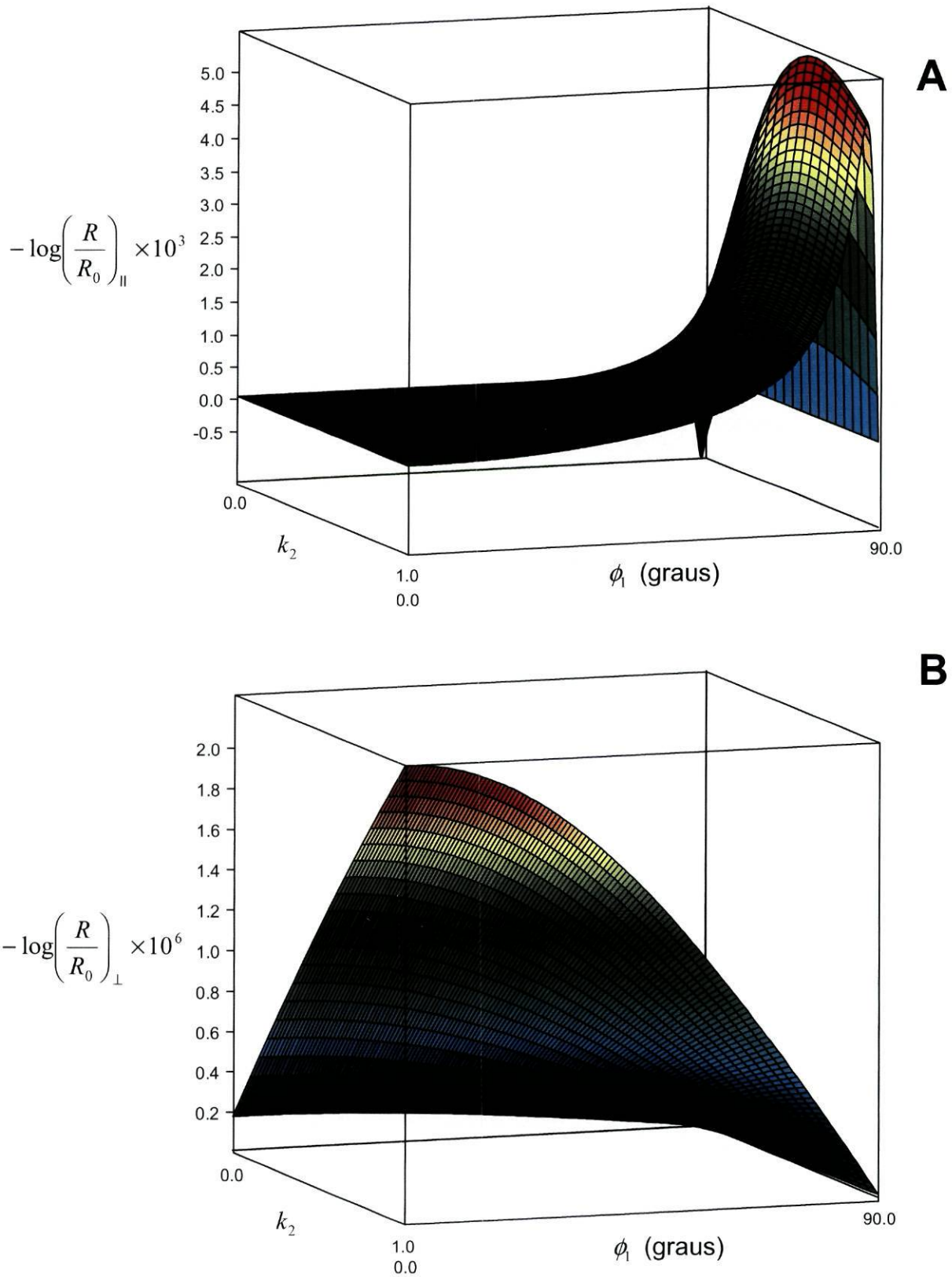


Figura 2.13: Absorvâncias de reflexão teóricas para um filme sobre uma superfície de Au em função do ângulo de incidência e do coeficiente de extinção do filme ($\lambda = 5.6\,\mu\text{m}$, $d/\lambda = 0.0001$, $n_2 = 1.3$). Figura (A) polarização *p*, figura (B) polarização *s*.

2.3.3 Comparação entre transmissão e reflexão

A comparação entre a reflexão especular e a transmissão pode ser feita da seguinte forma. Imaginando a situação em que temos o filme isolado do substracto e suspenso no vazio (meios 1 e 3 são o vazio), a transmitância do filme é dada por,[26]

$$T_{123\perp} = \frac{\mu_1 \operatorname{Re}\xi_3}{\mu_3 \xi_1} |t_{E\perp}|^2 = \tag{2.27}$$

$$= \frac{\mu_1 \operatorname{Re}\xi_3}{\mu_3 \xi_1} \frac{|t_{\perp 12}|^2 |t_{\perp 23}|^2 e^{-2\operatorname{Im}\beta}}{1 + R_{\perp 12} R_{\perp 23} e^{-4\operatorname{Im}\beta} + R_{\perp 12}^{1/2} R_{\perp 23}^{1/2} e^{-2\operatorname{Im}\beta} 2\cos(\delta_{\perp 23} + \delta_{\perp 12} + 2\operatorname{Re}\beta)}$$

para a polarização *s* e

$$T_{123\parallel} = \frac{\mu_3 \operatorname{Re}(\xi_3 / \hat{n}_3^{\,2})}{\mu_1 \cos\phi_1 / n_1} |t_{H\parallel}|^2 = \tag{2.28}$$

$$= \frac{\mu_3 \operatorname{Re}(\xi_3 / \hat{n}_3^{\,2})}{\mu_1 \cos\phi_1 / n_1} \frac{|t_{\parallel 12}|^2 |t_{\parallel 23}|^2 e^{-2\operatorname{Im}\beta}}{1 + R_{\parallel 12} R_{\parallel 23} e^{-4\operatorname{Im}\beta} + R_{\parallel 12}^{1/2} R_{\parallel 23}^{1/2} e^{-2\operatorname{Im}\beta} 2\cos(\delta_{\parallel 23} + \delta_{\parallel 12} + 2\operatorname{Re}\beta)}$$

para polarização *p*. Onde os coeficientes de Fresnel de transmissão, $t_{\perp jk}$, $t_{E\perp}$, $t_{\parallel jk}$ e $t_{H\parallel}$ são dados por

$$t_{\perp jk} = \frac{2\mu_k \xi_j}{\mu_k \xi_j + \mu_j \xi_k} \tag{2.29}$$

$$t_{E\perp} = \frac{t_{\perp 12} t_{\perp 23} e^{i\beta}}{1 + r_{\perp 12} r_{\perp 23} e^{2i\beta}} \tag{2.30}$$

$$t_{\parallel jk} = \frac{2\hat{\varepsilon}_k \xi_j}{\hat{\varepsilon}_k \xi_j + \hat{\varepsilon}_j \xi_k} \tag{2.31}$$

$$t_{H\parallel} = \frac{t_{\parallel 12} t_{\parallel 23} e^{i\beta}}{1 + r_{\parallel 12} r_{\parallel 23} e^{2i\beta}} \tag{2.32}$$

A absorvância de transmissão define-se como

$$A_T = -\log T \tag{2.33}$$

Na figura 2.14 está representada a razão A_R / A_T em função do ângulo de incidência e da polarização da luz.

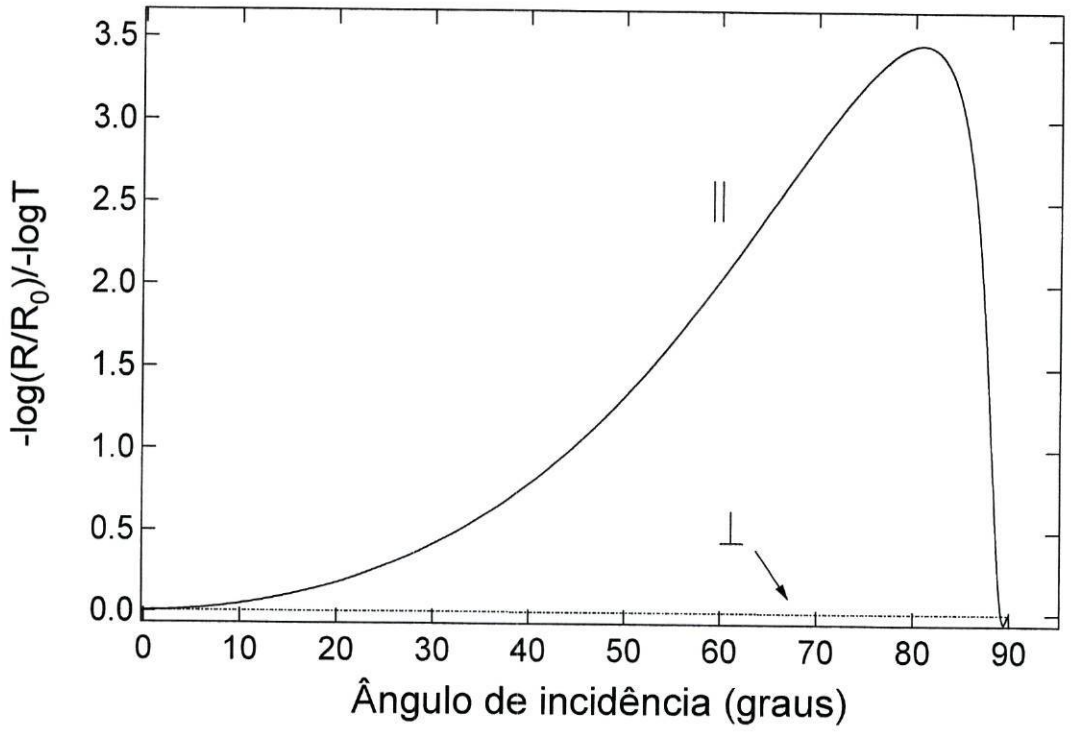


Figura 2.14: Razão entre as absorvâncias de reflexão e transmissão teóricas em função do ângulo de incidência ($\lambda = 5.6\,\mu\text{m}$, $n_2 = 1.3$, $k_2 = 0.1$, $(d/\lambda) = 0.0002$).

Como se pode observar para $44.4° < \phi_1 < 88.1°$, a reflexão é mais sensível que a transmissão para detectar a absorção por parte do filme. Se compararmos a absorvância de transmissão medida a 0° com a da reflexão especular a 86.8° verifica-se que esta última técnica de medição consegue ser 14.3 vezes mais sensível que a transmissão.

2.3.4 Condições de máxima detectibilidade na experiência de IRRAS

Da análise anterior pode concluir-se que a medição do espectro de infravermelho de monocamadas de moléculas adsorvidas em superfícies de Au usando reflexão especular é, em teoria, possível mas é necessário detectar variações mínimas de reflectância. As condições de máxima sensibilidade ditadas pela Física do fenómeno são:

- utilização de radiação polarizada *p*;
-e elevados ângulos de incidência;

A implementação da experiência que visa a obtenção do espectro de infravermelho dum filme situado numa superfície de Au tem que ter estas condições em consideração.

Na secção seguinte descrevem-se os detalhes da montagem experimental utilizada nas medições de FT-IRRAS apresentadas nesta dissertação e que requereu a modificação de um espectrofotómetro FT-IR comercial para fazer reflexão especular. Nem todos os FT-IRs são, à partida, adequados para esta experiência. A detecção de absorvâncias da ordem do 10^{-4} exige boas fontes (elevada emissividade e estabilidade) e detectores extremamente sensíveis, bons conversores A/D, técnicas de aumento da razão sinal/ruído e metodologias para evitar que as bandas do filme sejam completamente ofuscadas pelas bandas intensas do ar (devidas ao vapor de água e ao CO_2).

É igualmente essencial um sistema óptico que minimize as perdas de radiação no trajecto entre a fonte e o detector. Os feixes à saída dos interferómetros dos espectrofotómetros de transmissão têm vários centímetros de diâmetro e têm uma distância focal curta, o que dificulta de sobremaneira a sua manipulação.

2.4 Montagem experimental para FT-IRRAS

Na figura 2.15 é representado esquematicamente o sistema óptico construído para as medições de FT-IRRAS. Na figura 2.16 são apresentadas fotografias da montagem experimental.

O sistema óptico é composto pelas secções da fonte e interferómetro de um espectrofotómetro Perkin-Elmer System 2000 FT-IR e por uma parte externa. O feixe proveniente do interferómetro foi desviado do trajecto de transmissão, onde apresenta um diâmetro no ponto de focagem de aproximadamente 15 mm, por um espelho plano com uma camada reflectora de Au (JanosTech), M1, e colimado por um espelho parabólico descentrado 45° (M2) (REFL = 238.7 mm, JanosTech). Um segundo espelho parabólico descentrado 90° (M3) (REFL = 152.4 mm, JanosTech) é utilizado para focar o feixe através de um polarizador de CaF_2 grelha metálica (Specac) antes de incidir na amostra com um ângulo de incidência de aproximadamente 77°. O suporte para a amostra foi fabricado em alumínio (oficina de mecânica do Departamento de Física da FCUP). Este suporte e o tubo de Teflon usado para fixar a amostra estão representados na figura 2.17. O polarizador está orientado de forma a deixar passar somente a componente *p* de radiação. Conforme foi mostrado na secção 2.3 a componente *s* não pode ser adsorvida por um filme ultrafino na superfície de ouro e só serviria para saturar o conversor A/D com ruído.

Após incidir na amostra o feixe divergente é focado usando uma lente biconvexa de BaF_2 (L1) (EFL = 50 mm, JanosTech) no elemento sensível com 1×1 mm de área de um detector MCT (HgCdTe) de banda estreita (Infrared Associates) arrefecido a 77 K. Este detector proporciona uma elevada sensibilidade no infravermelho médio.[5] O sinal detectado é enviado para o FT-IR para ser amplificado, digitalizado e transformado.

A área do trajecto óptico é mantida sob uma atmosfera isenta de vapor de água e CO_2 mediante a canalização de ar comprimido da rede do departamento através de um sistema MTI-Puregas modelo CDA (figura 2.18) para o interior da caixa de vidro acrílico (Unilux) que cobre todo o sistema óptico. Desta forma a absorção por parte do vapor de água e CO_2 é minimizada e o polarizador de CaF_2 e a lente de BaF_2 são protegidos. Para minimizar vibrações que desalinhariam a óptica interna do interferómetro e para tornar a montagem robusta, o sistema óptico foi montado sobre uma mesa óptica (Newport). Alguns dos suportes para os espelhos e lentes foram

adquiridos à empresa de material óptico Eksma (Vilnius, Lituânia) outros foram fabricados na oficina de mecânica do Departamento de Física da FCUP.

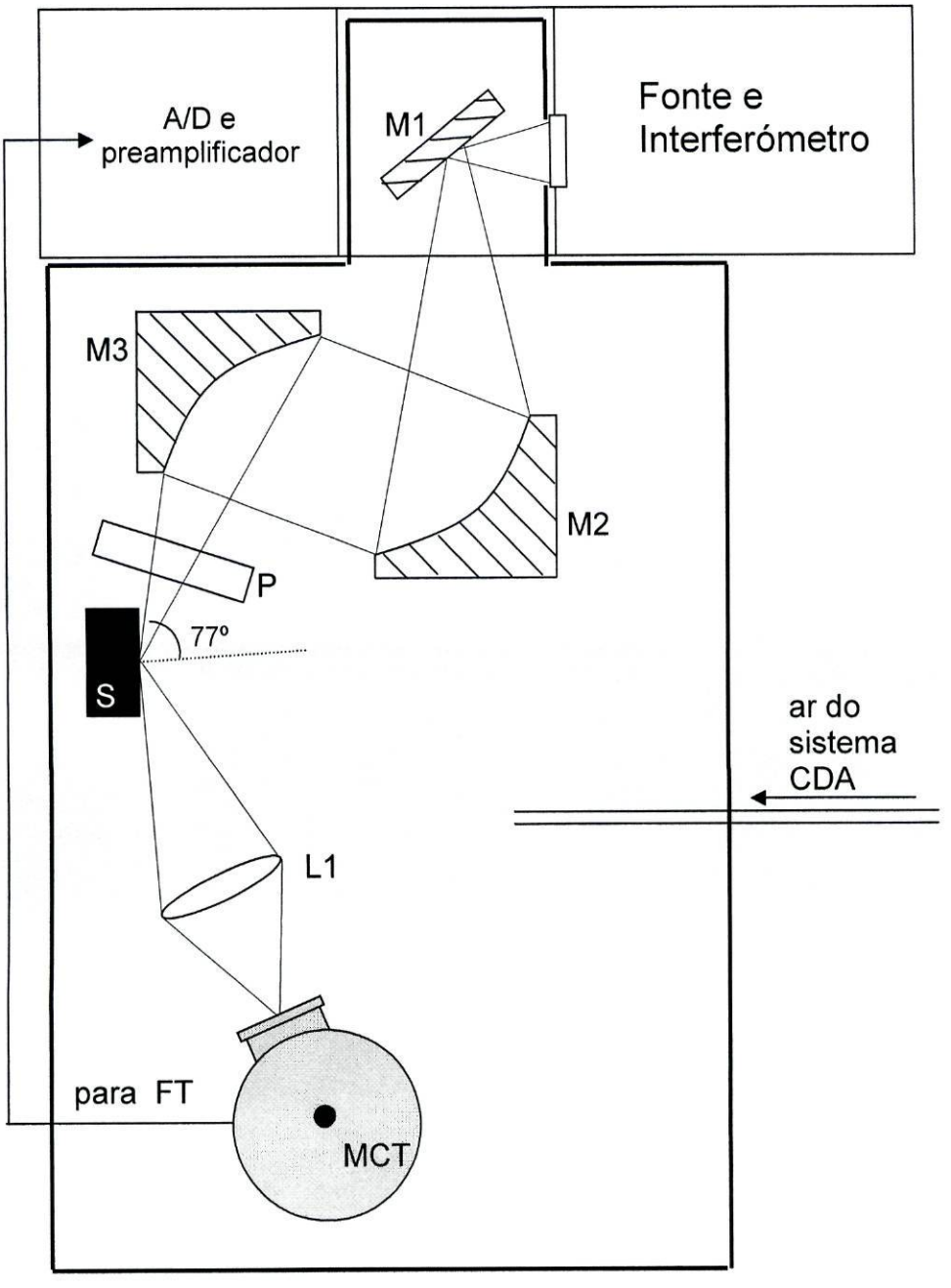


Figura 2.15: Representação esquemática do sistema óptico construído para as medições de FT-IRRAS.

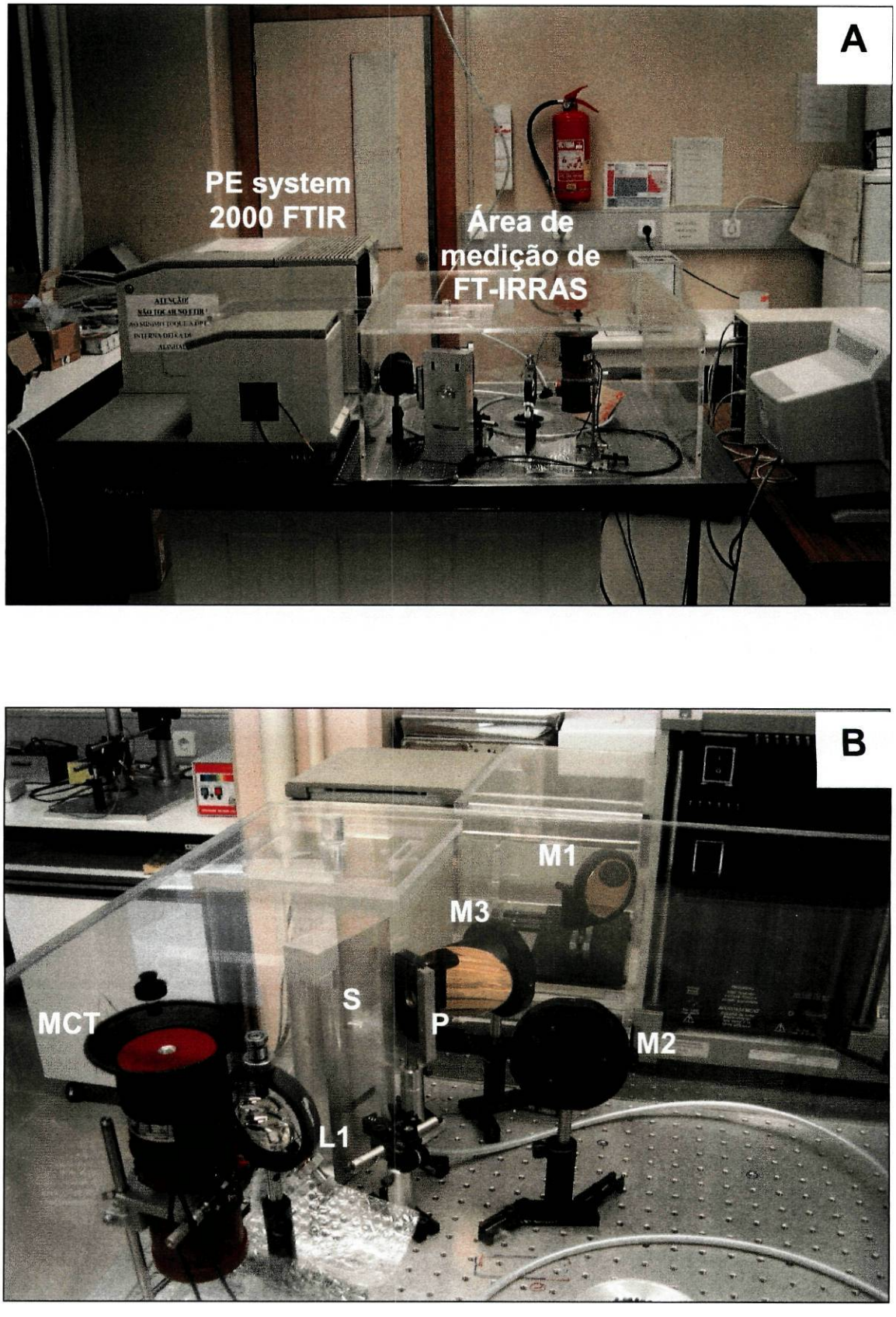


Figura 2.16: Fotografias do sistema óptico instalado para as medições de FT-IRRAS.

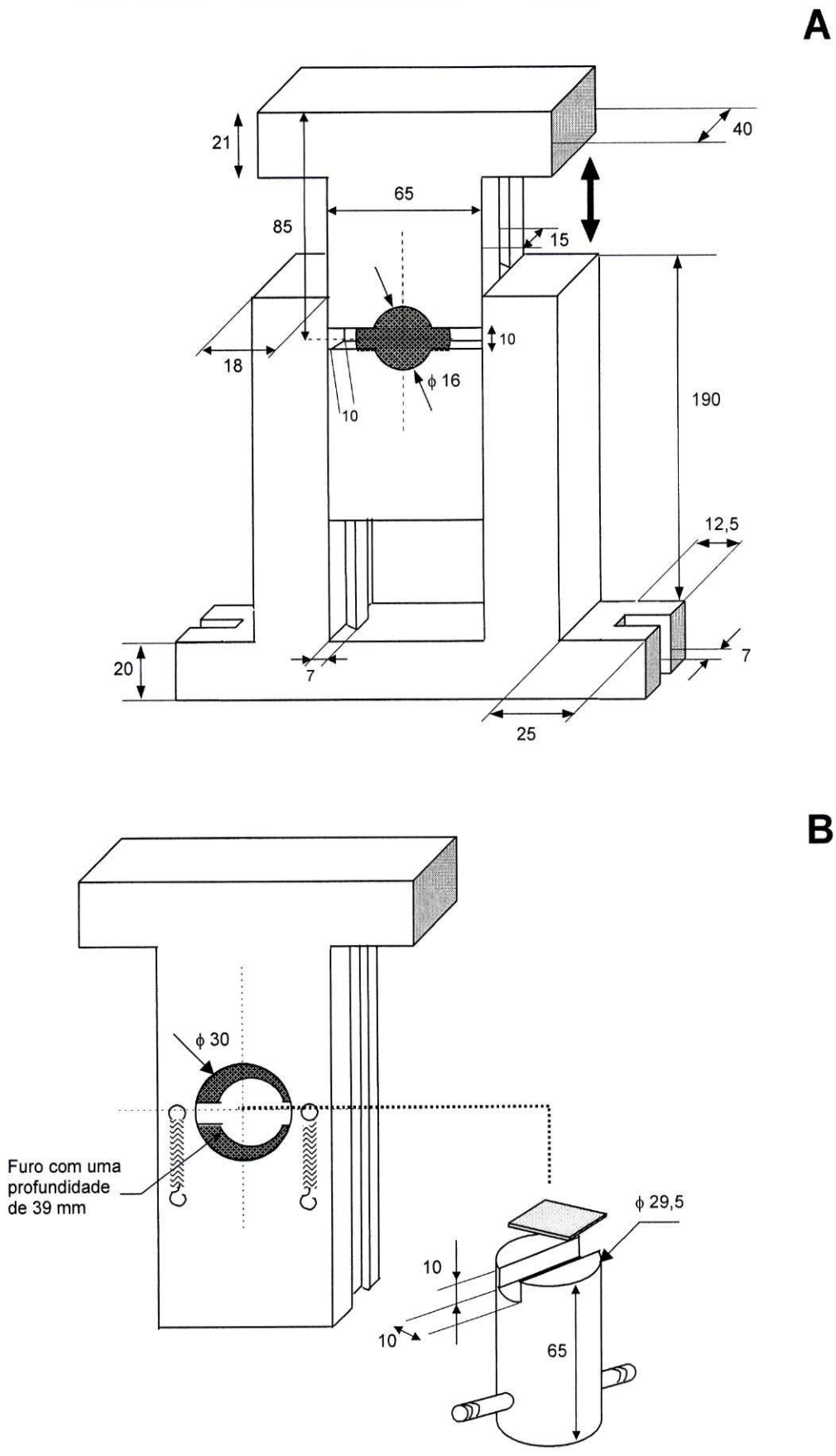


Figura 2.17: (A) Desenho do suporte para as amostras visto de frente. (B): Desenho do suporte para as amostras visto de trás e do tubo de Teflon utilizado para fixar a amostra.

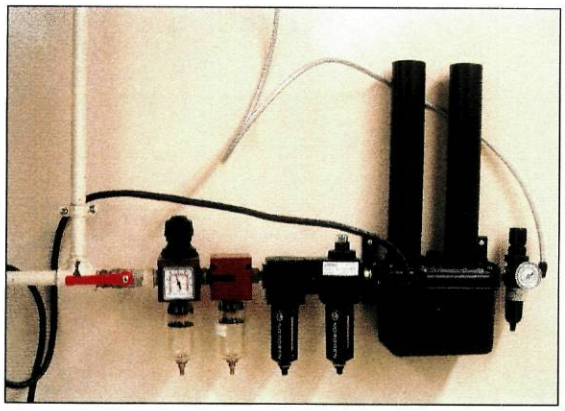


Figura 2.18: Sistema CDA utilizado no tratamento do ar do trajecto óptico.

Os exemplos seguintes ilustram a capacidade do sistema FT-IRRAS instalado para analisar superfícies de Au modificadas. Caso nada seja dito em contrário, em cada medição tomou-se como superfície de referência (branco) um slide de ouro não modificado e limpo conforme é descrito na secção experimental. Os espectros do branco correspondem à média de 200 varrimentos. Os espectros da amostra correspondem à média de aproximadamente 1000 varrimentos. Cada espectro foi medido com uma resolução de 4 cm^{-1} com apodização triângular.

Na figura 2.19 estão representados os espectros na região 800-4500 cm^{-1} correspondentes a uma superfície de Au modificada com um SAM de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), após lavagem da superfície modificada com água Millipore (espectro A) ou com tampão borato pH 9 (espectro B). Os espectros demonstram a capacidade do sistema para distinguir bandas devidas a uma monocamada de moléculas, com intensidades da ordem do 10^{-4} u.a.. Os espectros são idênticos aos publicados por outros investigadores para esta monocamada automontada.[30] Como se pode constatar, apesar do esforço para manter uma atmosfera de composição constante dentro da área de medição através da canalização de ar comprimido proveniente do sistema CDA, o vapor de água e o CO_2 acabam inevitavelmente por ser reintroduzidos na área de medição sempre que se procede à colocação do branco ou amostra no trajecto óptico e constituem a principal fonte de ruído na medição de bandas com esta intensidade. O principal problema são mesmo as bandas rotação-vibração da água centradas próximo dos 3750 cm^{-1} e 1650 cm^{-1}.

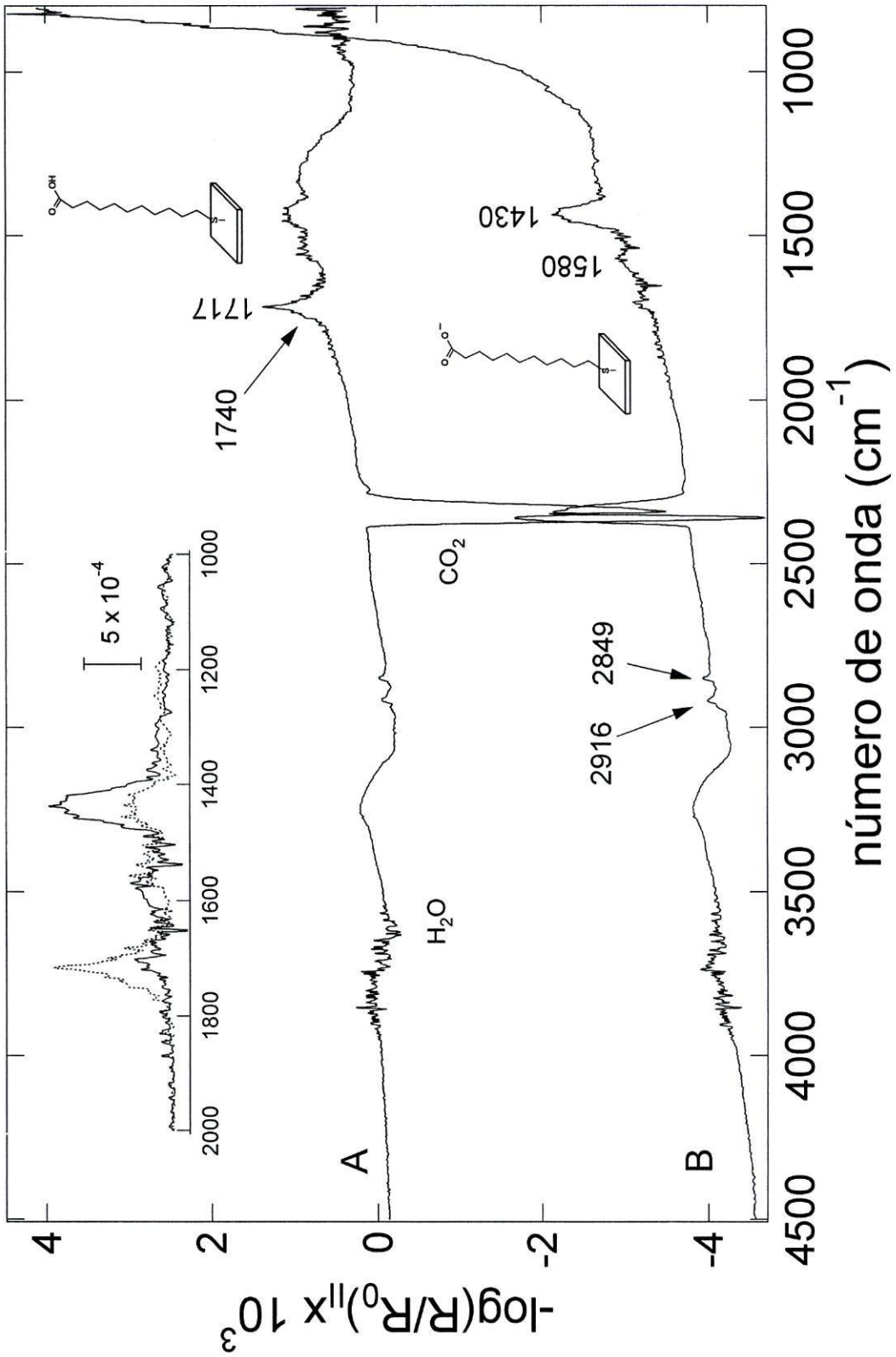


Figura 2.19: Espectros de FT-IRRAS de uma superfície de Au modificada com um SAM de MUA.

Os espectros obtidos fornecem informação ao nível molecular. Como se pode observar a bandas mais intensas medidas após lavagem da superfície com água Millipore (pH ~ 6) são as bandas características dos ácidos carboxílicos na forma protonada a 1717 cm^{-1} e 1740 cm^{-1}. As bandas características do grupo COO^- e que aparecem a 1580 cm^{-1} (*stretching* assimétrico) e 1430 cm^{-1} (*stretching* simétrico) são bastante menos intensas.

Estas observações indicam que após lavagem com água Millipore a maior parte dos grupos ω-COOH da monocamada de MUA se encontram protonados. O aparecimento de duas bandas na região do *stretching* CO dos grupos carboxilo deve-se à existência de dois tipos de grupos carboxilo: os que formam dímeros com grupos adjacentes devido ao estabelecimento de pontes de hidrogénio (figura 2.20) e os grupos livres. Como a formação de ligações de hidrogénio é geralmente responsável pelo deslocamento das bandas para números de onda mais baixos, a banda a 1717 cm^{-1} é atribuída ao *stretching* CO dos grupos carboxilo envolvidos em ligações de hidrogénio e a banda a 1740 cm^{-1} ao *stretching* CO dos grupos carboxilo livres.[31]

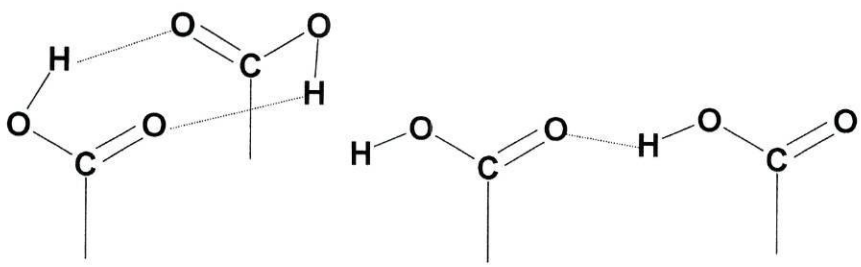
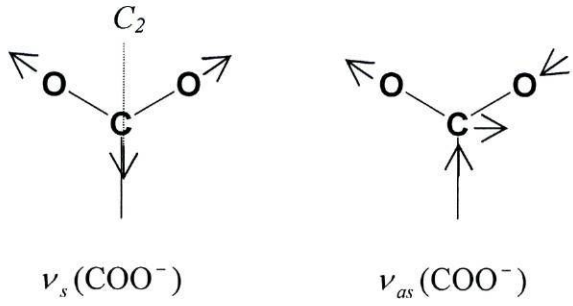


Figura 2.20: Possíveis estruturas formadas pelas moléculas do SAM de MUA devido ao estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos carboxilo.

O equílibrio ácido-base desloca-se no sentido da forma desprotonada após lavagem com tampão borato pH 9 (preparado com ácido bórico e NaOH) como se revela no espectro B. A maior parte dos grupos carboxilo são, provavelmente, convertidos em carboxilatos de sódio. A figura inserida (obtida após correcção de linha de base usando o software Grams/386 (Galactic Industies)) permite visualizar claramente as alterações. A diferença de intensidade das bandas correspondentes ao *stretching* assimétrico (1580 cm^{-1}) e simétrico (1430 cm^{-1}) dos grupos carboxilato

(espectro B) pode explicar-se com base na regra de selecção de superfície se os grupos estiverem predominantemente orientados com os seus eixos de simetria C_2 perpendiculares à superfície, figura 2.21. A atribuição de todas as bandas é feita na tabela 2.1.



$\nu_s(COO^-)$ $\nu_{as}(COO^-)$

Figura 2.21: Modos normais de vibração do grupo carboxilato (ref. 2).

Tabela 2.1: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a monocamada de MUA adsorvida quimicamente sobre uma superfície de Au.

$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	**Atribuição**
2916	ν_{as}(C–H), CH stretching assimétrico dos metilenos
2849	ν_s(C–H), CH stretching simétrico dos metilenos
1740	ν(C=O), stretching dos grupos carboxilo livres
1717	ν(C=O), stretching dos grupos carboxilo envolvidos em ligações de hidrogénio
1580	$\nu_{as}(COO^-)$, stretching assimétrico dos carboxilatos
1460, 1405	$\delta(CH_2)$, deformação scissors dos metilenos
1430	$\nu_s(COO^-)$, stretching simétrico dos carboxilatos
1197	ν(C–OH), stretching dos grupos carboxilo

A figura 2.22 corresponde a uma experiência de montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) em que o sistema FT-IRRAS foi utilizado para monitorizar a construção do filme. Depositou-se um filme de poli(4-estirenossulfonato) (pSS) e polialilamina (pAH) (quadro 2.1) até as 10 camadas ($5\times$(pSS/pAH)) camada-a-camada mergulhando alternadamente um slide idêntico ao da figura 2.1 em solução de polianião e policatião. A automontagem sobre a superfície

de Au foi promovida pela adsorção química de uma monocamada de cisteamina (quadro 2.1, página 63). Após cada imersão registou-se o espectro de reflexão da radiação *p* da superfície modificada.

Os espectros mostram claramente as bandas características do grupo sulfonato a 1200 cm^{-1} e dos grupos alquilamónio da pAH (região do stretching N–H e bandas de deformação do NH_3^+ a 1630 cm^{-1} e 1533 cm^{-1}). A atribuição das restantes bandas dos espectros é feita na tabela 2.2. Os espectros FT-IRRAS permitem verificar que após as 4 camadas iniciais a quantidade depositada por bicamada passa a ser constante já que se observa um aumento linear da aborvância em função do número de bicamadas. Este resultado sugere que a espessura do filme pode ser controlada com precisão nanométrica, como é característico do processo de LBLA.

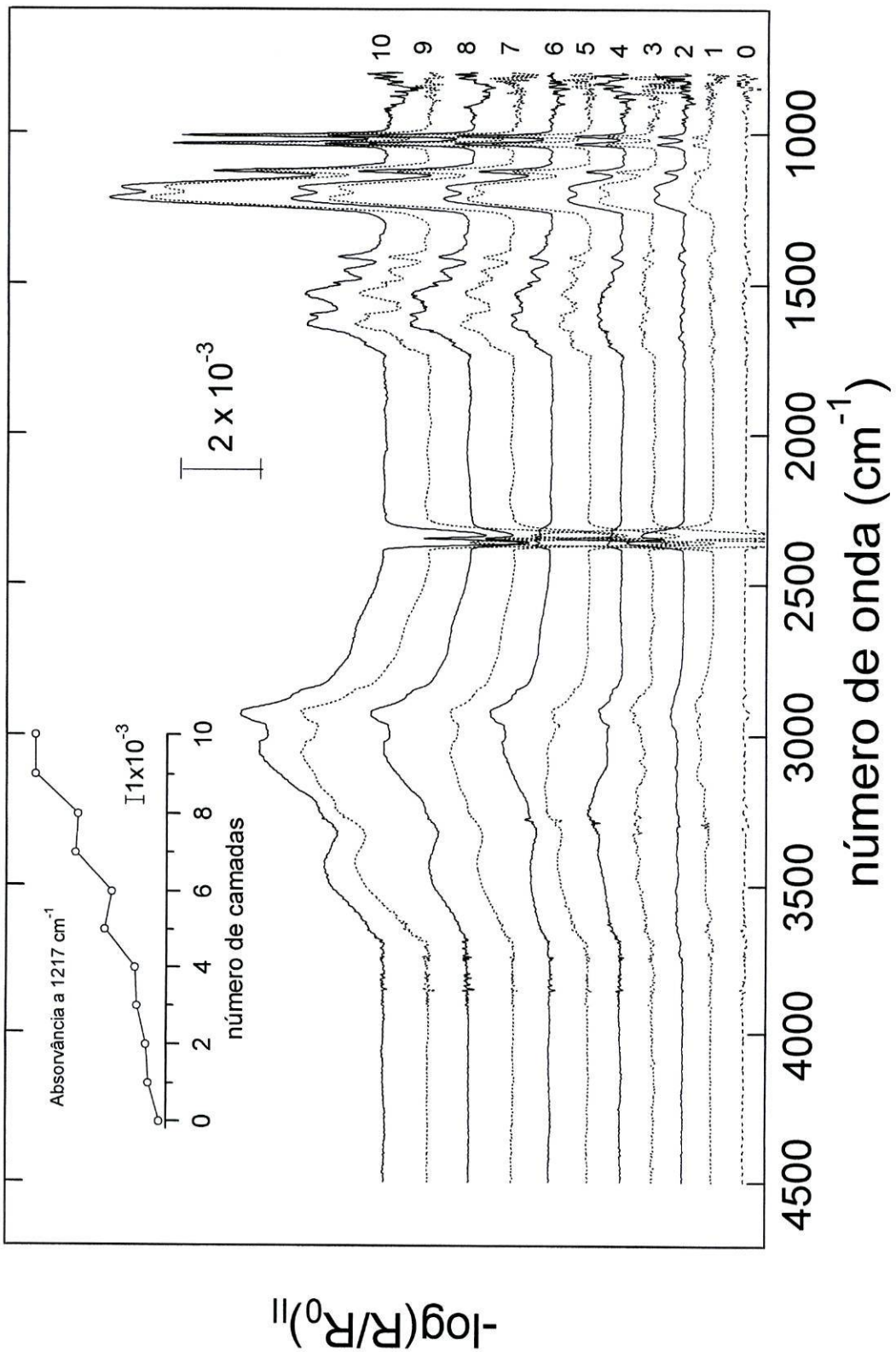


Figura 2.22: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada dos filme pSS/pAH sobre uma superfície de Au modificada com um SAM de cisteamina. Os espectros dos filmes em que a camada de pSS é a camada terminal estão representados por linhas a ponteado. O espectro correspondente à superfície coberta por cisteamina está representado a tracejado.

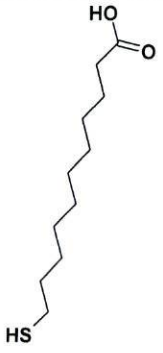
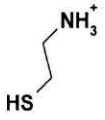
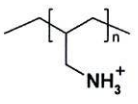
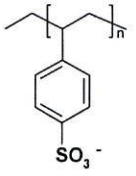
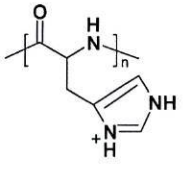
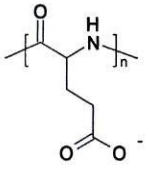
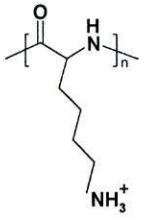
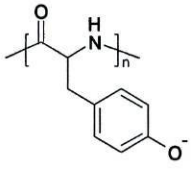
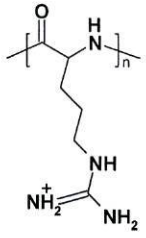
Tabela 2.2: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para o filme multicamadas construído com o pSS como polianião e pAH como policatião.

Superfície	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição
monocamada de Cisteamina	1650-1500	bandas muito fracas atribuídas às deformações N–H dos grupos NH_3^+
pSS[a]	3040	ν(=C–H), CH stretching do anel
	2930	ν_{as}(C–H), CH stretching assimétrico dos metilenos
	2860	ν_s(C–H), CH stretching simétrico dos metilenos
	1600, 1497	ν(C=C), stretching do anel
	1455, 1411	$\delta(CH_2)$, deformação scissors dos metilenos
	1200(dupleto)	$\nu_{as}(SO_3^-)$, stretching assimétrico do sulfonato
	1128, 1009	=C–H, deformação no plano do anel para-substituído
	1036	$\nu_s(SO_3^-)$, stretching simétrico do sulfonato
pAH	3400	ν_{as}(N–H), stretching assimétrico N–H dos grupos $-NH_2$ e $-NH_3^+$
	3280	ν_s(N–H), stretching simétrico N–H dos grupos $-NH_2$ e $-NH_3^+$
	2930	ν_{as}(C–H), CH stretching assimétrico dos metilenos
	2860	ν_s(C–H), CH stretching simétrico dos metilenos
	1630	δ_{as}(N–H), deformação assimétrica NH dos grupos $-NH_2$ e $-NH_3^+$
	1533	δ_{as}(N–H), deformação assimétrica NH dos grupos $-NH_2$ e $-NH_3^+$
	1460, 1400	$\delta(CH_2)$, deformação scissors dos metilenos

[a] da referência 32

O estudo correspondente à figura 2.23 é revelador das potencialidades da montagem com base em interacções electrostáticas como tecnologia para modificação de superfícies. Os resultados demonstram como através desta técnica simples é possível construir filmes com arquitecturas complexas.

Quadro 2.1: Blocos construtores utilizados na modificação de superfícies de Au nas experiências correspondentes aos espectros apresentados nas figuras 2.19, 2.22 e 2.23.

			
ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), pK_a~ 6-7	cisteamina, pK_a~ 8.2	3-mercaptopropanossulfonato (MPSA), pK_a~-3.0	
			
polialilamina (pAH), pK_a~7.8	poli(4-estirenossulfonato) (pSS), pK_a~-3.0	poli-L-histidina (pHis), pK_a~7.0	poli-L-glutamato (pGlu), pK_a~4.5
			
poli-L-lisina (pLis), pK_a~10.0	poli-L-tirosina (pTir), pK_a~10	poli-L-arginina (pArg), pK_a>12	

Quase todos os polielectrólitos disponíveis no laboratório na altura foram empregues para construir um filme misto do tipo A/B/C/D/E...O resultado é uma superfície multifuncionalizada. Notar que foram utilizados diferentes pHs de deposição para cada um dos polielectrólitos (ver procedimento experimental, secção 2.6). Nem todas as sequências de deposição são permitidas, por exemplo não é possível colocar o policatião pHis e o polianião pTir em camadas adjacentes já que os intervalos de pH em que estes polielectrólitos se encontram suficientemente ionizados para a experiência de

automontagem com base em interacções electrostáticas, não se intersectam. A tentativa de os depositar em camadas seguidas conduziria à dessorção da camada na superfície. Neste caso a superfície de Au foi previamente modificada com um SAM de ácido 3-mercaptopopanossulfónico (MPSA). Além das bandas do pSS referidas acima as bandas mais intensas para este filme são as bandas amida I a ~1665 cm^{-1}, amida II a ~1545 cm^{-1} (um *overtone* desta banda aparece a ~3100 cm^{-1},[33]) e as bandas correspondentes ao *stretching* N–H a ~3290 cm^{-1}, devidas às várias camadas de poliaminoácidos incorporadas.

2.5 PM-FT-IRRAS

Os resultados apresentados nas figuras anteriores são elucidativos sobre a capacidade que a reflexão a incidência quase rasante com radiação polarizada *p* tem, para obter espectros de superfícies modificadas com filmes ultrafinos. Constata-se contudo que, embora a medição de bandas com intensidade da ordem do 10^{-3} u.a. não apresente problemas de maior, a detecção de bandas com intensidades uma ou duas ordens de grandeza inferiores, é mais problemática. No caso de monocamadas de moléculas em superfícies metálicas as maiores bandas do espectro têm usualmente intensidades desta última ordem de grandeza. Esta falta de sensibilidade tem duas causas fundamentais, o *drift* experimental e o limitado *dynamic range* do conversor A/D do espectrofotómetro.

Em medições de FT-IRRAS, para se obter o espectro de absorção do filme na superfície, o espectro de radiação *p* do branco e amostra são determinados separadamente. Medem-se vários, normalmente centenas, de varrimentos do branco seguidos de milhares de varrimentos da amostra. O *averaging* é fundamental em FT-IRRAS para aumentar a razão sinal-ruído (S/R). Estas medições podem demorar dezenas de minutos ou horas dependendo do valor de S/R pretendido. Durante este tempo a sensibilidade do detector, a emissividade da fonte, a posição da óptica ou amostra podem variar causando significativas flutuações da linha de base. Mais graves ainda são as flutuações no conteúdo de vapor de água e CO_2 dentro da área de amostragem.

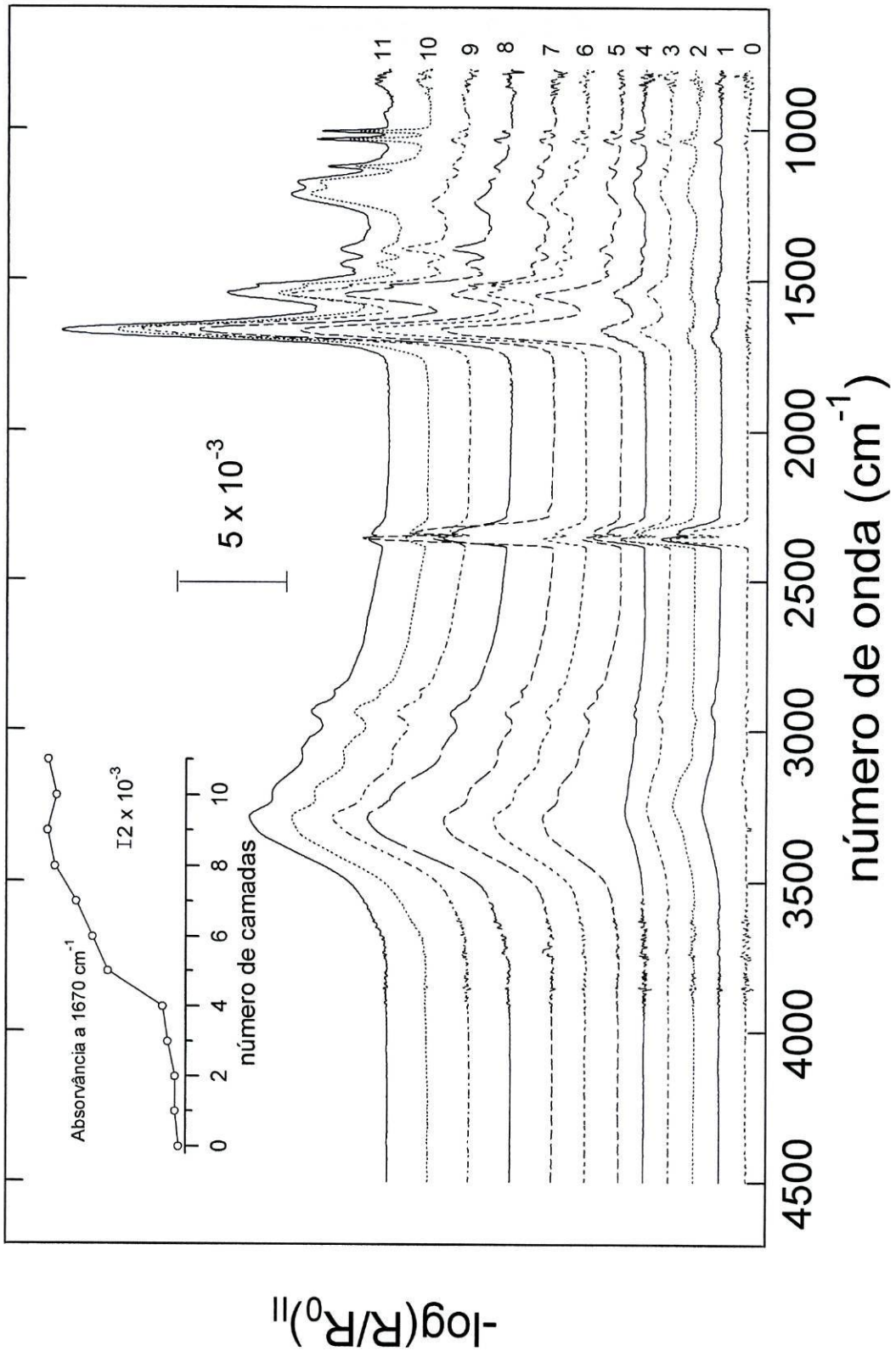


Figura 2.23: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas do filme misto Au|MPSA/pHis/pSS/pLis/pGlu/pArg/pTir/pArg/pGlu/pLis/pSS/pHis sobre uma monocamada de MPSA.

Estas duas moléculas absorvem intensamente no infravermelho e bastam variações mínimas entre a medição do branco e amostra para produzir bandas que ofuscam as bandas devidas ao adsorbato. Estes dois efeitos (*drift* instrumental e flutuações no conteúdo de vapor de água e CO_2) são visíveis no espectro Au|MUA, figura 2.19. A outra principal limitação à sensibilidade das medições de FT-IRRAS está relacionada com o facto de nestas medições a amplitude do sinal de interesse ser extremamente pequena relativamente à totalidade da energia que chega ao detector. Devido ao facto da intensidade do interferograma para retardação zero representar a soma da amplitude de todas as ondas no interferograma, o valor de S/R neste ponto pode ser extremamente elevado. O contrário ocorre para as regiões distantes da retardação zero, para as quais S/R pode ser muito baixo. Isto significa que quase toda a capacidade do conversor A/D do espectrofotómetro é utilizada para armazenar o sinal a retardação zero e consequentemente só os pontos a retardação zero vão influenciar o espectro, o que se reflecte numa perda de resolução e decréscimo da intensidade das bandas.[5] Nestas situações diz-se que que a razão sinal-ruído é limitada pelo *dynamic range* do conversor A/D. Uma das formas de solucionar este problema é reduzir a intensidade ou mesmo eliminar o *centerburst*.[5]

Entre as várias técnicas desenvolvidas para permitir a medição dum interferograma que fosse somente devido à radiação emitida pela amostra em vez de ser devido à enorme quantidade de energia emitida pela fonte encontra-se a técnica de modulação da polarização em FT-IRRAS ou PM-FT-IRRAS (espectroscopia de infravermelho de reflexão-absorção com transformada de Fourier e modulação da polarização) para a medição de espectros de superfícies.[5, 15] Nesta técnica um modulador fotoelástico é colocado no trajecto óptico para modular a polarização da luz incidente na amostra entre *s* e *p* a frequências elevadas (74 kHz ou 100 kHz). Produz-se desta forma um sinal duplamente modulado, em primeiro lugar pelo interferómetro e de seguida pelo modulador fotoelástico. O sinal que chega ao detector vai conter dois interferogramas, um de alta frequência porporcional a $(R_{\parallel} - R_{\perp})$ e um de baixa frequência, $(R_{\parallel} + R_{\perp})$. Caso seja possível separar os dois sinais pode determinar-se o espectro de reflectância diferencial,

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_{\parallel} - R_{\perp})}{(R_{\parallel} + R_{\perp})} \tag{2.34}$$

Enquanto que as espécies na superfície absorvem exclusivamente radiação *p* as espécies que se encontram no resto do trajecto óptico e que constituem o "branco", absorvem igualmente radiação *p* e *s*. Consequentemente o interferograma $(R_{\parallel} - R_{\perp})$ mede directamente o espectro da superfície. Como este interferograma não possui *centerburst* o seu *dynamic range* é reduzido aumentando-se a sensibilidade.[15] O problema relacionado com o *drift* experimental também é ultrapassado devido ao facto do numerador e denominador do espectro diferencial, equação 2.34, serem medidos em simultâneo. As medições de PM-FT-IRRAS são praticamente insensíveis às absorções isotrópicas.

2.5.1 Teoria da modulação da polarização em FT-IRRAS

A figura 2.24 ilustra o princípio de funcionamento do modulador fotoelástico (PEM). Uma descrição mais detalhada destes aparelhos pode ser encontrada na literatura, referência 34, ou na página de internet da empresa Hinds International (http://www.hindspem.com). O elemento principal do PEM é um cristal transparente no infravermelho (normalmente de CaF_2 ou ZnSe) colocado entre dois transdutores piezoeléctricos. Na ausência de tensão o cristal tem um índice de refracção isotrópico. Quando os transdutores piezoeléctricos comprimem ou estiram periodicamente o cristal segundo um determinado eixo o índice de refracção do cristal nessa direcção segue essas variações. Este fenómeno denomina-se fotoelasticidade.[20] Definindo os eixos *i* e *j* como os eixos ortogonais do cristal, se a tensão for aplicada na direcção *j* a diferença entre os indíces de refracção, $n_j - n_i$, passa a variar sinusoidalmente no tempo.

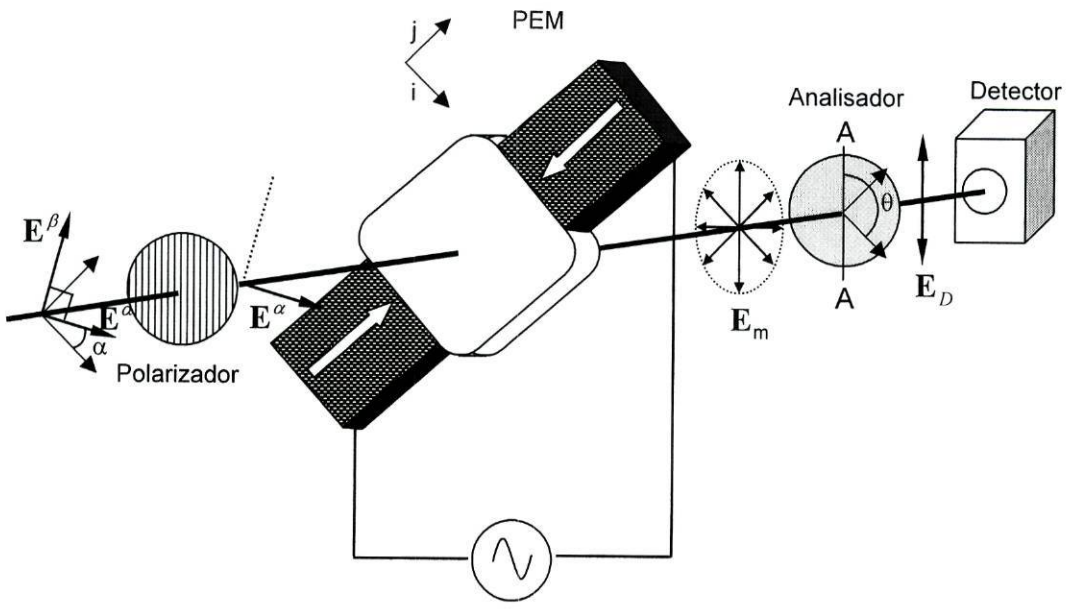


Figura 2.24: Representação esquemática do funcionamento do modulador fotoelástico.

Quando luz monocromática com uma polarização α relativamente ao eixo de tensão,

$$\mathbf{E}^{\alpha} = E^{0}(\cos\alpha\mathbf{i} + \sin\alpha\mathbf{j}) \tag{2.35}$$

incide no PEM a componente **j** sofre o desfasamento relativo ϕ e o campo resultante é

$$\mathbf{E}_m = E^{0}(\cos\alpha\mathbf{i} + e^{i\phi}\sin\alpha\mathbf{j}) \tag{2.36}$$

ou seja, após passagem pelo modulador obtém-se luz com polarização elíptica.
A diferença de fase, ϕ, é controlada pela voltagem aplicada aos transdutores piezoeléctricos e é dada por

$$\phi(t) = \phi_0\cos(\omega_m t) = \frac{GV_m}{\lambda}\cos(\omega_m t) \tag{2.37}$$

em que ϕ_0 é a diferença de fase máxima, ω_m é a frequência angular fundamental de vibração, λ é o comprimento de onda da luz incidente, V_m é a voltagem máxima aplicada e G é uma constante.

A expressão do campo após passagem pelo modulador (equação 2.36) permite verificar que, se ϕ_0 tiver um valor igual a π, quando $\omega_m t$ for igual a $\pi/2$ ou $3\pi/2$, ϕ é igual a zero e a luz transmitida é polarizada na mesma direcção da luz incidente; quando $\omega_m t$ for igual a 0 ou π, ϕ é igual a π ou $-\pi$ respectivamente, e a direcção de polarização da luz transmitida é rodada de 90° relativamente à direcção de polarização da luz incidente. A polarização da luz transmitida oscila sinusoidalmente entre dois estados de polarização lineares ortogonais a uma frequência de $2\omega_m$, tipicamente 74 kHz ou 100 kHz (dependendo do modelo de modulador).

Quando um analisador com uma direcção de transmissão **a** (linha AA) orientada de um ângulo θ ($\mathbf{a} = \cos\theta\mathbf{i} + \sin\theta\mathbf{j}$) é inserido no trajecto óptico, só uma polarização é detectada em função do tempo com uma intensidade dada por:

$$I_D = \left|\mathbf{a} \bullet \mathbf{E_m}\right|^2 = \frac{I_0^{\alpha}}{2}\left[1 + \cos(2\theta - 2\alpha) + \sin(2\alpha)\sin(2\theta)(\cos\phi - 1)\right] \qquad (2.38)$$

Em medições de dicroísmo linear ou reflectância diferencial o que se pretende é determinar a diferença de absorção de duas componentes ortogonais de luz polarizada linearmente. Nestas experiências a luz proveniente do PEM é feita incidir na amostra, estando o eixo do modulador orientado de 45° relativamente aos eixos do polarizador e amostra.[34, 35] Nestes casos a expressão do campo, equação 2.36. em termos dos eixos da amostra, $\mathbf{e}_{\parallel} = 1/\sqrt{2}(\mathbf{i} + \mathbf{j})$ e $\mathbf{e}_{\perp} = 1/\sqrt{2}(\mathbf{i} - \mathbf{j})$ (em que $\mathbf{e}_{\parallel}$ se refere ao campo eléctrico unitário situado no plano de incidência (polarização p) e $\mathbf{e}_{\perp}$ se refere ao vector unitário perpendicular ao plano de incidência (polarização s)) é

$$\mathbf{E}_m = \frac{E^0}{2}\left[(1 + e^{i\phi})\mathbf{e}_{\parallel} + (1 - e^{i\phi})\mathbf{e}_{\perp}\right] \qquad (2.39)$$

Como foi referido na secção 2.3 deste capítulo, durante a reflexão as componentes *p* e *s* são absorvidas numa extensão dada pelos respectivos coeficientes de Fresnel de reflexão, $r_{\parallel}$ e $r_{\perp}$ e após a amostra,

$$\mathbf{E}_D = \frac{E^0}{2}\left[r_{\parallel}(1+e^{i\phi})\mathbf{e}_{\parallel} + r_{\perp}(1-e^{i\phi})\mathbf{e}_{\perp}\right] \tag{2.40}$$

consequentemente a intensidade da luz *s* e *p* no detector em função do tempo, $I_D = |\mathbf{E_D}|^2$, vai ser igual a

$$\begin{aligned} I_D = \frac{I_0}{2}\left[R_{\parallel}(1+\cos\phi) + R_{\perp}(1-\cos\phi)\right] &= \frac{I_0}{2}\left[(R_{\parallel}+R_{\perp}) + (R_{\parallel}-R_{\perp})\cos\phi\right] \\ &= \frac{1}{2}\left[(I_{\parallel}+I_{\perp}) + (I_{\parallel}-I_{\perp})\cos\phi\right] \end{aligned} \tag{2.41}$$

A figura 2.25 mostra como varia a intensidade para um feixe de luz monocromática em função do tempo e de ϕ_0.

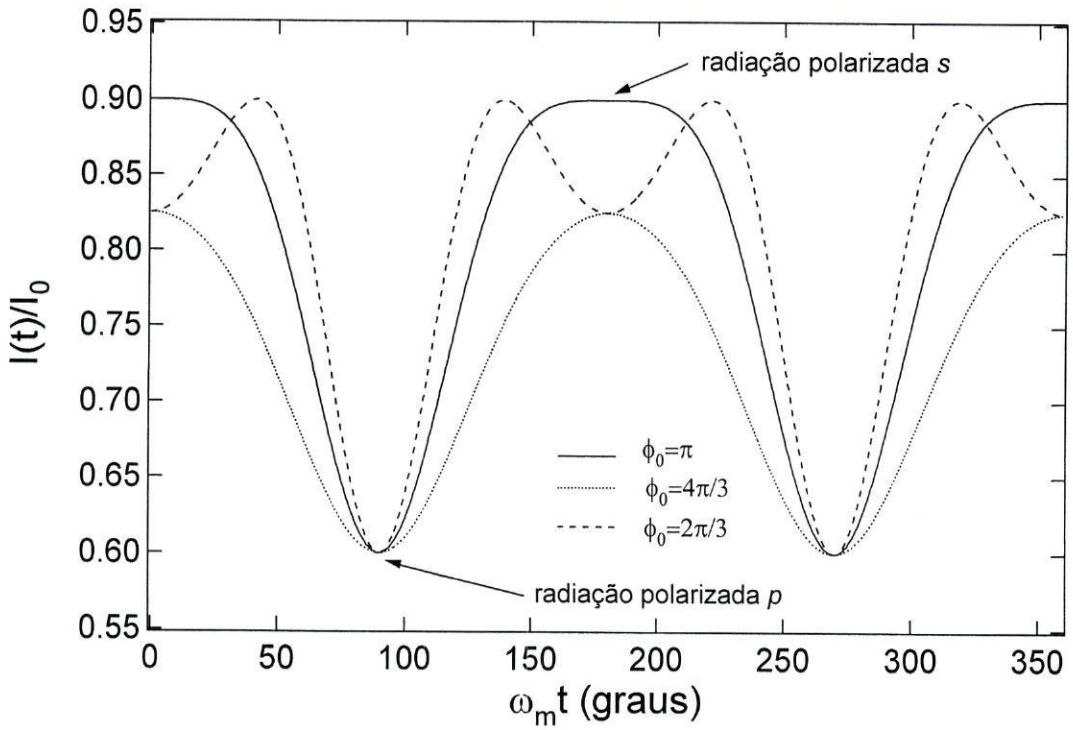


Figura 2.25: Intensidade teórica detectada para um feixe de luz monocromática incidindo numa superfície com $R_{\parallel} = 0.6$ e $R_{\perp} = 0.9$, para diferentes valores de ϕ_0.

Como já foi referido quando o PEM é combinado com um espectrofotómetro FT-IR é produzido um sinal duplamente modulado, primeiro pelo interferómetro (a frequências de Fourier dadas por $2\pi\bar{\nu}\delta/t$ (onde δ representa a retardação)) e seguidamente pelo PEM. O interferograma resultante pode ser escrito como

$$I(\delta)=\int_0^\infty\left\{\frac{1}{2}\left[(I_{\parallel}(\bar{\nu})+I_{\perp}(\bar{\nu}))+(I_{\parallel}(\bar{\nu})-I_{\perp}(\bar{\nu}))\cos\phi\right]\right\}\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\bar{\nu} \qquad (2.42)$$

Expandindo o termo $\cos\phi$ em termos duma série de funções de Bessel esféricas de ordem par[34]

$$\cos[\phi_0\cos(\omega_m t)]=J_0(\phi_0)+2\sum_{k=1}^{\infty}(-1)^k J_{2k}(\phi_0)\cos(2k\omega_m t) \qquad (2.43)$$

obtém-se,

$$\begin{aligned}I(\delta)=&\int_0^\infty\left\{\frac{1}{2}\left[(I_{\parallel}(\bar{\nu})+I_{\perp}(\bar{\nu}))+(I_{\parallel}(\bar{\nu})-I_{\perp}(\bar{\nu}))J_0(\phi_0)\right]\right\}\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\bar{\nu}+\\&+\int_0^\infty\left[(I_{\parallel}(\bar{\nu})-I_{\perp}(\bar{\nu}))\sum_{k=1}^{\infty}(-1)^k J_{2k}(\phi_0)\cos(2k\omega_m t)\right]\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\bar{\nu}\end{aligned} \qquad (2.44)$$

onde se vê que o interferograma que chega ao detector é a soma de dois interferogramas em que só o que é proporcional a $(I_{\parallel}-I_{\perp})$ é duplamente modulado.

Para calcular o espectro de reflectância diferencial pretendido é necessário extraír as parcelas $(I_{\parallel}-I_{\perp})$ e $(I_{\parallel}+I_{\perp})$.

É de salientar que, como ϕ_0 depende do comprimento de onda (equação 2.37), para um dado valor de V_m, só para os λs para os quais $\phi_0=(2n+1)\pi$ é que $I(t)$ a 90° e 270° é igual a $I_{\parallel}$ e $I(t)$ a 0° e 180° é igual a $I_{\perp}$. Geralmente $\phi_0\neq\pi$ e

$I(t)=I_{\parallel}$ para $\omega_m=90,270°$

$I(t)="I_{\perp}"=I_{\perp}+(I_{\parallel}-I_{\perp})(1+\cos\phi_0)/2$ para $\omega_m=0,180°$

Como é mostrado na figura 2.25 quando o PEM roda a polarização da luz de um valor superior ou inferior a 90° há um decréscimo da modulação a $2\omega_m$ de um factor proporcional a $(I_{\parallel} - I_{\perp})$. Assim para que o sinal proporcional a $(I_{\parallel} - I_{\perp})$ seja maximizado convém ajustar $\phi_0 = \pi$, através de V_m, de forma a conseguir a máxima eficiência de modulação na região espectral de interesse.

Nas primeiras implementações de PM-FT-IR foi utilizado um amplificador lock-in para obter o sinal a $2\omega_m$.[36-38] Para tal ser possível, dados os valores das constantes de tempo do lock-in (da ordem dos 0.5 ms), era necessário reduzir a velocidade do interferómetro de forma a que as frequências de modulação do interferograma fossem inferiores a 2 kHz. A maioria dos espectrofotómetros FT-IR foram concebidos para trabalhar com velocidades de espelhos 10-15 vezes superiores e embora os espectrofotómetros com velocidade de espelho variável possam ser regulados para trabalhar a velocidades suficientemente baixas tornam-se muito menos estáveis.[40] Como é óbvio as capacidades de *averaging* do sinal também são prejudicadas quando a velocidade do espelho é reduzida. Para evitar estes problemas, Corn e colaboradores desenvolveram um desmodulador para medir I(t) a 0° e 90°, durante cada ciclo de modulação.[39, 40]

O referido desmodulador gera um interferograma média, $I_{med}(\delta)$, e um interferograma diferença $I_{dif}(\delta)$,

$$I_{med}(\delta) = \frac{I_{\parallel}(\delta) + "I_{\perp}"(\delta)}{2} \tag{2.45}$$

$$I_{dif}(\delta) = I_{\parallel}(\delta) - "I_{\perp}"(\delta) \tag{2.46}$$

Estes interferogramas são matematicamente desmodulados através da transformada de Fourier para produzir os espectros $I_{med}(\bar{\nu})$ e $I_{dif}(\bar{\nu})$,

$$I_{med}(\bar{\nu}) = \frac{I_{\parallel}(\bar{\nu}) + "I_{\perp}"(\bar{\nu})}{2} = \frac{I_{\parallel}(\bar{\nu}) + I_{\perp}(\bar{\nu})}{2} + \frac{[I_{\parallel}(\bar{\nu}) - I_{\perp}(\bar{\nu})](1 + \cos\phi_0)}{4} \tag{2.47}$$

$$I_{dif}(\bar{\nu}) = I_{\parallel}(\bar{\nu}) - " I_{\perp} "(\bar{\nu}) = \frac{[I_{\parallel}(\bar{\nu}) - I_{\perp}(\bar{\nu})](1 - \cos\phi_0)}{2} \tag{2.48}$$

a partir dos quais se obtém o espectro diferencial

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{I_{dif}(\bar{\nu})}{I_{med}(\bar{\nu})} \approx \frac{\Delta I(\bar{\nu})}{\langle I(\bar{\nu})\rangle}\left[\frac{(1-\cos\phi_0)}{2} - \frac{\Delta I(\bar{\nu})}{\langle I(\bar{\nu})\rangle}\frac{\sin^2\phi_0}{8}\right] \tag{2.49}$$

onde $\Delta I(\bar{\nu}) = I_{\parallel}(\bar{\nu}) - I_{\perp}(\bar{\nu})$ e $\langle I(\bar{\nu})\rangle = \frac{I_{\parallel}(\bar{\nu}) + I_{\perp}(\bar{\nu})}{2}$.

A equação 2.49 mostra que o espectro que se obtém é um verdadeiro espectro de reflectância multiplicado por um termo, que se $\Delta I(\bar{\nu})/\langle I(\bar{\nu})\rangle$ for pequeno, é igual a $(1-\cos\phi_0)/2$. A variação de fase, ϕ_0, varia linearmente com o número de onda donde resulta a dependência teórica da linha de base representada na figura 2.26.

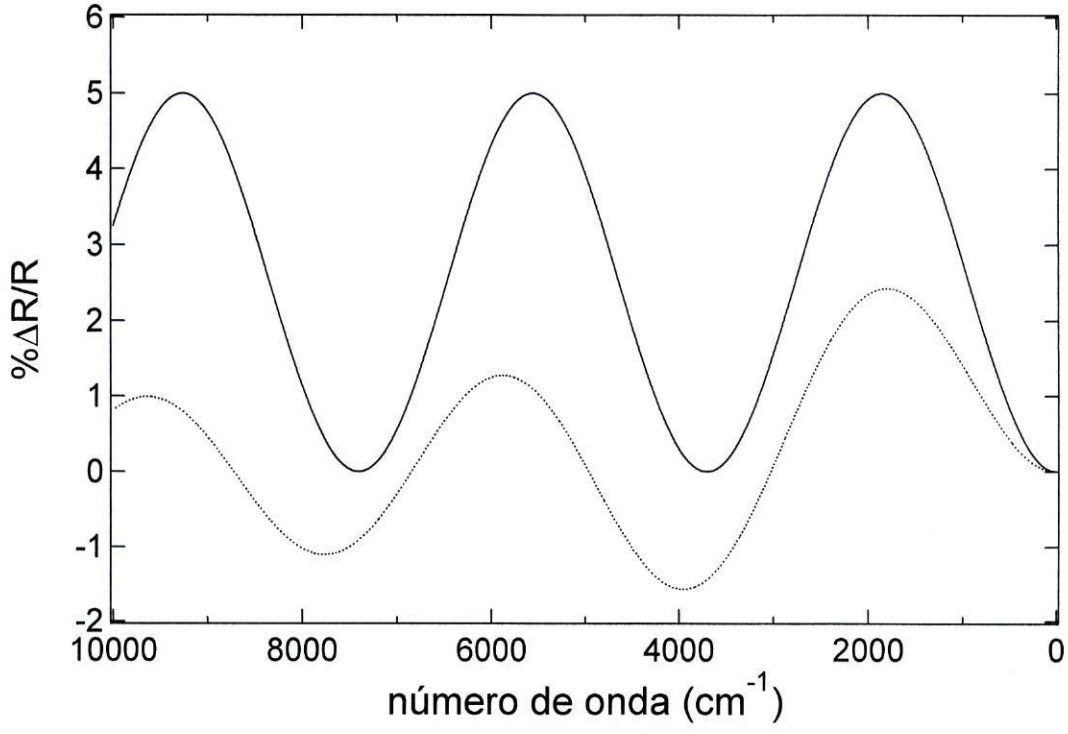


Figura 2.26: Espectros de reflectância diferencial teóricos para uma superfície com uma diferença de reflectância, independente do comprimento de onda, igual a 5%. A linha contínua corresponde ao espectro obtido quando se utiliza o sistema de desmodulação proposto por Corn, a linha a ponteado quando se utiliza somente o 2º harmónico. Considerou-se $\phi_0 = \pi$ para $\lambda = 5.4\,\mu m$.

A forma do espectro diferencial de reflectância que se obtém com este sistema de desmodulação difere da obtida quando se utiliza um lock-in medindo-se somente o sinal a $2\omega_m$. Neste último caso, como se pode deduzir a partir da expressão 2.44, o espectro obtido é,[38]

$$\frac{\Delta R}{R} \approx \frac{\Delta I(\bar{\nu})}{\langle I(\bar{\nu}) \rangle} J_2(\phi_0) \tag{2.50}$$

Para comparação a curva teórica obtida neste caso também está representada na figura 2.26. Como se pode observar o uso somente do 2° harmónico reflecte-se numa diminuição de intensidade do espectro diferencial.

2.5.2 Montagem experimental para PM-FT-IRRAS

Nas figuras 2.27 e 2.28 encontra-se representado o sistema óptico utilizado nas medições de PM-FT-IRRAS apresentadas nesta dissertação. Estas experiências foram efectuadas nos laboratórios do professor Robert M. Corn na Universidade do Wisconsin-Madison, E. U. A.. O feixe colimado proveniente dum espectrofotómetro FT-IR Mattson RS-1 é focado por um espelho parabólico descentrado 90° com uma camada reflectora de alumínio (Mattson) através dum polarizador de grelha metálica BaF_2 (Molectron IGP 228) seguido dum modulador fotoelástico com um cristal de ZnSe 50kHz (PEM-90 II/ZS50, Hinds instruments) para incidir na amostra com um ângulo de incidência, relativamente à normal à superfície, de aproximadamente 75°. O eixo do PEM está orientado 45° relativamente ao polarizador e amostra de forma a serem produzidas com a mesma intensidade de luz polarizada *p* e *s*. Após a amostra é importante que existam somente elementos insensíveis à polarização da luz já que quaisquer diferenças de polarização aparecem no espectro.[15] A luz é focada com uma lente plano-convexa de ZnSe ($EFL = 100.0\,mm$, JanosTech) no elemento sensível ($1 \times 1\,mm$) dum detector MCT de banda estreita ("narrow band") (IRA) arrefecido com azoto líquido. Apesar das medições de PM-FT-IRRAS serem insensíveis à absorção isotrópica por parte dos gases presentes no trajecto óptico, o sistema óptico é mantido

sob uma atmosfera onde o conteúdo de vapor de água é minimizado de forma a proteger os elementos ópticos. Além deste trajecto óptico usado para medições *ex-situ* a montagem possui também um trajecto óptico alternativo para medições espectro-electroquímicas *in-situ* que em que é utilizado um PEM -80.

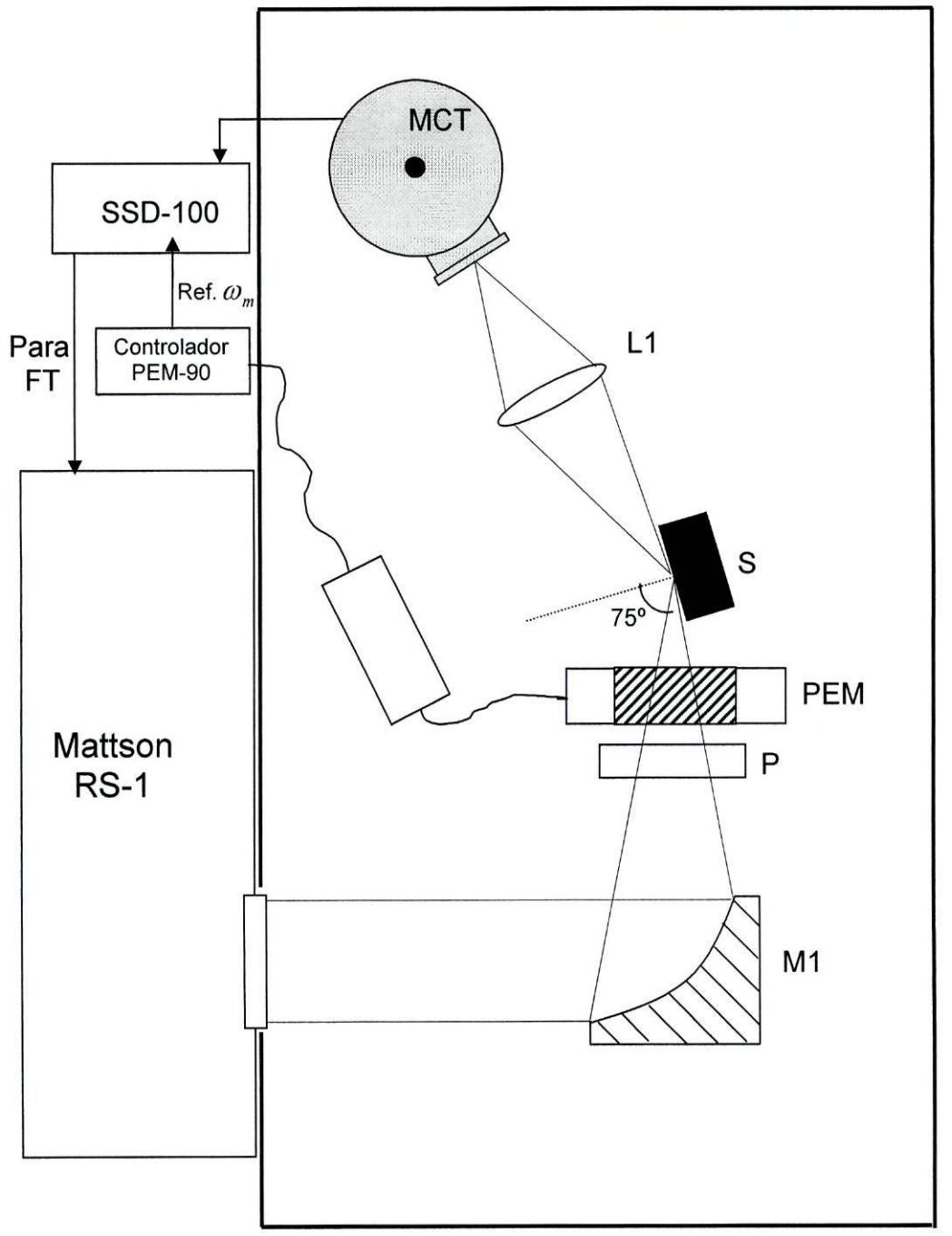


Figura 2.27: Representação esquemática do sistema óptico utilizado nas medições de PM-FT-IRRAS.

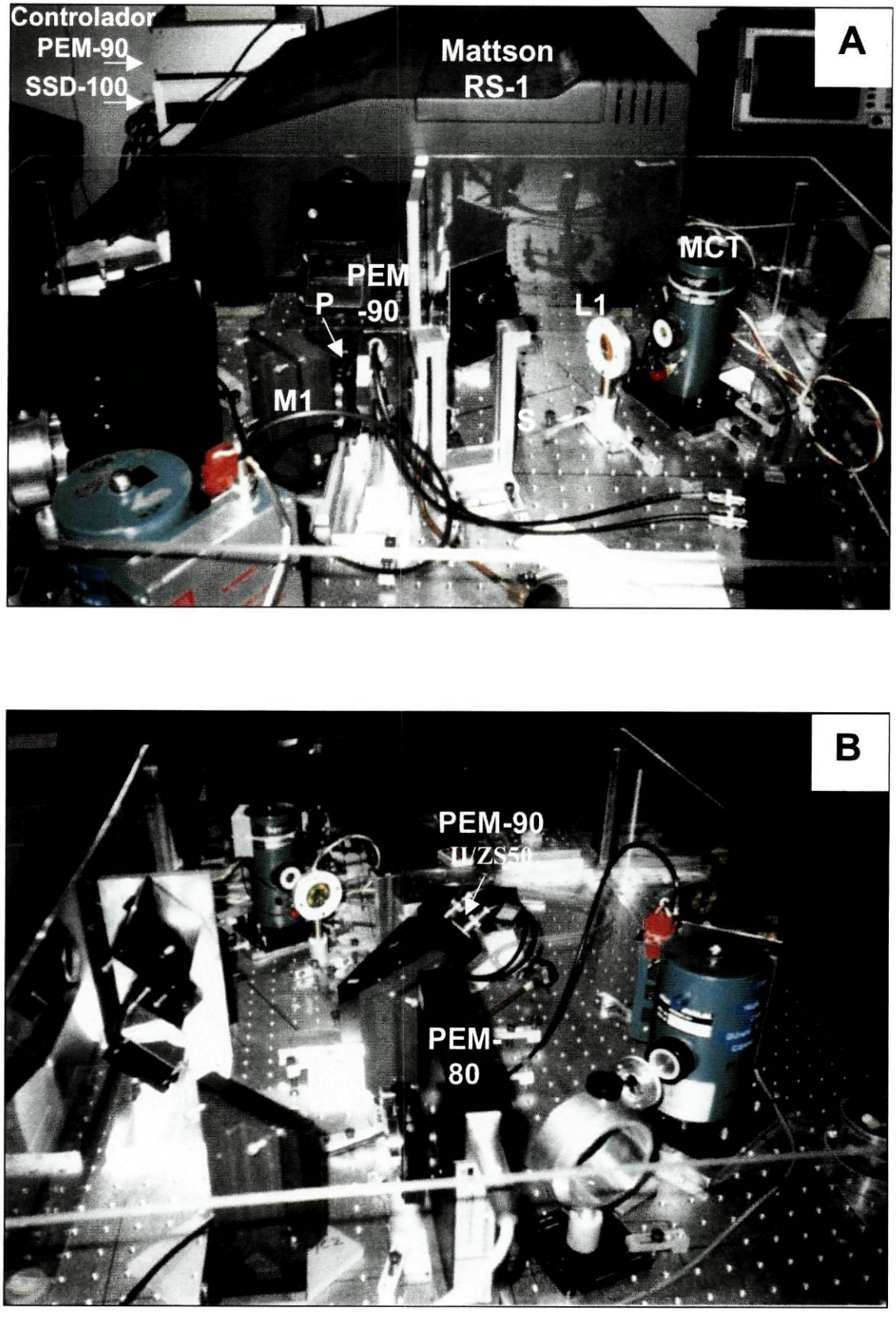


Figura 2.28: Fotografias do sistema utilizado nas medições PM-FT-IRRAS.

O sinal é amplificado pelo pré-amplificador do MCT (MCT instruments, Sirius 100 dual pre-amplifier) e enviado para o desmodulador SSD-100 (GWC technologies) onde é dividido igualmente pelas entradas correspondentes ao canal *dif* e ao canal *med* do desmodulador. O sinal ω_m do controlador do PEM é utilizado como referência para a medição do sinal para $\phi_0 = 0°$ e $90°$ em cada ciclo de modulação. Os interferogramas *dif* e *med* gerados pelo desmodulador são digitalizados sequencialmente pelo espectrofotómetro (isto porque o conversor A/D só digitaliza um interferograma de cada vez). Os interferogramas são medidos alternadamente em blocos de 10 varrimentos para o sinal *med* e 50 varrimentos para o sinal *dif*, num total de 20 blocos cada com uma resolução de 4 cm^{-1}.

Na figura 2.29 é apresentado o espectro medido para uma monocamada de MUA. O PEM foi ajustado para $\phi_0 = \pi$ quando $\lambda = 5.4\,\mu m$. Como se pode observar a forma da linha de base devido à dependência do PEM do comprimento de onda é a prevista pela equação 2.49 e representada na figura 2.26.

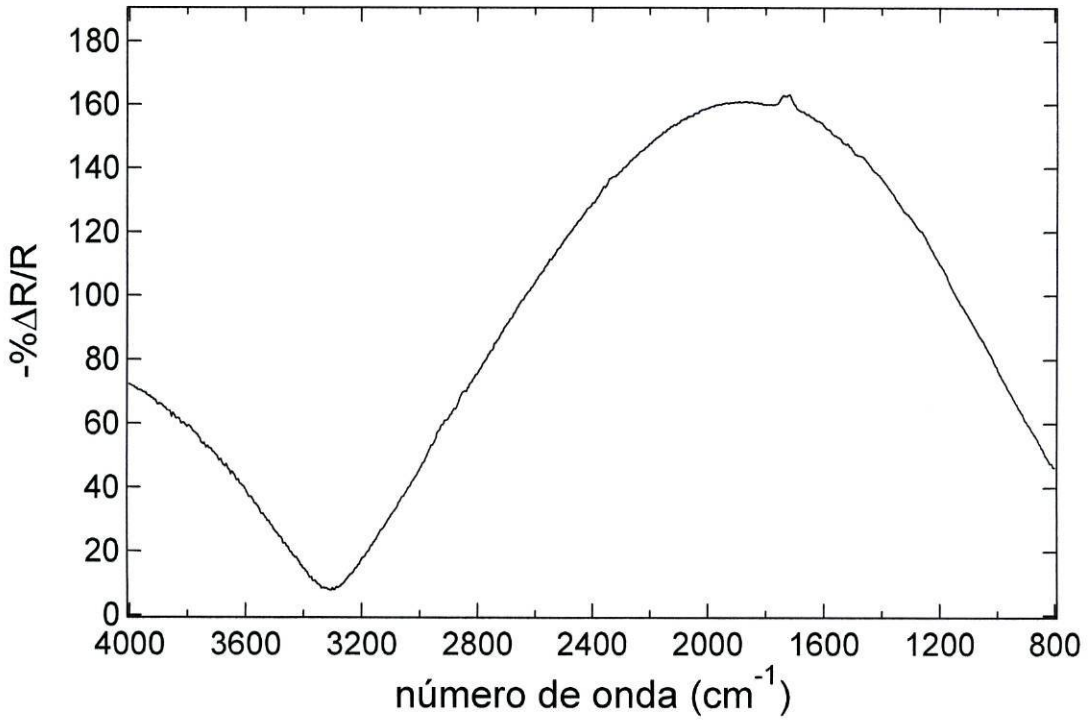


Figura 2.29: Espectro de reflectância diferencial para um SAM de MUA numa superfície de Au.

Na figura 2.30A é apresentada uma ampliação do espectro no intervalo 1000-2000 cm^{-1}. A linha de base pode ser ajustada pela equação 2.49 ou por um polinómio de 2ª ou 3ª ordem. O processo de normalização é descrito na página de internet do grupo de investigação do Professor Corn (http://corninfo.chem.wisc.edu./). O espectro obtido após normalização é apresentado figura 2.30B. Notar que se trata de uma amostra diferente da conducente ao espectro obtido com polarização fixa apresentado na figura 2.19.

Como se pode observar a utilização da dupla modulação em FT-IRRAS aumenta a razão sinal-ruído permitindo identificar bandas com intensidade inferior a 1×10^{-4} u.a., é extremamente eficaz na compensação do *drift* experimental e é insensível à absorção por parte do vapor de água e CO_2 vestigiais no trajecto óptico. O facto da técnica de PM-FT-IRRAS permitir reduzir consideravelmente o tempo de medição necessário para obter uma determinada razão sinal-ruído, inclusivamente sem necessidade de espectro de referência, torna-a adequada para monitorizar a modificação da superfície em tempo real. Num futuro próximo é provável que a maior parte dos sistemas FT-IRRAS tenham sido convertidos em PM-FT-IRRAS.

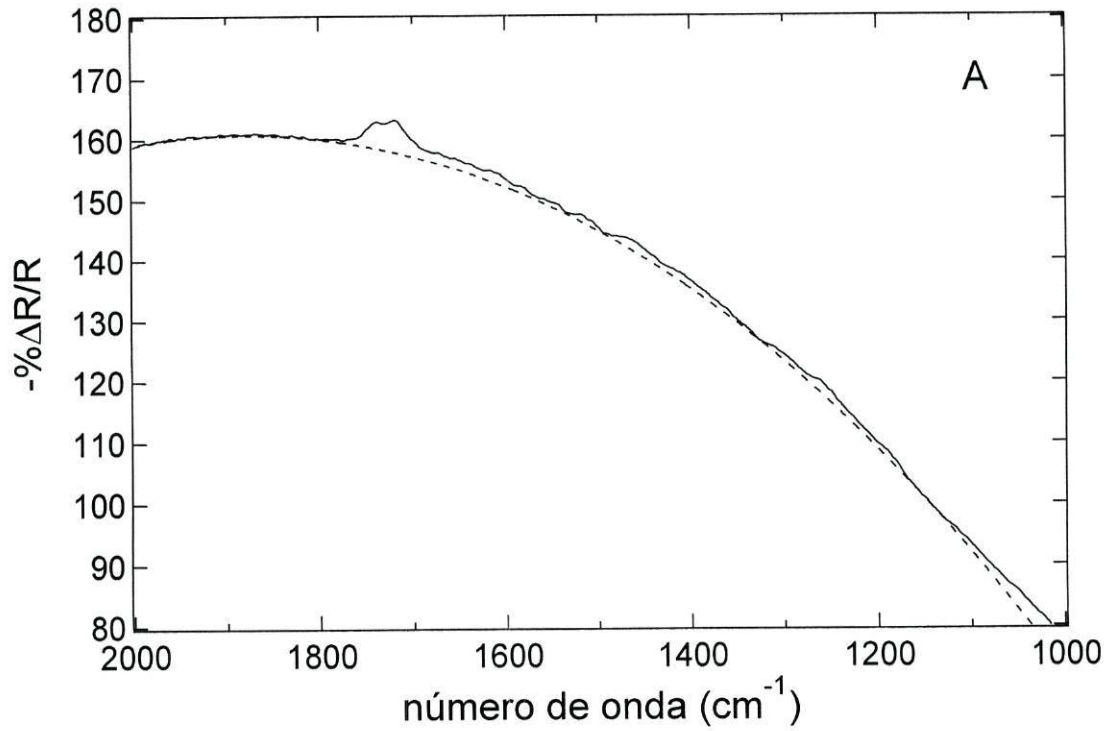
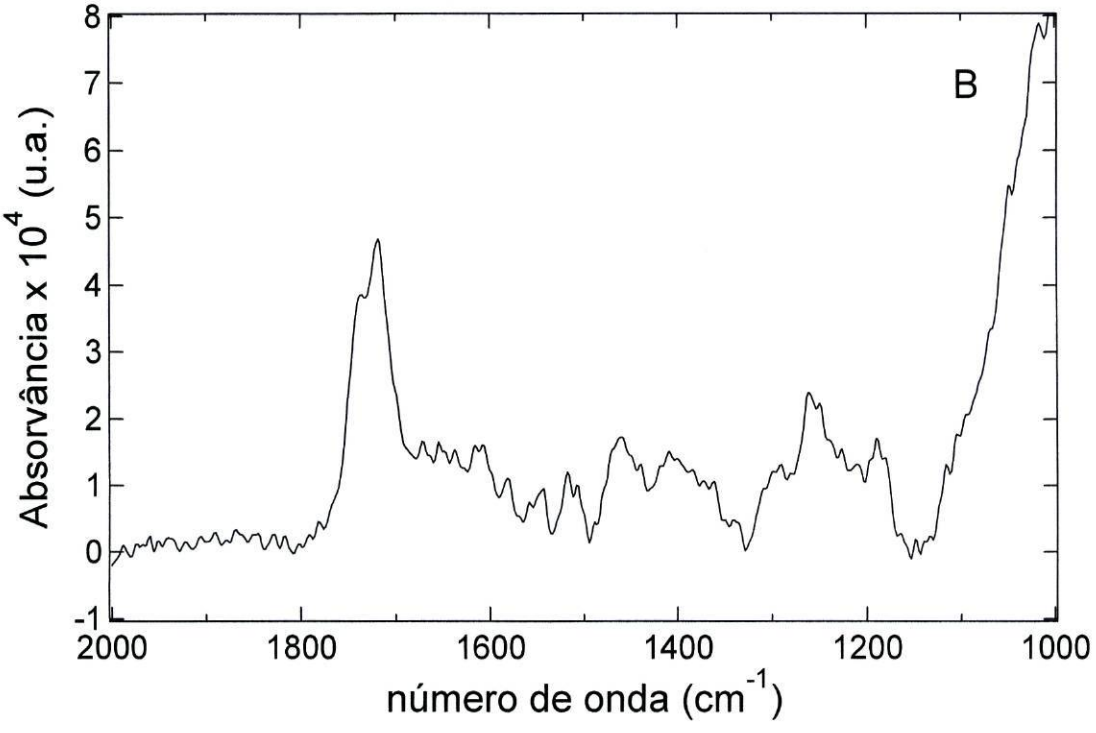


Figura 2.30: A) Ampliação do espectro da figura 2.25 entre 1000 e 2000 cm^{-1}, onde se mostra a linha de base a tracejado. B) Região 1000-2000 cm^{-1} após normalização (página seguinte).


B
Absorvância x 10^4 (u.a.)
número de onda (cm^-1)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
2000
1800
1600
1400
1200
1000

2.6 Procedimento experimental

I. Reagentes e Material

Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, Aldrich), 3-mercaptopropanossulfonato de sódio (MPSA, Aldrich), cisteamina (Fluka), poli(4-estirenossulfonato de sódio) (MM, 70 000) (pSS, Aldrich), hidrocloreto de polialilamina (MM, 70 000) (pAH, Aldrich), hidrocloreto de poli-L-histidina (MM, 15 800) (pHis, Sigma), hidrobrometo de poli-L-lisina (MM, 32 600) (pLis, Sigma), hidrocloreto de poli-L-arginina (MM, 38 300) (pArg, Sigma), poli-L-tirosina (MM, 16 500) (pTir, Sigma), poli-L-glutamato de sódio (MM, 71 700) (pGlu, Sigma), etanol (absoluto, Aga), ácido bórico (SIF), H_2SO_4 (Pronalab), HCl (Merck), NAOH (Pronalab), acetona (Riedel-deHäen), ácido acético 100% (Pronalab), acetato de sódio tri-hidratado (pa, Merck), peróxido de hidrogénio 30% (Pronalab), azoto líquido (Ar líquido), azoto gas N45 (Ar líquido). Na preparação de soluções e nos procedimentos de lavagem foi utilizada água Millipore (resistividade > 18 MΩ·cm).

No alinhamento do sistema óptico para as medições de FT-IRRAS foi utilizado um cartão de alinhamento ("infrared sensor card") Modelo F-IRC2 da Newport. Os slides de Au (18 mm × 18 mm , 5 nm Cr, 100 nm Au) (figura 2.1) foram adquiridos à empresa Evaporated Metal Films e foram utilizados como substracto após lavagem com acetona seguida de imersão numa solução 3:1 de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogénio (30%) (solução "piranha") durante aproximadamente 1 minuto seguida de lavagem com água Millipore.

Atenção! O manuseamento da solução "piranha" requer cuidados especiais visto tratar-se duma solução altamente corrosiva que reage violentamente com matéria orgânica.

II. Modificação da superfície de Au com os filmes automontados

a. SAMs de alcanotióis

Os SAMs de MUA, cisteamina e MPSA obtiveram-se por imersão das superfícies de Au em soluções etanólicas 1 mM dos alcanotióis durante pelo menos 10 horas. Após automontagem as superfícies foram lavadas com etanol, água e secas numa corrente de azoto.

b. Filmes multicamadas de polielectrólitos

O filme de multicamadas de pSS e pAH foi obtido mergulhando repetidamente e alternadamente a superfície de Au|cisteamina em soluções de pSS e pAH (1 mg/mL em CH_3COOH/CH_3COONa 0.1 M, pH 4.5). Na construção do filme misto a sequência de deposição utilizada foi: camada de pHis (a partir de uma solução 1 mg/mL em tampão acetato 0.1 M, pH 4.5), camada de pSS (a partir de uma solução 1 mg/mL em tampão acetato 0.1 M, pH 4.5), camada de pLis (a partir de uma solução 1 mg/mL em tampão borato 0.1 M, pH 9), camada de pGlu (a partir de uma solução 1 mg/mL em tampão borato 0.1 M, pH 9), camada de pArg (a partir de uma solução 1 mg/mL em NaOH 0.01 M) camada de pTir (a partir de uma solução 0.5 mg/mL em NaOH 0.01 M), etc.
O tempo de imersão em cada uma das soluções de polielectrólito foi de 10 minutos. Após cada imersão a superfície foi lavada com água Millipore e seca numa corrente de azoto.

2.7 Bibliografia

(1) (a) Soriaga, M. P.; Wilson, P. H.; Hubbard, A. T.; Benton, C. S. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *142*, 317-323. (b) Chechik, V.; Stirling, C. J. M. em *The Chemistry of Organic Derivatives of Gold and Silver*; Editores, Saul Patai e Zvi Rappoport; John Wiley & Sons: Chichester, 1999; Cap. 15, pag. 604.

(2) Drago, R. *Physical Methods for Chemists*; Saunders: Filadélfia, 1992; Cap. 6.

(3) Atkins, P. W. *Physical Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 1994; Cap.16.

(4) Bradshaw, A. M.; Schweizer, E. em *Spectroscopy of Surfaces*; Editores, R. J. H. Clark e R. E. Hester; John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1988; Cap. 8.

(5) Griffiths, P. R.; deHaseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1986.

(6) (a) Eischens, R. P.; Francis, S. A.; Plisken, W. A. *J. Phys. Chem.* **1956**, *60*, 194-201. (b) Eischens, R. P.; Plisken, W. A. *Adv. Catal.* **1958**, *10*, 1-56.

(7) Francis, S. A.; Ellison, A. H. *J. Opt. Soc. Am.* **1959**, *49*, 131-138.

(8) Pickering, H. L.; Eckstrom, H. C. *J. Phys. Chem.* **1959**, *63*, 512-517.

(9) (a) Greenler, R. G. *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 310-315. (b) Greenler, R. G. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 1963-1968.

(10) Pritchard J.; Sims, M. L. *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *66*, 427-433.

(11) Clarke, J. S.; Khun, A. T.; Orville-Thomas, W. J.; Stedman, M. *J. Electroanal. Chem.* **1974**, *49*, 199-208.

(12) Blanke, J. F.; Vincent, S. E.; Overend, J. *Spectrochim. Acta* **1976**, *32A*, 163-173.

(13) Ishitani, A.; Ishida, H.; Soeda, F.; Nagasawa, Y. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 682-687.

(14) Ashley, K.; Pons, S. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 673-695.

(15) Dowrey, A. E.; Marcott, C. *Appl. Spectrosc.* **1982**, *36*, 414-416.

(16) (a) Udagawa, A.; Matsui, T.; Tanaka, S. *Appl. Spectrosc.* **1986**, *40*, 794-797. (b) Mielczarski, J. A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2649-2663. (c) Faucher, K. M.; Sun, X.-L.; Chaikof, E. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 1664-1670.

(17) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Kuwana, T. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2461-2465.

(18) (a) Dluhy, R. A. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 1373-1379. (b) Le Calvez, E.; Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B. *Langmuir* **2001**, *17*, 670-674. (c) Islam, Md. N.; Ren, Y.; Kato, T. *Langmuir* **2002**, *18*, 9422-9428.

(19) (a) Allara, D. L.; Baca, A.; Pryde, C. A. *Macromolecules* **1978**, *11*, 1215-1220.

(20) Hecht, E. *Optics*, 2ª ed.; Addison-Wesley: Nova Iorque, 1987.

(21) Golden, W. G. em *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Applications to Chemical Systems*; Editores, J. R. Ferraro e L. J. Basile; Academic Press: Nova Iorque, 1985; Vol. 4, cap. 8.

(22) Beden, B.; Lamy, C. em *Spectroelectrochemistry, Theory and Practice*; Editado por R. J. Gale; Plenum Press: Nova Iorque, 1988; Capítulo 5.

(23) Stole, S. M.; Propenoe, D. D.; Porter, M. D. em *Electrochemical Interfaces, Modern Techniques for in-situ Interface Characterization*; Editado por H. D. Abruña; VCH Publishers: Nova Iorque, 1991; cap. 7.

(24) McIntyre, J. D. em *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*; Editado por P. Delahay e C. W. Tobias; John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1973; Vol. 9, pág. 61.

(25) Graf, R. T.; Koenig, J. L.; Ishida, H. em *Fourier Transform Infrared Characterization of Polymers*; Editado por H. Ishida; Plenum Press: Nova Iorque, 1987; Cap. 1.

(26) Hansen, W. *J. Opt. Soc. Am.* **1968**, *58*, 380-390.

(27) (a) Mielczarski, J. A.; Mielczarski, E. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3206-3217. (b) Zhang, H.-L.; Zhang, H.; Zhang, J.; Li, H.-L.; Liu, Z.-F. *Mat. Sci. Eng. C* **1999**, *8-9*, 187-190. (c) Chernyshova, I. V.; Rao, K. H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 810-820. (d) Pelletier, I.; Laurin, I.; Buffeteau, T.; Desbat, B.; Pézolet, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1189-1195.

(28) Kolb, D. M. em *Spectroelectrochemistry, Theory and Practice*; Editado por R. J. Gale; Plenum Press: Nova Iorque, 1988; Cap. 4.

(29) Palik, E. D. *Handbook of Optical Constants*; Academic Press: Boston, 1985.

(30) (a) Sun, L.; Crooks, R. M.; Ricco, A. J. *Langmuir* **1993**, *9*, 1775-1780. (b) Jiang, P.; Liu, Z.-F.; Cai, S.-M. *Langmuir* **2002**, *18*, 4495-4499.

(31) Smith, E. L.; Alves, C. A.; Anderegg, J. W.; Porter, M. D. *Langmuir*, **1992**, *8*, 2707-2714.

(32) Gregoriou, V. G.; Hapanowicz, R.; Clark, S. L.; Hammond, P. T. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 470-476.

(33) Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Chapman and Hall: Londres, 1975; pág. 255.

(34) Hipps, K. W.; Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 555-562.

(35) Drake, A. F. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **1986**, *19*, 170-181.

(36) Nafie, L. A.; Diem, M. *Appl. Spectrosc.* **1979**, *33*, 130-135.

(37) Golden, W. G.; Saperstein, D. D. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1983**, *30*, 43-50.

(38) Buffeteau, T.; Desbat, B.; Turlet, J. M. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, 380-389.

(39) Barner, B. J.; Green, M. J.; Sáez, E. I.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 55-60.

(40) Green, M. J.; Barner, B. J.; Corn, R. M. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 1426-1430.

Capítulo 3

Síntese e aplicação de monocamadas terminadas com grupos tiol na imobilização de ADN em superfícies de ouro

3.1 Introdução

3.1.1 SAMs de alcanotióis: uma plataforma para imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro

3.1.2 Imobilização de ADN em superfícies

3.2 Síntese e reactividade de superfícies terminadas com o grupo –SH

3.2.1 Síntese de SAMs terminados com o grupo –SH

3.2.2 Reacção com moléculas contendo grupos maleimida

3.2.3 Reacção com dissulfetos de dipiridilo. Imobilização de biomoléculas na superfície através de ligações dissulfeto

3.3 Fabrico do *microarray* de ADN

3.4 Conclusões

3.5 Procedimento experimental e instrumentação

3.6 Bibliografia

3.1 Introdução

3.1.1 SAMs de alcanotióis: uma plataforma para imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro

A imobilização de biomoléculas em superfícies têm sido utilizada com diversas finalidades, por exemplo, no fabrico de biosensores,[1] para criar eléctrodos modificados com enzimas,[2] em *biomolecular templating* para fabrico de materiais inorgânicos nanoestruturados[3] e em computação com ADN.[4]

A utilização de SAMs no fabrico de superfícies biologicamente activas já foi abordada no capítulo 1. As vantagens na utilização de SAMs como plataforma de imobilização para biomoléculas estão principalmente relacionadas com o facto de proporcionarem uma superfície biomimética que preserva a actividade das moléculas imobilizadas, a sua fácil formação, estabilidade, flexibilidade em desenhar a reactividade da superfície através da funcionalidade introduzida no término-ω e o facto da imobilização num SAM requerer somente a quantidade correspondente a uma monocamada de biomolécula (10^{-7} mol/cm^2).

Quando se utilizam SAMs para produzir uma determinada superfície pode optar-se por duas estratégias:[5] formação do SAM a partir de um percursor que possui a funcionalidade desejada ou a derivatização pós-preparação de um SAM mediante reacções de superfície. Quando o grupo funcional é volumoso como é vulgar quando se trata de biomoléculas a primeira estratégia é desaconselhável. Grupos ω volumosos dificultam a formação do SAM e tendem a originar monocamadas irregulares e, no caso de uma biomolécula, é provável que ocorra desnaturação durante a automontagem. Quando a formação do SAM e a imobilização da biomolécula são efectuadas em dois passos distintos existe uma maior probabilidade do SAM manter a sua estrutura e a biomolécula a sua actividade. Para implementar esta abordagem opta-se por percursores para o SAM que possuam grupos ω bastante reactivos e ao mesmo tempo pouco volumosos de forma a não prejudicarem a automontagem. Os grupos $-NH_2$, –COOH e –OH satisfazem estes requisitos e SAMs tendo estes grupos como funcionalidades ω

têm sido dos mais utilizados para ligar de forma robusta diversas macromoléculas biológicas, como oligonucleótidos e polipéptidos, a superfícies de ouro.[1,6] Por exemplo, as monocamadas de alcanotióis terminados com o grupo amino, foram empregues para ligar oligonucleótidos derivatizados com o grupo tiol, através da reacção com um *cross-linker* heterobifunctional. Desta forma foi possível criar superfícies com formato *array* que foram utilizadas como sensores de ADN.[7] Um procedimento para obtenção de *arrays* a partir de monocamadas terminadas com grupos –OH foi também proposto pelos mesmos autores.[8]

SAMs terminados com o grupo –COOH foram utilizados como substracto para o desenvolvimento de imunosensores[9] e no fabrico de superfícies modificadas com dendrímeros para imobilização de proteínas.[10]

Recentemente foi demonstrado que uma forma de aumentar a sensibilidade, selectividade e estabilidade dos imunosensores comercialmente disponíveis seria a utilização de SAMs mistos, formados com alcanotióis terminados com grupos –OH e –COOH, como interface transdutora.[11]

Também têm sido utilizados grupos ω mais específicos, por exemplo SAMs terminados com grupos maleimida para ligar covalentemente carbohidratos e proteínas funcionalizados com grupos tiol;[12] monocamadas obtidas por automontagem de ditiobis(succinimidil undecanoato) para ligar covalentemente imunoglobulinas a superfícies de ouro;[13] SAMs de alcanotióis funcionalizados com biotina (biotinilados) para fabrico de sensores para proteínas, baseados na interacção biotina-estreptavidina;[14] e SAMs terminados com ligandos fosfonato para ligar proteínas através da interacção deste ligando com a cutinase.[15]

A flexibilidade dos SAMs não se restringe à natureza do grupo terminal, o tamanho da cadeia também pode ser utilizado como variável de optimização numa dada estratégia de imobilização. Verificou-se, por exemplo, que o rendimento da imobilização da enzima cataláse em SAMs terminados com o grupo –COOH variava na seguinte ordem: SAM misto > SAM de MUA > SAM de MPA (ácido 3-mercaptopropanóico). A maior reactividade evidenciada pelos SAMs de MUA relativamente aos de MPA foi explicada com base numa maior acessibilidade dos grupos carboxilo no primeiro SAM ao passo que, o aumento observado para o SAM misto foi associado à maior desordem neste SAM.[16]

Outros exemplos de aplicações das monocamadas de alcanotióis em ouro em biosensores incluem a sua utilização no fabrico de superfícies terminadas com polietilenoglicol (PEG) que impedem a adsorção não específica de biomoléculas[17] e no fabrico de *arrays* de tri(etileno)glicol, α-D-manopiranosido e manosido para estudar a adesão bacteriana.[18]

Neste capítulo é apresentada uma nova abordagem química para imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro que se baseia na criação de uma monocamada terminada por grupos tiol reactivos (ω-SH).

O uso de monocamadas terminadas com grupos tiol para controlar a química de superfícies não é novidade sendo normalmente levado a cabo mediante a adsorção de alcanoditióis.[19] Este método de funcionalização apresenta como inconveniente o facto de ambos os grupos tiol da mesma molécula poderem reagir com a superfície durante o passo de automontagem o que pode tornar pouco eficaz esta via de funcionalização. Em contraste, na abordagem proposta a superfície terminada com o grupo –SH é obtida a partir de uma monocamada terminada com grupos $-NH_2$ através da conversão *in-situ* do grupo ω-amino num grupo ω-SH.

O grupo tiol em solução é bastante reactivo podendo participar numa grande diversidade de reacções nomeadamente reacções em que o grupo –SH se comporta como nucleófilo.[20] Na figura 3.1 são mostradas algumas possibilidades de reacção.

Neste trabalho é demonstrado que os grupos –SH criados na superfície retêm a capacidade de reagir com moléculas contendo grupos maleimida (imidas do ácido maleico) (reacção c)) e de participarem em reacções de permuta tiol-dissulfeto (reacção f)). Esta última reacção vai ser utilizada para imobilizar, de uma forma reversível, péptidos e ADN derivatizados com grupos tiol. As biomoléculas podem ser libertadas por redução das ligações dissulfeto com regeneração da superfície –SH.

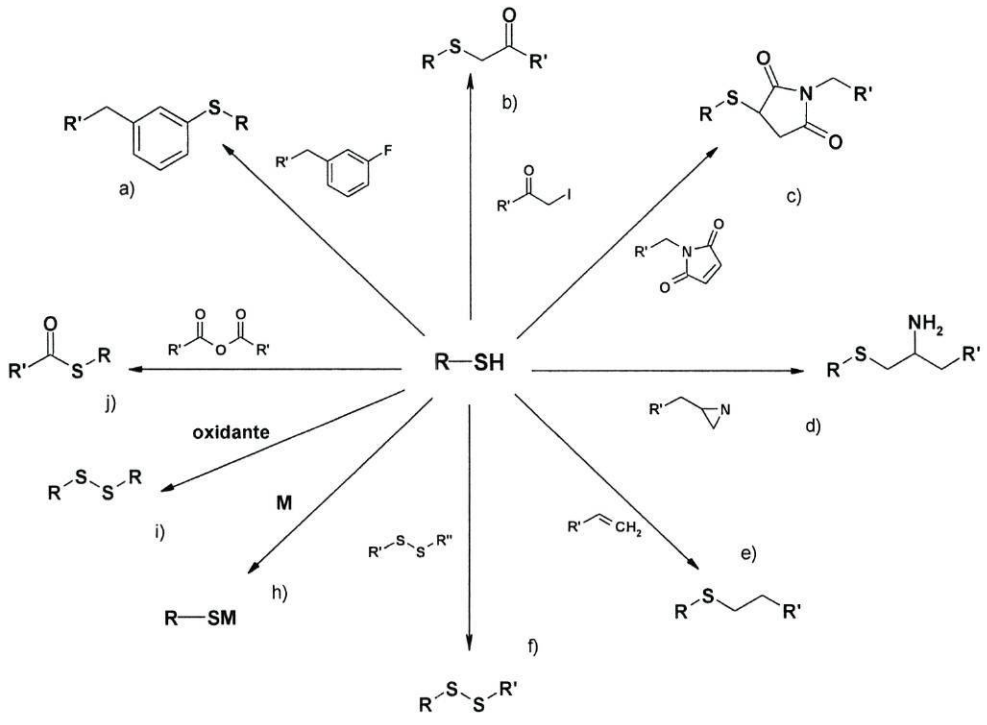


Figura 3.1: Reactividade do grupo –SH. a) Arilação; alquilação, formação de ligações tioéter: b) reacção com α-haloacetatos, c) reacção com maleimidas (adição a ligações duplas activadas), d) reacção com aziridinas, e) reacção com derivados acriloil (adição a ligações duplas activadas); f) permuta tiol-dissulfeto; h) reacção com metais; i) oxidação; j) acilação.

3.1.2 Imobilização de ADN em superfícies: *microarrays* de ADN

A descodificação do genoma humano gerou inúmeras expectativas nos campos da Biologia e Medicina.

Para tirar proveito da imensa informação contida na sequência de bases do ADN é necessária uma nova geração de biosensores.

O desenvolvimento em anos recentes de sensores de ADN e proteínas com o formato *microarray* constituiu uma revolução na investigação biológica.[21]

Um *array* de ADN consiste num conjunto de amostras de ADN espacialmente ordenadas numa superfície, figura 3.2. O funcionamento dos *arrays* de ADN deve-se à especificidade da hibridização entre cadeias complementares.

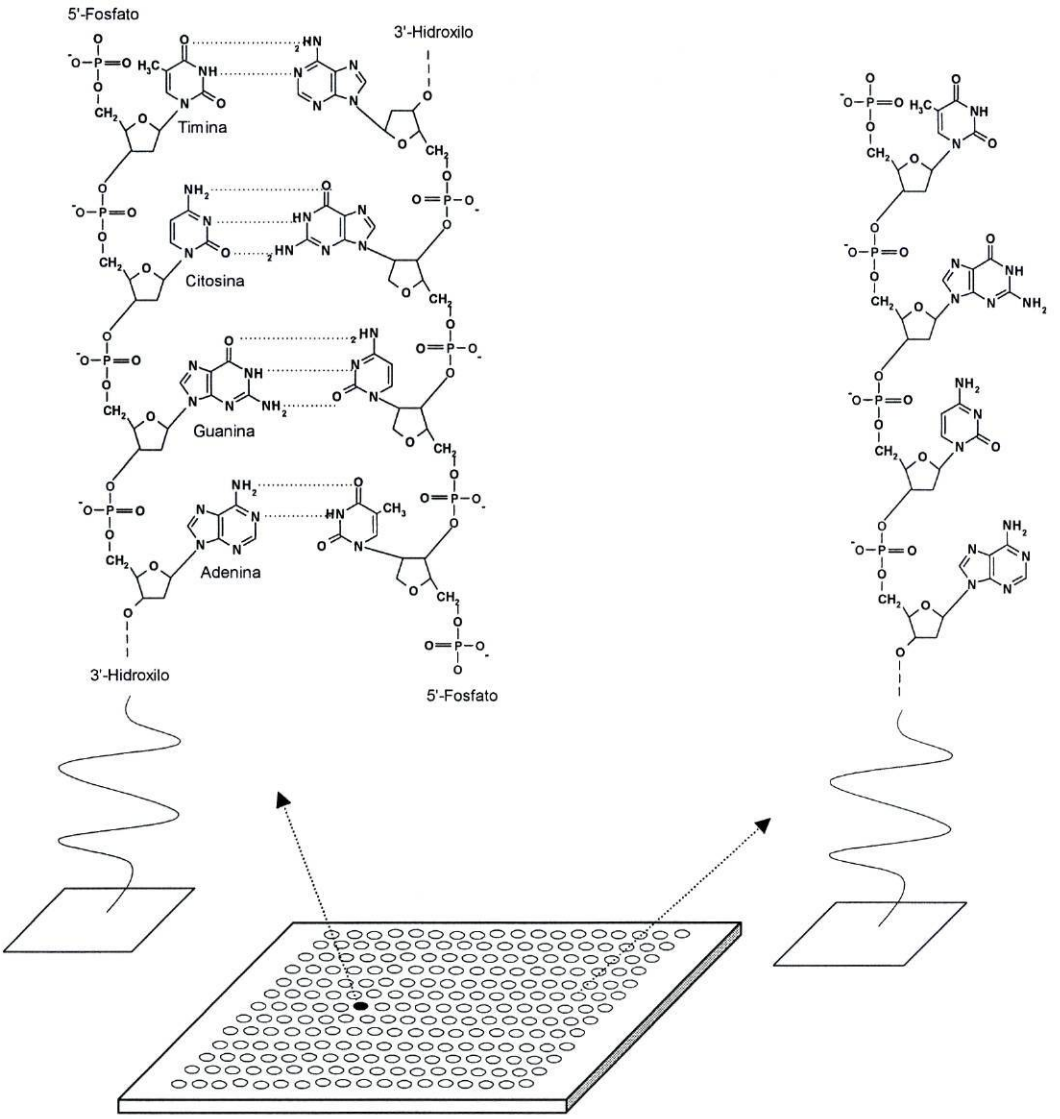


Figura 3.2: O termo *array* refere-se ao arranjo sistemático de sequências na superfície. "Microspots" das chamadas moléculas "captura" são imobilizados em linhas e colunas num suporte sólido e expostas a amostras contendo as moléculas "alvo". Para se identificar uma molécula alvo faz-se uso de regras de reconhecimento molecular. No caso do ADN cada molécula tem a capacidade de reconhecer sequências complementares através do emparelhamento das bases. A observação da área da superfície a que molécula alvo se liga permite saber automaticamente qual a sua sequência de bases.

A enorme vantagem desta tecnologia é a possibilidade de processamento em paralelo. Numa só experiência são analisadas simultaneamente várias centenas, milhares de moléculas (oligonucleótidos, genes, fármacos, etc) distintas. Esta vantagem multiplex tem sido aplicada com sucesso em áreas como sequenciamento,[22] análise de

níveis de expressão genética[23] e detecção de mutações e polimorfismos.[24] Uma outra vantagem, é o reduzido consumo de reagente já que apenas uns microlitros de solução de molécula "captura" são necessários para fabricar milhares de *arrays*. Esta vantagem adquire especial importância dada a dificuldade em obter elevadas quantidades de produtos de transcrição (para aplicação nos *arrays* de ADN) e principalmente de tradução (para aplicação nos *arrays* de proteínas).

Têm sido adoptadas diversas estatégias para imobilizar ADN em superfícies de vidro,[25-33, 35-40] silício,[41,42] ouro,[7, 44-47], por exemplo; usando processos químicos de imobilização que vão desde a simples adsorção[25] passando pela síntese *in*-situ,[33, 35, 36, 49] foto-imobilização,[26, 27, 50] utilização de hidrogéis,[48, 51] e uma variadade de outros processos químicos utilizando *cross-linkers* homo ou heterobifuncionais.[7, 28, 37, 41, 43-45]

O sensor de ADN ideal deve:

- possuir elevada densidade (moléculas/superfície) de ADN imobilizado de uma forma estável;
- permitir a ocorrência de reacções de hibridização com as moléculas alvo e de manipulação enzimática;
- elevada sensibilidade;
- reprodutibilidade no fabrico.

Nenhum dos processos químicos até agora propostos (ver tabela 3.1) satisfaz completamente estes requesitos, facto que tem motivado a intensa investigação nesta área.

A estratégia de imobilização apresentada neste capítulo foi empregue no fabrico de um *microarray* de ADN. Na última secção deste capítulo são apresentados os resultados de experiências de hibridização levadas a cabo com estes *microarrays.* monitorizadas usando imagiologia de SPR (*surface plasmon resonance imaging*).

Actualmente grande parte das experiências com *microarrays* pressupõe a utilização de ADN marcado no processo de revelação o que implica mais etapas de reacção e purificação e torna o processo mais dispendioso. Por exemplo quando se utiliza imagiologia de fluorescência os productos PCR têm que ser derivatizados com

marcadores de fluorescência. A utilização da imagiologia de SPR evita a necessidade de marcar as moléculas alvo.

Tabela 3.1: Processos químicos para imobilização de ADN em superfícies.

Superfície	**Processo químico de imobilização**	**Densidade moléculas/cm^2**	**Referência**
vidro	*vidro-polilisina/ADN:* adsorção em superfícies de vidro modificadas com polilisina.	NP	Brown *et al.* [25]
vidro	*vidro derivatizado com grupos amino -ADN:* a exposição a luz UV conduz à formação de ligações covalentes entre os grupos timidina do ADN e os grupos amino da superfície.	NP	Trent *et al.*[26]
vidro	*(–SiOH)-aminossilano-ADN:* formação de ligação covalente entre a molécula de ADN e o grupo terminal amino de uma monocamada de aminossilano.	3×10^{13}	Hogan *et al.*[27]
vidro	*(–SiOH)-APTES-PDITC-PAMAN-PDITC-(5'-amino ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN derivatizada com um grupo amino os grupos isotiocianato de uma camada do dendrímero terminado com grupos amino (poli(amidoamino) PAMAN (G8)) modificada com grupos isotiocianato por reacção *in-situ* com o *cross-linker* homofuncional 1,4-fenilenodiisotiocianato (PDITC). A camada de dendrímero foi ligada covalentemente a uma camada de poli(siloxano) (3-amino-propiltrietoxissilano (APTES)) também através do *cross-linker* PDITC.	9.0×10^{12}	Wohrle *et al.*[28]
vidro	*(–SiOH)-(TETU+LiAlH4+PCC)-(5'- amino ADN):* ligação covalente por reacção do grupo carbonilo da superfície de aldeído e o grupo amino da extermidade 5' das moléculas de ADN. A superficie terminada com grupos carbonilo é obtida mediante redução dos grupos éster da camada de poli(siloxano) ($Cl_3Si(CH_2)_{10}COOCH_2CF_3$ (TETU)) a grupos hidroxilo seguida da oxidação com clorocromato de piridinio (PCC).	3.6×10^{11}	Zammatteo *et al.*[29]

vidro	*(–SiOH)-silano-poliacrilidrazida-(3'-dialdeído ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 3' da molécula de ADN derivatizada com um grupo dialdeído e uma camada de gel de poliacrilamida modificada com grupos hidrazida.	1.8×10^{15}	Mirzabekov *et al.*[30]
vidro	*(–SiOH)- bromoacetamidolsilano-(5'-fosfotioato ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN derivatizada com um grupo fosfotioato e os gupos bromoacetil duma monocamada de bromoacetamidossilano.	NP	Pirrung *et al.*[31]
vidro	*(–SiOH)-bromoacetamidossilano-(ADN modificado com múltiplos grupos fosfotioato):* formação de ligação covalente por reacção entre os grupos fosfotioato distribuídos na sequência de nucleótidos e os grupos bromoacetil obtidos mediante conversão *in-situ* do grupo ω-NH_2 de uma monocamada de poli(siloxano) (3-amino-propilmetildietoxissilano (APMDES)).	NP	Zao *et al.*[32]
vidro	*síntese DMT in situ, (–SiOH)-APDMS-(DMT-HEG)- n × (DMT-deoxinucleósido):* as sequências de oligonucleótidos são sintetizadas *in-situ* combinatorialmente usando os métodos tradicionais de síntese de ADN[34] sobre uma monocamada de 3-aminopropildimetiletoxissilano (APDMS) derivatizada com o *spacer* α-*O*-dimetoxitritil-hexaetilenoglicol.	3.0×10^{12}	Brennan *et al.*[33]

vidro	*síntese fotoquímica in-situ, (–SiOH)-HEAPTES-HECEP- n × (MeNPoc-N-acil-deoxinucleósido):* as sequências são construídas *in-situ* nucleósido a nucleósido por síntese fosforamidite sobre uma camada de poli(siloxano) (bis(2-hidroxietil) aminopropiltrietoxissilano (HEAPTES)) modificada com um *spacer* de hexaetiloxi-*O*-cianoetil fosforamidite (HECEP). Cada nucleósido é adicionado sob a forma 5'-protegido, 3'-*O*-fosforamidite. O grupo protector α-metil-6-nitropiperoniloxicarbonil) (MeNPoc) é removido por exposição a luz (λ = 365 nm) através de máscaras fotolitográficas. Os grupos OH dos nucleósidos são desprotegidos selectivamente. Em cada passo são iluminadas diferentes zonas da superfície o que permite uma síntese combinatorial.	NP	Fodor *et al.*[35]
vidro	*síntese fotoquímica in-situ na direcção 5'→ 3', (–SiOH)-HEAPTES- n × (3'-NPPOC-nucleótido-5'-amidite):* neste caso a síntese ocorre com a ligação dos términos 5'-fosforamidite dos nucleósidos à superfície usando fotolitografia sem máscara (Maskless Array Synthesizer (MAS)). O grupo fotolábil nitrofenilpropiloxicarbonil (NPPOC) é usado como grupo protector dos términos 3' dos nucleósidos.	NP	Green *et al.*[36]
vidro	*(–SiOH)-APTES-PDITC-(5'-amino ou 5'-tiol ADN):* formação de ligação covalente (ligação tioureia) por reacção entre a extremidade 5' do ADN modificada com grupos amino ou tiol e os grupos isotiocianato de uma monocamada de poli(siloxano) (APTES) derivatizado *in-situ* com o *cross-linker* homobifuncional PDITC.	7.8×10^{11} (5'-amino ADN) 5.4×10^{11} (5'-tiol ADN)	Stenger *et al.*[37]
vidro	*(–SiOH)-SCPTES-(5'-benzaldeído ADN):* fomação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' do ADN derivatizada com um grupo benzaldeído e grupos semicarbazido de uma monocamada de poli(siloxano) (3-(4-semicarbazido)propiltrietoxissilano (SCPTES)).	1.8×10^{13}	Reed *et al.*[38]

vidro	*(–SiOH)-silano acrílico-(5'-acrilamida ADN):* formação de ligações covalentes entre a extremidade 5' do ADN derivatizada com um grupo acrilamida e a superfície durante a reacção de polimerização dos monómeros de acrilamida.	1.2×10^{13}	Boles *et al.*[39]
vidro	*(–SiOH)-(APTMS+$NaNO_2$)-ADN:* formação de ligação covalente por reacção dos grupos diazónio da superfície com as bases A, G ou C das moléculas de ADN. Os grupos diazónio são obtidos por exposição dos grupos amino da camada de poli(siloxano) (*p*-aminofenil trimetoxissilano (APTMS)) a $NaNO_2$.	NP	Lopez *et al.*[40]
silício	*(–SiH)-UDA/polilisina-maleimida(SSMCC)-(5'-tiol ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN derivatizada com um grupo tiol e os gupos maleimida de uma camada de polilisina (adsorvida electrostaticamante sobre uma monocamada dum ω-alceno (ácido 10-undecilénico (UDA)) derivatizada *in-situ* com o *cross-linker* heterobifuncional sulfossuccinimidil 4-(maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SSMCC). A extremidade NHS do *cross-linker* reage com os grupos amino da polilisina resultando, após este passo de modificação, uma superfície terminada com grupos maleimida.	5.3×10^{12}	Smith *et al.*[41]
silício	*(–SiOH)-GOPS-(5'-amino ADN):* formação de ligação covalente entre a extremidade 5' da molécula de ADN derivatizada com um grupo amino e os gupos epóxido duma monocamada de poli(siloxano) ((glicidoxipropil)trietoxissilano (GOPS)) .	1.0×10^{12}	Hogan *et al.*[42]
diamante	*(–CH)-(10-amino-1-deceno)-SSMCC-(5'-tiol ADN):* formação de ligação covalente (ligação tioéter) por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN modificada com um grupo tiol e os gupos maleimida de uma monocamada dum aminoalceno derivatizada *in situ* com o *cross-linker* heterobifuncional SSMCC.	3.1×10^{12}	Hamers *et al.*[43]

ouro	*Au-MUA/polilisina-SSMCC-(5'-tiol ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN modificada com um grupo tiol e os gupos maleimida duma camada de polilisina (adsorvida electrostaticamente sobre um SAM terminado com grupos COOH) derivatizada *in-situ* com o *cross-linker* heterobifuncional (SSMCC).	5×10^{12}	Corn *et al.*[44]
ouro	*Au-MUAM-SSMCC-(5'-tiol ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN modificada com um grupo tiol e os gupos maleimida duma monocamada de alcanotiol terminada por grupos amino (MUAM) derivatizada *in-situ* com grupos maleimida.	NP	Corn *et al.*[7]
ouro	*Au-MUA/polilisina-PDITC-(5'-amino ADN):* formação de ligação covalente por reacção entre a extremidade 5' da molécula de ADN modificada com um grupo amino e uma camada de polilisina terminado com grupos isotiocianato por reacção *in-situ* com o *cross-linker* homofuncional PDITC.	NP	Smith *et al.*[45]
ouro	*Au-PMPMS-(3'-maleimido ADN):* a automontagem de uma camada de poli(mercaptopropil)metilssiloxano (PMPMS) cria uma superfície terminada com grupos tiol. Estes grupos reagem com os grupos maleimido do ADN formando ligações tioéter.	1×10^{13}	Levicky *et al.*[46]
ouro	*Au-5'-(poli)pirrol ADN:* a electro-oxidação de uma mistura de pirrol e (5'-pirrol ADN) gera um filme condutor do copolímero sobre a superfície de eléctrodos de Au.	1.0×10^{12}	Mathis *et al.*[47]
platina	*Pt-(agarose-estreptavidina)-5'-biotina ADN:* uma camada de gel de agarose contendo estreptavidina é depositada por *spin coating* sobre os eléctrodos. A função do gel de agarose é a de evitar o contacto do directo do ADN com a superfície do metal mas ao mesmo tempo sendo condutor permite o contacto eléctrico. O ADN é imobilizado via interacção entre o término biotina das moléculas de ADN e a estreptavidina incorporada do gel de agarose.	1.6×10^{12}	Chanock *et al.*[48]
polipropileno	*síntese fosforamidite in-situ sobre superfícies de polipropileno terminado por grupos amino*	1.0×10^{10}	Matson *et al.*[49]

NP-não publicada

3.2 Síntese e reactividade de superfícies terminadas com o grupo –SH

3.2.1 Síntese de SAMs terminados com o grupo –SH

O esquema reaccional idealizado para a obtenção da superfície terminada com grupos –SH, via conversão de grupos ω–NH_2 de SAMs, é apresentado na figura 3.3 (passos A a C). Para produzir a superfície –NH_2 foi utilizada a automontagem de 11-mercaptoundecilamina (MUAM).

A molécula de *N*-succinimidil *S*-acetiltiopropionato (SATP) contém um grupo éster NHS (éster *N*-hidroxissuccinimido) que reage com os grupos amino das moléculas de MUAM em meio ligeiramente alcalino (pH 7-9) formando ligações amida (A).[52] Desta reacção resulta a introdução de um grupo tioéster na superfície. Os tioésteres reagem prontamente com hidroxilamina, hidrazina, semicarbazida e outras hidrazinas substituídas resultando a formação de um tiol e do derivado acetilado da hidroxilamina ou hidrazina.[20] O grupo protector acetil pode ser assim facilmente removido expondo a superfície a uma solução de hidroxilamina[53] resultando uma superfície terminada com grupos tiol (B).

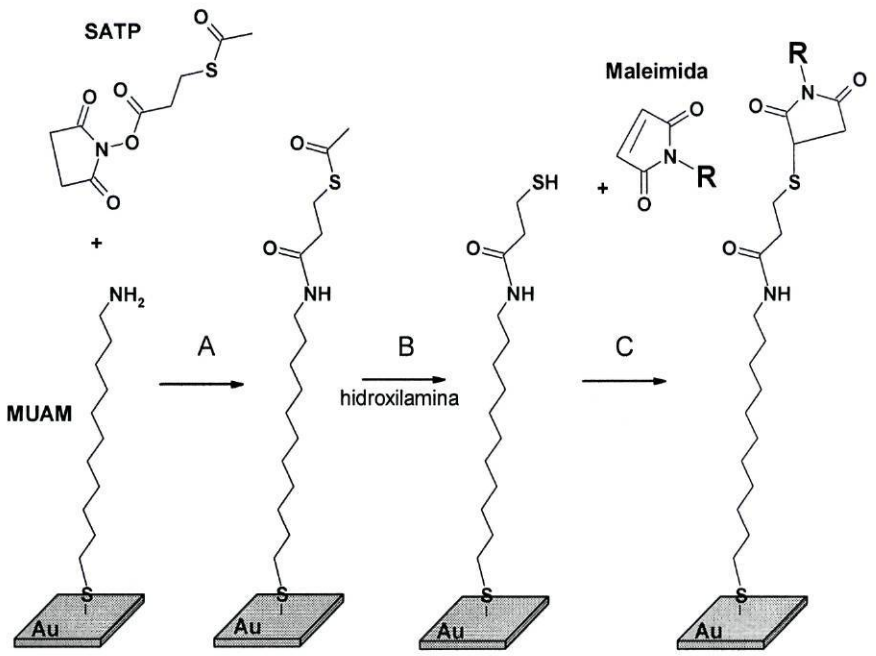


Figura 3.3: Representação esquemática da modificação da monocamada de MUAM. (A) reacção de tiolação com a molécula de SATP; (B) deacetilação com hidroxilamina obtendo-se uma superfície terminada com o grupo –SH; (C) A reacção da superfície com moléculas derivatizadas com grupos maleimida resulta na formação de ligações tioéter entre as moléculas e a superfície.

A reacção do SATP e a posterior deacetilação foram seguidas por PM-FT-IRRAS (figura 3.4).

O espectro da monocamada de MUAM (figura 3.4A) apresenta várias bandas de fraca intensidade na região entre 2000 e 1000 cm^{-1}. As bandas a 1615 cm^{-1} e 1517 cm^{-1} são atribuídas às deformações assimétrica e simétrica do grupo NH_3^+, respectivamente, enquanto que os modos deformação *scissors* e *twisting* dos grupos metileno surgem a 1467 e 1264 cm^{-1}, tabela 3.2. Este espectro é semelhante a outros previamente publicados para este SAM.[7, 8]

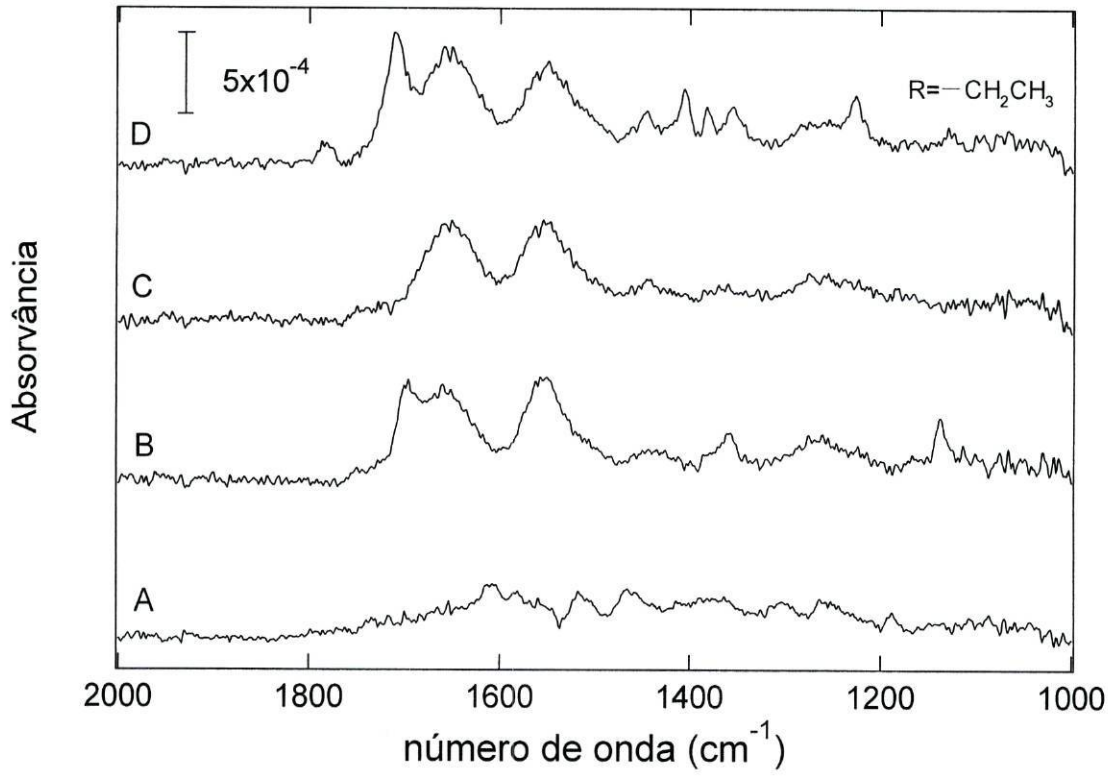


Figura 3.4: Espectros de PM-FT-IRRAS mostrando a modificação da monocamada de MUAM: (A) MUAM; (B) após reacção com a molécula de SATP; (C) superfície terminada com grupos –SH obtida após deacetilação; (D) após reacção da superfície de tiol com *N*-etil maleimida.

A reacção da molécula de SATP com a superfície resulta no aparecimento das características bandas amida I e amida II a 1660 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} respectivamente (figura 3.4B), indicando a formação de ligações amida na superfície. Também é observada uma banda intensa a 1696 cm^{-1} atribuída ao *stretching* do grupo carbonilo do grupo protector acetil. As bandas a 1360 cm^{-1} e a 1140 cm^{-1} são atribuídas aos modos CH_2 *wagging* e N–O *stretching* respectivamente.[7]

Após reacção com a hidroxilamina a banda devida ao *stretching* C=O do grupo acetilo a 1696 cm^{-1} desaparece como esperado devido à remoção dos grupos acetilo da superfície (figura 3.4C). Subtraíndo a este espectro o espectro 3.4B, permite observar mais claramente o desaparecimento das bandas a 1796 cm^{-1}, 1554 cm^{-1}, 1360 cm^{-1} e 1140 cm^{-1}, figura 3.5A. Estas variações no espectro sugerem que a reacção de desprotecção decorreu com sucesso. Após este passo a superfície passa a estar terminada com grupos –SH. Notar que a ocorrência da reacção com a hidroxilamina não

afecta a intensidade das bandas amida I e amida II indicando que a molécula de SATP reagiu com formação de ligações covalentes com os grupos amino na superfície.

Tabela 3.2: Atribuição de bandas de PM-FT-IRRAS correspondentes à tiolação da monocamada de MUAM com SATP.

Superfície	$\overline{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição	Figura
MUAM	1615	$\delta(NH_3^+)$, deformação assimétrica do NH_3^+	3.4A
	1517	$\delta(NH_3^+)$, deformação simétrica do NH_3^+	
	1467	$\delta(CH_2)$ deformação scissors dos metilenos	
	1264	$\tau(CH_2)$ deformação twisting dos metilenos	
SATP	1750	ν(C=O), stretching simétrico do grupo carbonilo	3.4B
	1696	ν(C=O), stretching assimétrico do grupo carbonilo	
	1660	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo)	
	1550	ν(C–N) + δ(N–H), banda amida II (stretching CN e bending NH)	
	1444	$\delta(CH_2)$ deformação scissors dos metilenos	
	1360	$\omega(CH_2)$ deformação wagging dos metilenos	
	1140	ν(N–O), stretching NO	

A reactividade da superfície de –SH foi avaliada através da sua reacção com maleimidas e dissulfetos de dipiridilo.

3.2.2 Reacção com moléculas contendo grupos maleimida

Os grupos tiol reagem com maleimidas em reacções de alquilação (figura 3.1).[20] Em meio neutro a ligação dupla do grupo maleimida sofre alquilação formando-se uma ligação tioéter estável com o grupo tiol. A velocidade desta reacção é 1000 vezes superior à da reacção da maleimida com grupos amino ou hidroxilo.[54] Na figura 3.5 são mostrados os espectros de PM-FT-IRRAS obtidos após reacção da superfície

terminada com grupos tiol com duas moléculas com grupos maleimida: *N*-etilmaleimida e um corante azobenzeno (figuras inseridas).

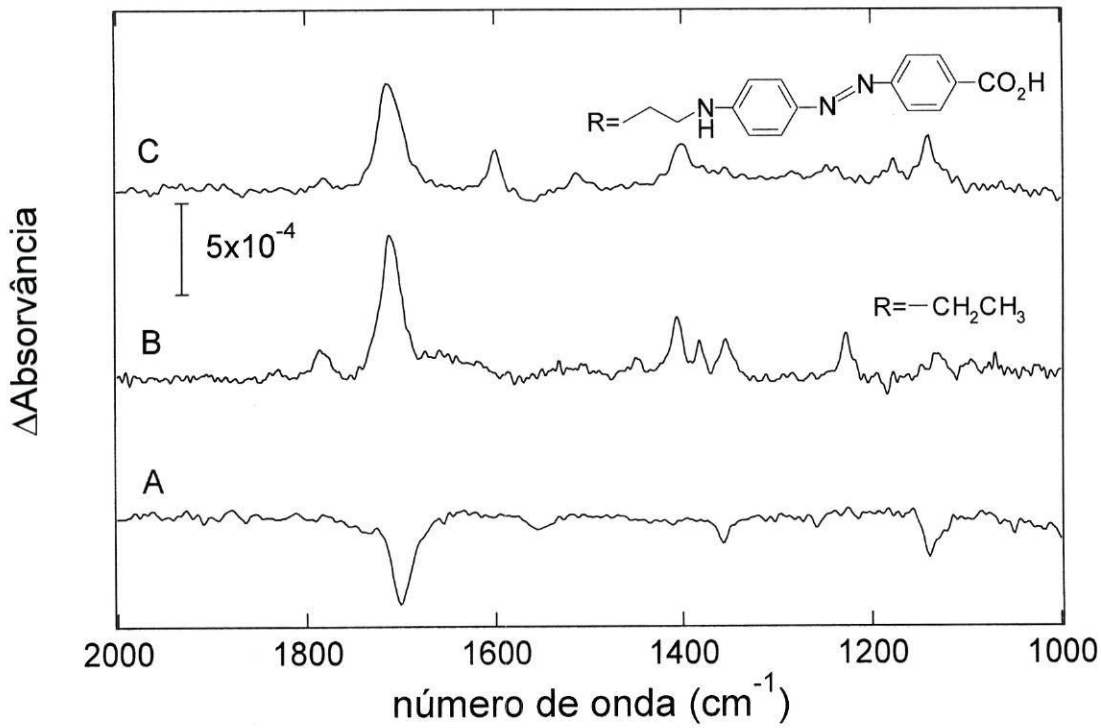


Figura 3.5: Espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes aos passos de "desprotecção" (A), e á reacção da superfície –SH com moléculas derivatizadas com grupos maleimida: *N*-etil maleimida (B) e corante azobenzeno (C).

A ligação dos grupos maleimida à superfície é evidenciada pelo aparecimento de uma banda a ~1710 cm^{-1} atribuída ao *stretching* assimétrico do grupo carbonilo. Esta banda deve-se ao acoplamento em fase do *stretching* dos dois carbonilos da maleimida.[55] Esta é a banda mais intensa nos espectros resultantes da reacção tanto da *N*-etilmaleimida como do azobenzeno (figura 3.5). É também visível nos espectros uma banda mais pequena devida ao *stretching* simétrico dos carbonilos do grupo maleimida a ~1780 cm^{-1}.[56]

No espectro correspondente à reacção do *N*-etilmaleimida, figura 3.5B, são vísiveis as bandas correspondentes aos modos de deformação *scissors* do grupo metileno a 1405 cm^{-1} e *wagging* a 1360 cm^{-1}. A banda a 1215 cm^{-1} é atribuída ao modo *stretching* CNC antissimétrico. No caso do espectro correspondente à reacção do azobenzeno, figura 3.5C, as bandas a 1600 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} são características do modo

de vibração *stretching* das ligações C=C dos anéis aromáticos. A atribuição de todas as bandas é feita na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Atribuição de bandas de PM-FT-IRRAS correspondentes às reacções de superfície das moléculas derivatizadas com grupos maleimida.

Superfície	$\overline{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição	Figura
N-etilmaleimida	1787	ν(C=O), stretching simétrico do grupo carbonilo	3.4D, 3.5B
	1705	ν(C=O), stretching assimétrico do grupo carbonilo	
	1405	δ(CH_2) deformação scissors dos metilenos	
	1360	ν_s(C–N–C)+ω(CH_2) stretching simétrico CNC e deformação wagging dos metilenos	
	1228	ν(C–N), stretching CN	
corante azobenzeno	1787	ν(C=O), stretching simétrico do grupo carbonilo	3.5C
	1707	ν(C=O), stretching assimétrico do grupo carbonilo e stretching do grupo carboxilo	
	1600, 1514	ν(C=C), stretching dos anéis	
	1379	ν_s(C–N–C)+ω(CH_2) stretching simétrico CNC e deformação wagging dos metilenos	
	1142	ν(C–N)+ ν(C–OH), stretching CN e stretching COH do grupo carboxilo	

3.2.3 Reacção com dissulfetos de dipiridilo. Imobilização de biomoléculas na superfície através de ligações dissulfeto

Os dissulfetos de piridilo são extremamente reactivos relativamente a grupos tiol. A reacção que ocorre é a permuta tiol-dissulfeto.[20]

Esta reacção foi utilizada para imobilizar as biomoléculas éster de cisteína, glutationa e DNA derivatizado com grupos tiol, na superfície através de ligações dissulfeto. O esquema reaccional é apresentado na figura 3.6.

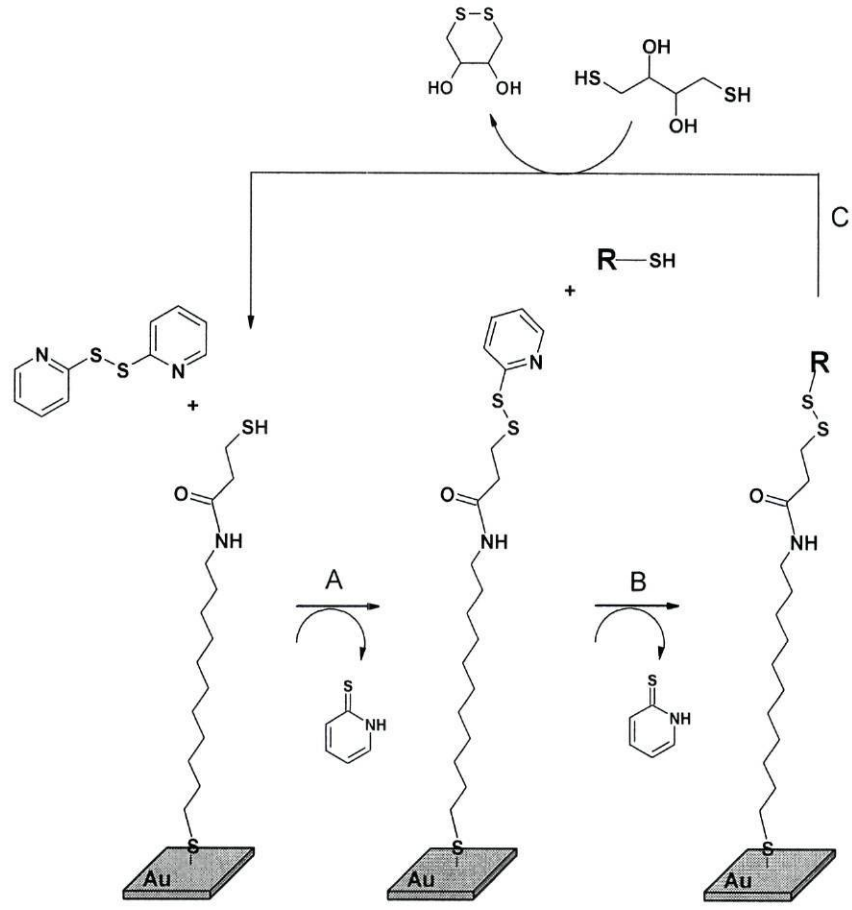


Figura 3.6: Representação esquemática das reacções de permuta tiol-dissulfeto: (A) reacção de permuta que conduz à superfície activada com grupos piridil dissulfeto; (B) reacções de permuta entre a superfície terminada com grupos piridil dissulfeto e moléculas com grupos tiol (R–SH) em solução. Quando a superfície é exposta a DTT a ligação dissulfeto é quebrada, a molécula imobilizada é libertada e a superfície –SH é regenerada (C).

No primeiro passo (A) a superfície de tiol é feita reagir com 2,2'-ditiodipiridina resultando uma superfície activada com grupos piridil dissulfeto. No segundo passo, novamente através de uma reacção de permuta tiol-dissulfeto, o sulfeto de piridilo na superfície é substituído por uma molécula terminada com um grupo tiol (B). Em ambas as reacções ocorre formação duma molécula de piridina-2-tiona inerte.[57]

O espectro de PM-FT-IRRAS obtido após reacção da molécula de (2,2'-ditiodipiridina) com a superfície de tiol é mostrado na figura 3.7A. Este espectro apresenta bandas adicionais (relativamente ao da superfície resultante da reacção de desprotecção) de fraca intensidade na região entre 1600 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} atribuídas aos *stretching* C=C e C=N–C do anel. Estas bandas desaparecem após substituição do grupo piridilo por reacção com moléculas derivatizadas com o grupo –SH.

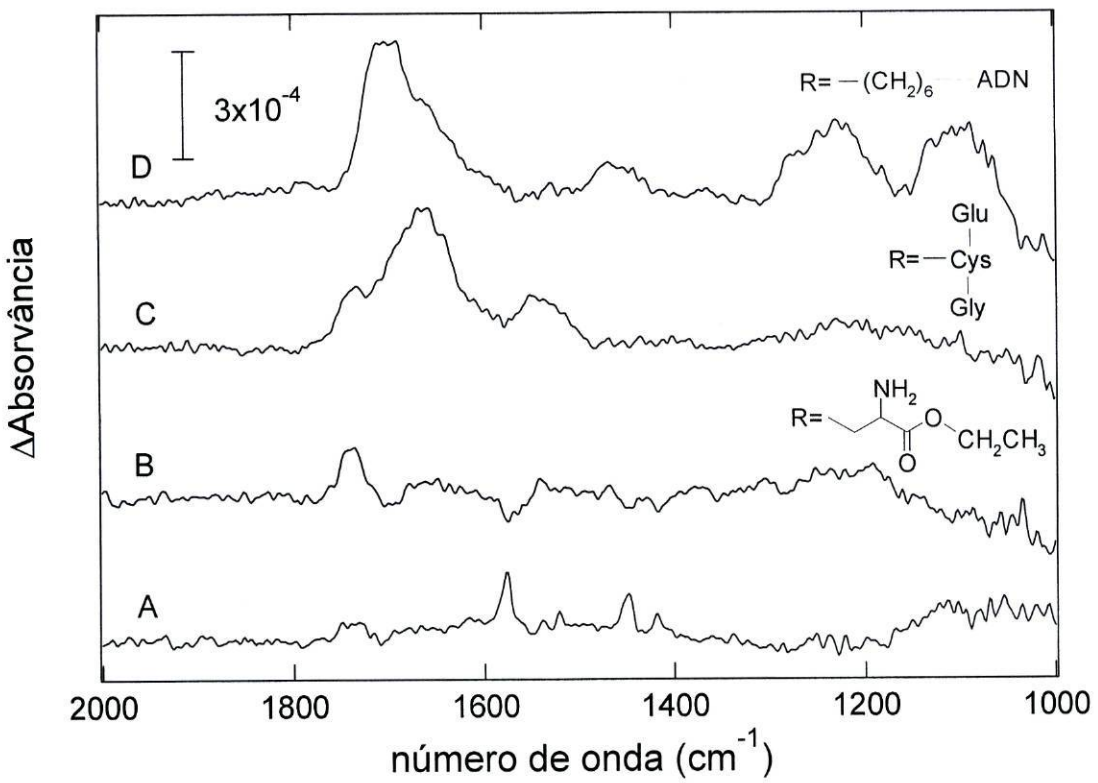


Figura 3.7: Espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes às reacções de permuta tiol-dissulfeto utilizadas para imobilizar péptidos e ADN: (A) superfície piridil sulfeto; (B) após reacção com o éster de cisteína; (C) após reacção com a glutationa; (D) após reacção com 5'-tiol ADN. A superfície de referência foi a terminada com o –SH.

Imobilização de ADN e péptidos

O espectro correspondente à reacção de permuta tiol-dissulfeto, com a superfície activada com grupos piridil dissulfeto, do éster de cisteína é apresentado na figura 3.7B. O aparecimento da banda a 1738 cm^{-1} característica do *stretching* do grupo carbonilo em ésteres indica a ligação das moléculas à superfície. A banda larga a ~1210 cm^{-1} é

principalmente devida aos modos C–O–C *stretching* assimétrico e CH_2 *twisting*. O espectro correspondente à reacção do tripéptido glutationa é apresentado na figura 3.7C. O aumento de intensidade das bandas amida I e amida II assim como o aparecimento da banda a 1734 cm^{-1} atribuída ao grupo carboxilo, demonstram a ligação à superfície. No caso da reacção do ADN derivatizado com grupos tiol (figura 3.7D) há quatro novas bandas que aparecem no espectro confirmando a ocorrência de imobilização. A banda a 1704 cm^{-1} é devida ao *stretching* das ligações duplas dos anéis das bases e a banda a 1273 cm^{-1} ao modo NH *bending* das timidinas. As bandas a 1221 cm^{-1} e 1074 cm^{-1} correspondem aos modos *stretching* antissimétrico e simétrico, respectivamente dos grupos fosfato.[58]

Tabela 3.4: Atribuição das bandas dos espectros de PM-FT-IRRAS correspondentes à imobilização do ADN e glutationa através de reacções de permuta tiol-dissulfeto com a superfície activada com grupos piridil dissulfeto.

Superfície	$\overline{\nu}$ **(cm^{-1})**	**Atribuição**	**Figura**
Glutationa	1734	ν(C=O), stretching do grupo carboxilo	3.8C
	1664	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo)	
	1542	ν(C–N) + δ(N–H), banda amida II (stretching CN e bending NH)	
ADN	1704	ν(C=O) stretching dos carbonilos das bases azotadas	3.8D
	1465	ν(N=C–N) +ν(C=C), stretching N=C–N e stretching dos anéis das bases azotadas	
	1273	δ(N–H), NH bending das timidinas	
	1221	stretching assimétrico dos grupos fosfato	
	1074	stretching simétrico dos grupos fosfato	

O valor aproximado do número de moléculas de ADN imobilizadas na superfície pode ser obtido através de experiências em que se mede a fluorescência das soluções usadas na desnaturação do produto de hibridização entre as sequências imobilizadas na superfície e a sequência complementar marcada com um marcador de fluorescência (ver procedimento experimental e instrumentação, secção 3.5). Através destas experiências

foi obtido um valor para o grau de cobertura de 1.5×10^{12} moléculas de ADN/cm^2, admitindo uma eficiência de hibridização de 100%. Estudos anteriores referem que eficiência da hibridização para ADN imobilizado ligado a uma superfície é de $60\%\pm20\%$,[58] logo o valor medido deve ser tomado como o limite inferior para o grau de cobertura. Os valores obtidos usando outras estratégias de imobilização em superfícies de Au situam-se entre 1.0×10^{12} e 1.0×10^{13} moléculas/cm^2 (tabela 3.1).

Uma vantagem desta estratégia de ligação é a possibilidade da fácil libertação das biomoléculas mediante redução das ligações dissulfeto o que permite utilizar o mesmo SAM como plataforma de imobilização em várias experiências (figura 3.6, reacção C). A molécula de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano (DTT) é habitualmente utilizada para reduzir as ligações dissulfeto em proteínas devido ao seu elevado poder redutor ($E^0=-0.33V$).[20] A exposição da superfície de glutationa ou ADN uma solução de DTT teve como resultado a libertação destas biomoléculas da superfície, com a regeneração da superfície terminada por grupos –SH, como mostram os espectros de PM-FT-IRRAS (figura 3.8).

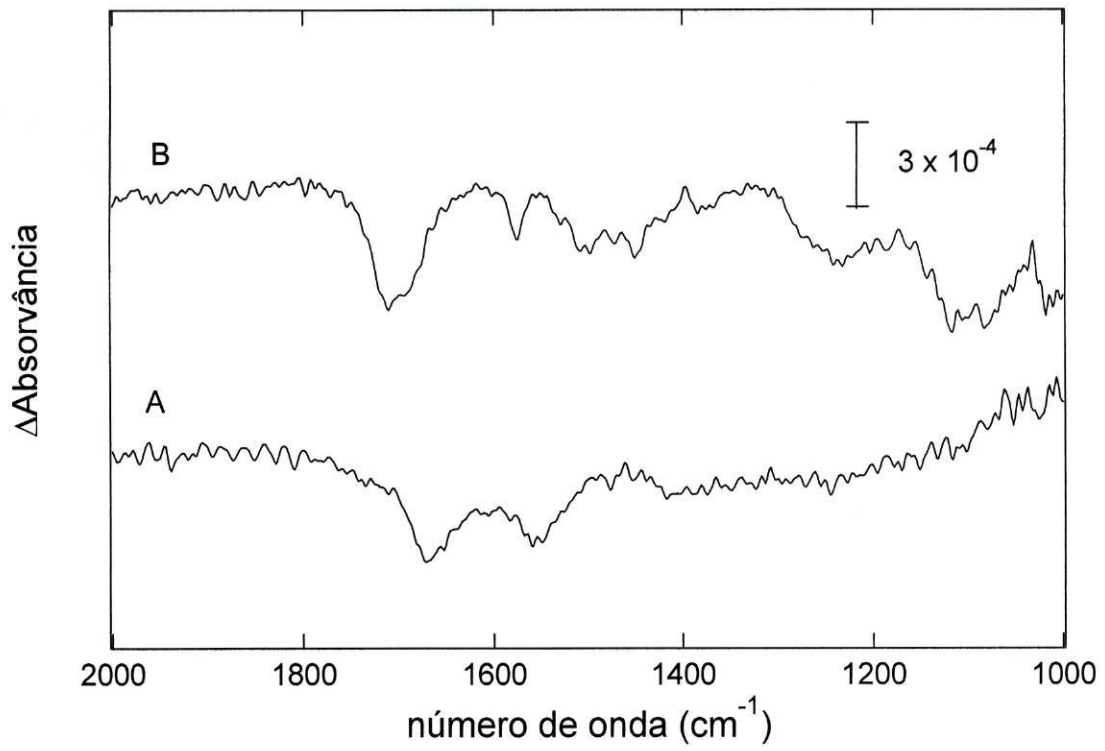


Figura 3.8: Espectros de PM-FT-IRRAS que evidenciam a libertação das moléculas de glutationa e ADN da superfíce por exposição das superfícies a DTT. Os espectros de referência neste caso foram os das superfícies obtidas após imobilização da glutationa do ADN–SH.

3.3 Fabrico do *microarray* de ADN

O grande interesse actual no desenvolvimento de processos químicos para ligar ADN a superfícies está relacionado com a sua aplicação na construção de sensores de ADN com o formato *microarray* (figura 3.2).[21] Neste secção mostra-se como a química apresentada nas secções anteriores pode ser utilizada para este propósito e como os sensores obtidos podem ser utilizados para monitorizar a hibridização *in-situ*.

O *microarray* de ADN foi fabricado em filmes de Au com uma espessura de 45 nm combinando os processos de automontagem, fotolitografia UV de superfícies modificadas com alcanotióis[59] e as reacções de superfície apresentadas nas figuras 3.3 e 3.6. Na figura 3.9 apresenta-se esquematicamente o processo de fabrico.

Após a automontagem de um SAM de 1-octadecanotiol (ODT) a superfície é exposta a luz UV através de uma máscara de quartzo (A). A luz UV gera ozono que oxida o enxofre da ligação Au-S. Isto ocorre nas regiões em que a luz UV não é bloqueada pela máscara (B). Com a quebra da ligação à superfície as moléculas nestas regiões são facilmente removidas por lavagem resultando uma superfície com áreas de Au descobertas num fundo de ODT (C). A automontagem de MUAM nas zonas descobertas origina as zonas hidrofílicas terminadas com grupos amino (D). É nestas regiões que se vai ligar o ADN seguindo os passos apresentados nas figuras 3.3 e 3.6.

Mediante este tipo de *patterning* hidrofóbico/hidrofílico é possível confinar o ADN nas regiões hidrofílicas da superfície evitando a contaminação de áreas hidrofílicas adjacentes.[33,60] Desta forma é possível criar uma superfície multifuncionalizada (E) podendo atingir-se os 1000 elementos/cm^2.[60] De referir que o *patterning* hidrofílico/hidrofóbico tem sido implementado de outras formas.[7]

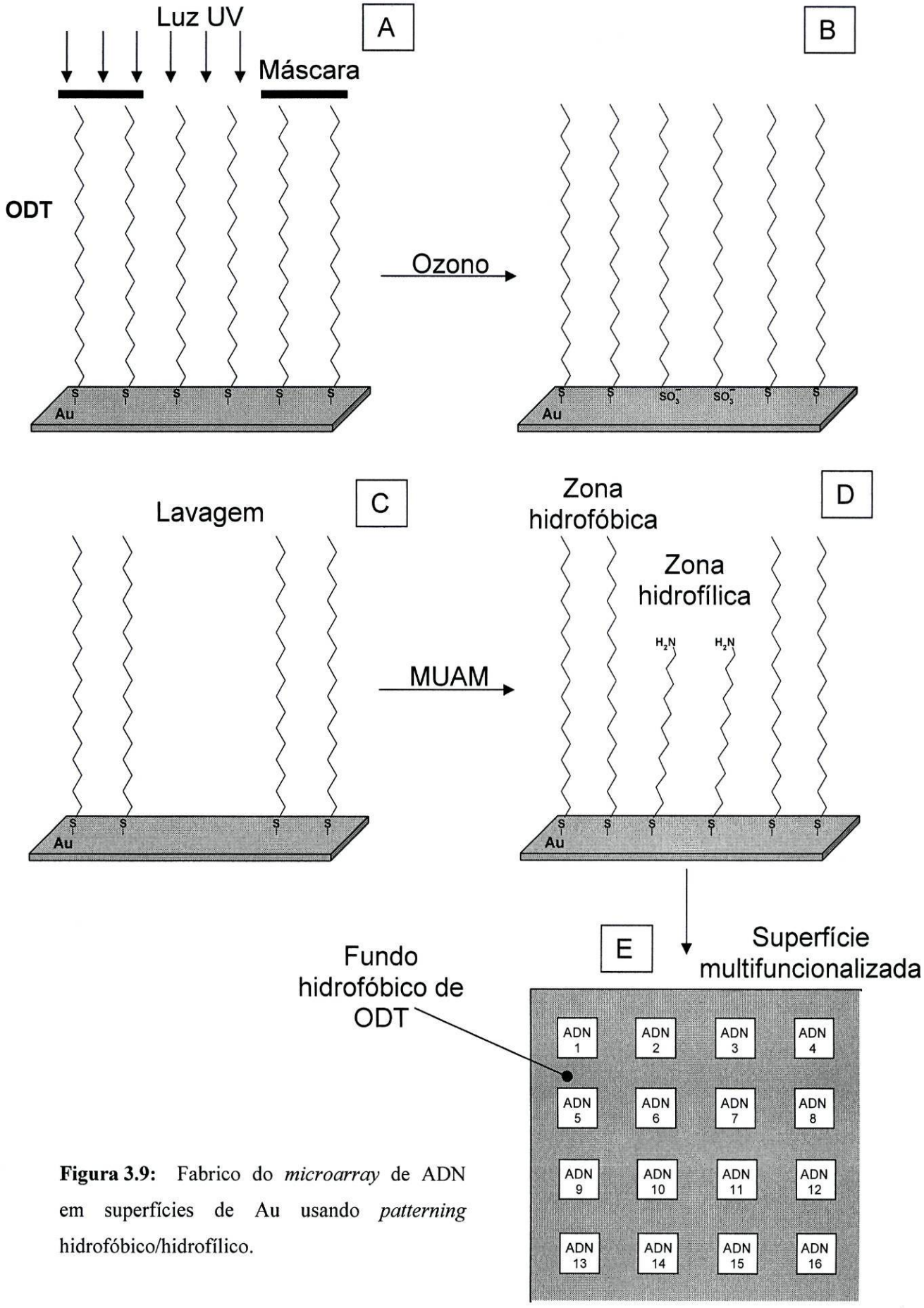


Figura 3.9: Fabrico do *microarray* de ADN em superfícies de Au usando *patterning* hidrofóbico/hidrofílico.

A título de exemplo foi criado um *array* das sequências 1 e com o padrão mostrado e elementos com $500 \times 500\,\mu m$, figura 3.10.

Sequência **1**: 5' GTG TTA GCC TAC AGT G

Sequência **2**: 5' GTC TAT GCG TGA ACT G

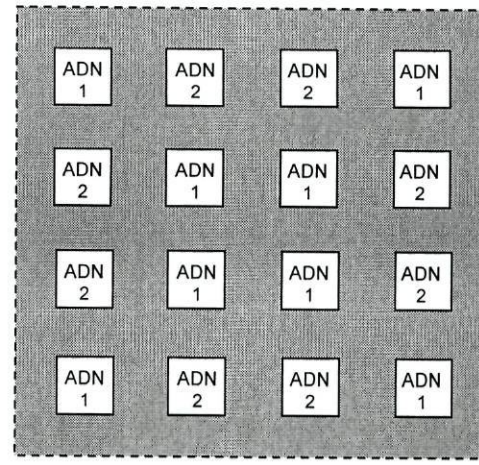


Figura 3.10: Padrão do *microarray* usado nas experiências de hibridização.

Na figura 3.11 são apresentados os resultados das medições de imagiologia de SPR de duas experiências de hibridização efectuadas com o *microarray* da figura 3.10. As figuras correspondem às imagens de reflectância obtidas após subtracção da imagem de SPR obtida antes da exposição do *array* a qualquer uma das sequências de ADN complementares **1'** = (5' CAC AAT CGG ATG TCA C) ou **2'** = (5' CAG ATA CGC ACT TGA C). A figura 3.11A corresponde à introdução da sequência **1'**. Após desnaturação, por exposição a uma solução de ureia 8 M, foi possível proceder à hibridização da sequência **2'**, figura 3.11B.

É possível proceder a vários ciclos de hibridização-desnaturação, usando o mesmo *array*, sem degradação do sinal. Esta experiência demonstra que o *array* fabricado revela especificidade para a hibridização, isto é, a ligação das sequências em solução ocorre somente nas regiões onde foi ligado ADN com a sequência complementar, e com adsorção desprezável no fundo hidrofóbico de ODT.

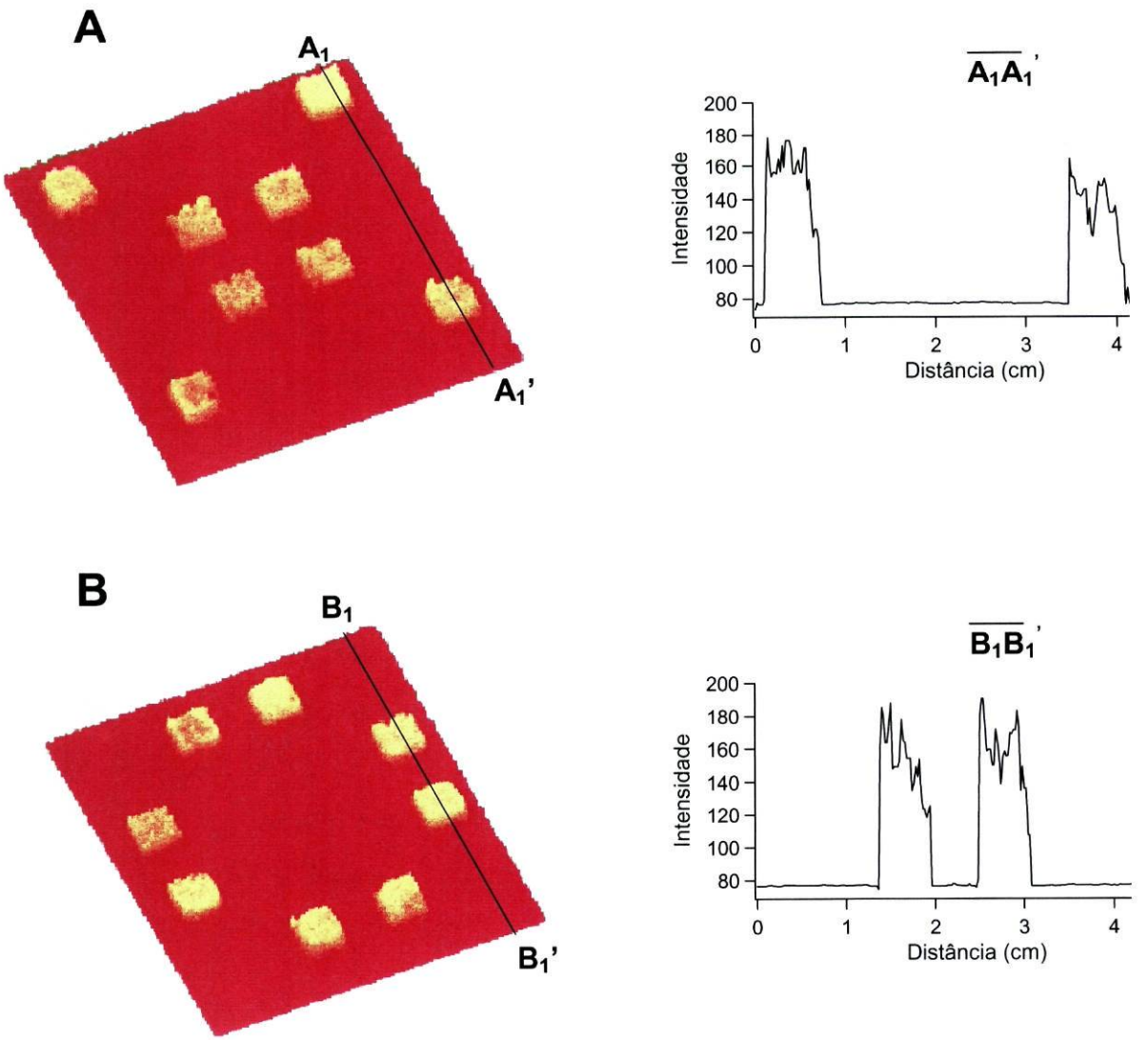


Figura 3.11: Imagens e perfis de imagiologia de SPR das experiências de hibridização efectuadas com o *microarray* fabricado. A imagem 3.11A obtida após exposição à sequência **1'**. Após desnaturação e lavagem a sequência **2'** foi introduzida na célula de SPR obtendo-se a imagem 3.11B.

3.4 Conclusões

O processo químico que foi apresentado neste capítulo, para a obtenção de monocamadas terminadas com o grupo –SH a partir de SAMs de alcanotióis com grupos ω-NH_2, produziu uma superfície terminada por grupos –SH que apresenta a reactividade característica dos tióis relativamente a maleimidas e a dissulfetos de dipiridilo. A reactividade relativamente a maleimidas possibilita a imobilização na superfície de moléculas derivatizados com estes grupos ao passo que através de reacções de permuta tiol-dissulfeto com dissulfetos de dipiridilo é possível preparar uma superfície activada com grupos sulfeto de piridilo. Esta superfície é extremamente reactiva relativamente a moléculas com grupos tiol e foi utilizada para ligar ADN–SH com uma densidade $\geq 1.5 \times 10^{12}$ mol/cm^2 e péptidos com resíduos cisteína a superfícies, através de ligações dissulfeto (–S–S–) de um modo reversível já que as ligações dissulfeto podem ser reduzidas com regeneração da superfície –SH.

Através de fotolitografia UV os SAMs de alcanotióis permitem o controlo espacial da química da superfície de ouro. Este facto foi aproveitado na criação de uma superfície composta por quadrados hidrofílicos ($500 \times 500\,\mu m$) de MUAM num fundo hidrofóbico de ODT, para fabricar um *array* de ADN. O sensor de ADN construído com base na química de imobilização proposta foi utilizado com sucesso em experiências de hibridização.

3.5 Procedimento experimental e instrumentação

I. Reagentes e Material

N-Succinimidil *S*-acetiltiopropionato (SATP, Pierce), *N*-etil maleimida (Aldrich), hidrocloreto de trietanolamina (TEA, Sigma), 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano (DTT, Aldrich), 2,2'-ditiodipiridina (Aldrich), L-cisteína etil éster (Sigma), glutationa (γ-glu-cys-gly) (Sigma), sal dissódio do ácido etilenediaminotetracético diidratado (EDTA, Aldrich), hidróxido de potássio (EM science), hidrogenofosfato de sódio diidratado (Fluka), di-hidrogenofosfato de sódio mono-hidratado (Fluka), *N,N*-dimetilformamida (DMF, Aldrich), dodecilsulfato de sódio (SDS, Fluka), 1-octadecanotiol (ODT, Aldrich), cloreto de sódio (Fluka), mercaptopropilsilano (MPS, Aldrich), ureia (Sigma). As sequências de ADN modificadas na extremidade 5' com um grupo tiol **1** = (5' GTG TTA GCC TCA AGT G), **2** = (5' GTC TAT GCG TGA ACT G) e **3** = (5' GTG TAT CCG ACA TGT G) foram todas sintetizadas no centro de biotecnologia da Universidade do Wisconsin utilizando o modificante 5'-tiol C6 (Glen Research) com um *spacer* fosforamidite e foram desprotegidas antes de usadas, como descrito no catálogo da Glen Research Corporation.[61] As sequências complementares **1'** = (5' CAC AAT CGG ATG TCA C) , **2'** = (5' CAG ATA CGC ACT TGA C) e **3'** = (5' CAC ATA GGC TGT ACA C) também foram fornecidas pelo centro de biotecnologia. A sequência **3'** foi marcada com o marcador de fluorescência 5' ABI 6-FAM (Glen Research). O corante azobenzeno derivatizado com um grupo maleimida foi uma generosa oferta do Professor Aaron Harper da Universidade Texas A & M e a 11-mercaptoundecilamina (MUAM) foi uma generosa oferta do Professor Professor Whitesides de Universidade de Harvard.

Na preparação de soluções e nos procedimentos de lavagem foi utilizada água Millipore (resistividade > 18 MΩ·cm).

Nas medições de PM-FT-IRRAS foram utilizados slides de Au (18 mm × 18 mm , 5 nm Cr, 100 nm Au) adquiridos à empresa Evaporated Metal Films. Nas experiências de SPR imaging foram usados slides de vidro SF10 (Schott Glass Technologies) que foram

silanizados com MPS em etanol e depois revestidos, por deposição de vapor, com um filme de Au com 45 nm sobre uma camada de crómio com 5 nm de espessura usando um sistema de deposição Balzers.[62]

II. Química de modificação da superfície

a. Síntese da superfície terminada com o grupo –SH

O SAM de MUAM foi obtido deixando o slide de Au imerso numa solução 1 mM de MUAM em etanol durante pelo menos 24 hrs. A reacção da superfície terminada com o grupo amino e o grupo éster NHS da molécula de SATP foi efectuada molhando a superfície com uma solução 2.0 mM SATP, em 10% DMF 90% tampão TEA 0.1 M (pH 7.0) durante 1-2 hrs. A reacção de desprotecção do grupo tiol foi efectuada mergulhando o slide numa solução 0.5 M em hidroxilamina, 0.05 M DTT, tampão fosfato 0.05 M (pH 7.5) e 0.025 M EDTA (2×SSPE) durante 20 mins.

b. Reacções da superfície terminada com o grupo tiol

As reacções das moléculas contendo grupos maleimida com a superficie terminada por grupos –SH foi efectuada molhando a superfície com a solução da maleimida durante 30 mins. Na reacção da molécula de *N*-etil maleimida foi usada uma concentração de 10 mM em tampão TEA 0.1 M (pH 7.0), no caso da reacção do corante azobenzeno foi usada uma solução de concentração 1 mg/mL em tampão fosfato (pH 7.5) 1 mM em EDTA.

A superfície terminada com o grupo piridil sulfeto foi obtida expondo a superfície de tiol a uma solução 1mg/mL da molécula 2,2'-dipiridil dissulfeto numa mistura 1:1 de tampão TEA 0.1 M (pH 8.0) e DMF durante 2 hrs.

As reacções das moléculas L-cisteína etil éster e glutationa com a superfície piridil dissulfeto foram efectuadas usando uma concentração de 8 mg/mL em tampão TEA 0.1 M (pH 7.0) durante 3 hrs. A reacção com a molécula de ADN modificada com um grupo tiol foi levada a cabo molhando a superfície com uma solução 1 mM de ADN em

tampão TEA 0.1M (pH 8.0) numa câmara húmida durante pelo menos 6hrs. Para minimizar o consumo de ADN coloca-se somente 1 μL de solução de ADN na superfície cobrindo-a de seguida com um slide de vidro de forma a espalhar uniformemente a solução de ADN por toda a superfície. A superfície foi de seguida imersa durante 1 hr numa solução tampão (pH 7.4) contendo 20 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl e 1 mM EDTA de forma a remover as moléculas de ADN não ligadas covalentemente à superfície.

A redução das ligações dissulfeto entre as biomoléculas e a superfície foi efectuada expondo a superfície a uma solução de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano (reagente de Cleland) (DTT) ($E^0 = -0.33\,V$) 50 mM em tampão TEA 0.1 M (pH 7.0).

Entre cada reacção de modificação da superfície esta foi sempre minuciosamente lavada com água e seca numa corrente de N_2.

III. Caracterização da superfície usando PM-FT-IRRAS

Entre cada reacção de superfície, foram medidos espectros de PM-FT-IRRAS usando o sistema e procedimento descritos no capítulo 2.

IV. Medições de fluorescência

Para estimar a densidade de moléculas de ADN imobilizadas na superfície procedeu-se à hibridização das moléculas imobilizadas com a sequência complementar marcada com um marcador de fluorescência. Medindo a fluorescência das soluções usadas na desnaturação do complexo formado é possível obter a estimativa pretendida por comparação com a fluorescência de soluções de concentração conhecida. Esta experiência foi levada a cabo expondo a superfície de ssADN (ADN sob a forma de cadeia simples) (sequência **3**) a uma solução 2 μM da sequência complementar marcada (sequência **3'**). Após 20 mins. de hibridização a superfície foi imersa numa solução 0.2% SDS/2×SSPE durante 10 mins. para remover o ADN marcado adsorvido na

superfície. De seguida o slide foi imerso durante 20 mins. em 7 mL duma solução 50 mM em KOH para se proceder à desnaturação.

Para cada solução resultante da desnaturação mediu-se a fluorescência a 517 nm usando um espectrofotómetro de fluorescência de marca Hitachi modelo F-4500.

V. Fabrico do *array* de ADN

Este procedimento começa pela automontagem de uma monocamada de ODT, que constituirá o fundo hidrofóbico, para o que se deixa a superfície de Au imersa numa solução 1 mM do alcanotiol em etanol.

Irradiando a superfície com luz UV emitida por uma lâmpada de arco mercúrio-xenon (potência de 400 W, marca Oriel) durante 1.5 hrs, através duma máscara de quartzo com uma grelha de Cr é possível remover porções de ODT da superfície. A superfície é seguidamente imersa na solução de MUAM durante várias horas. Após este passo a superfície é constituida por elementos hidrofílicos, quadrados de MUAM ($500 \times 500\ \mu m$) distribuídos num fundo hidrofóbico de ODT.

A imobilização do ADN nas zonas da superfície cobertas por MUAM foi feita usando a química atrás descrita. Para tal utilizou-se uma bomba pneumática capaz de dispensar volumes da ordem do nanolitro (pico pump World precision instruments) para cobrir os as zonas, onde a MUAM foi automontada, com 40 nL das soluções de reacção.

VI. Medições de imagiologia de SPR

As experiências de hibridização usando as *microarrays* fabricadas de acordo com o procedimento acima descrito foram monitorizadas *in-situ* usando imagiologia de SPR. O sistema utilizado nestas medições encontra-se descrito nas referências 7, 58 e 63.

As experiências de hibridização com o ADN imobilizado na superfície foram efectuadas injectando soluções 1 μM das sequências complementares **1'** ou **2'** e deixando a reacção decorrer durante 10 mins. após o que se precedeu à lavagem da superfície com tampão fosfato antes da medição da imagem de SPR. Após a reacção de hibridização com a sequencia **1'** o dsADN (ADN emparelhado com a sua cadeia complementar) foi desnaturado por exposição a uma solução de ureia 8 M durante 15 minutos de forma a regenerar a superfície de ssADN para se proceder à experiência de hibridização com a sequência **2'**.

3.6 Bibliografia

(1) (a) Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *Science* **1988**, *240*, 62-67. (b) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films*; Academic Press: Boston, 1991.

(2) (a) Hoshi, T; Anzai, J.-i.; Osa, T. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 770-774. (b) Fragoso, A.; Caballero, J.; Almirall, E.; Villalonga, R.; Cao, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 5051-5054.

(3) (a) Mertig, M.; Kirsch, R.; Pompe, W.; Englehardt, H. *European Physical Journal D* **1999,** *9*, 45-48. (b) Pathak, S.; Dentinger, P. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1948-1950.

(4) (a) Smith, L. M.; Corn, R. M.; Condon, A. E.; Lagally, M. G.; Frutos, A. G.; Liu, Q.; Thiel, A. J. *J. Comput. Biol.* **1998**, *5*, 255-267. (b) Liu, Q.; Wang, L.; Frutos, A. G.; Condon, A. E.; Corn, R. M.; Lloyd M. Smith, L. M. *Nature* **2000,** *403* 175-179.

(5) Chirakul, P.; Pérez-Luna, V. H.; Owen, H.; López, G. P. *Langmuir* **2002**, *18*, 4324-4330.

(6) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989,** *111*, 321-335.

(7) Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999,** *121*, 8044-8051.

(8) Frutos, A. G.; Brockman, J. M.; Corn, R. M. *Langmuir* **2000,** *16*, 2192-2197.

(9) Browning-Kelley, M. E.; Wadu-Mesthrige, K.; Hari, V.; Liu, G. Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 343-350.

(10) Hong, M.-Y.; Yoon, H. C.; Kim, H.-S. *Langmuir* **2003**, *19*, 416-421.

(11) Frederix, F.; Bonroy, K.; Laureyn, W.; Reekmans, G.; Campitelli, A.; Dehaen, W.; Maes, G. *Langmuir* **2003**, *19*, 4351-4357.

(12) Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.

(13) Jones, V. W.; Kenseth, J. R.; Porter, M. D.; Mosher, C. L.; Henderson, E. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1233-1241.

(14) Spinke, J.; Liley, M.; Guder, H.-J.; Angermaier, L.; Knoll, W. *Langmuir* **1993**, *9*, 1821-1825.

(15) Hodneland, C. D.; Lee, Y.-S.; Min, D.-H.; Mrksich, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5048-5052.

(16) Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. **1997**, *13*, 6485-6490.

(17) (a) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721. (b) Herrwerth, S.; Rosendahl, T.; Feng, C.; Fick, J.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Dahint, R.; Grunze, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1880-1887.

(18) Qian, X.; Metallo, S. J.; Choi, I. S.; Wu, H.; Liang, M. N.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1805-1810.

(19) (a) Kohli, P.; Taylor, K.K.; Harris, J. J.; Blanchard, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11962-11968. (b) Chen S. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 663-667.

(20) (a) Torchinskii, Y. M. *Sulphydryl and Disulfide Groups of Proteins*; Consultants Bureau: New York, 1974. (b) Barret G. C. em *Comprehensive Organic Chemistry, The Synthesis and Reaction of Organic Compounds Vol. 3;* Jones, D. N. Ed.; Pergamon Press: Oxford, 1979.

(21) (a) Service, R. F. *Science* **1998**, *282*, 396-399. (b) Ramsay, G. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 40-44. (c) Niemeyer, C. M.; Blohm, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2865-2869. (d) Lockhart, D. J.; Winzeler, E. A. *Nature* **2000**, *402*, 827-836. (e) Pirrung, M. C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 1276-1289. (f) Macoska, J. A.; *CA Cancer J. Clin.* **2002**, *52*, 50-59. (g) Templin, M. F.; Stoll, D.; Schrenk, M.; Traub, P. C.; Vöhringer, C. F.; Joos, T. O. *Trends Biotech.* **2002**, *20*, 160-166.

(22) (a) Pastinen, T.; Kurg, A.; Metspalu, A.; Peltonen, L.; Syvänen, A.-C. *Genome Res.* **1997**, *7*, 606-614. (b) Der, S. D.; Zhou, A.; Williams, B. R. G.; Silverman, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 15623-15628. (c) Oshiro, G.; Wodicka, L. M.; Washburn, M. P.; Yates III, J. R.; Lockhart, D. J.; Winzeler, E. A. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1210-1220.

(23) (a) Zhu, H.; Cong, J.-P.; Mamtora, G.; Gingeras, T.; Shenk, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 14470-14475. (b) Eckmann, L.; Smith, J. R.; Housley, M. P.; Dwinell, M. B.; Kagnoff, M. F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14084-14094. (c) Ang, S.; Lee, C.-Z.; Peck, K.; Sindici, M.; Matrubutham, U.; Gleeson, M. A.; Wang, J.-T. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1679-1686.

(24) (a) Nollau, P.; Wagener, C. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1114-1128. (b) Cutler, D. J.; Zwick, M. E.; Carrasquillo, M. M.; Yohn, C. T.; Tobin, K. P.; Kashuk, C.; Mathews, D. J.; Shah, N. A.; Eichler, E. E.; Warrington, J. A.; Chakravarti, A. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1913-1925. (c) Guo, Z.; Gatterman, M. S.; Hood, L.; Hansen, J. A.; Petersdorf, E. W. *Genome Res.* **2002**, *12*, 447-457.

(25) Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. *Science* **1995**, *270*, 467-470.

(26) Duggan, D. J.; Bittner, M.; Chen, Y.; Meltzer, P.; Trent, J. M. *Nature Genet.* **1999**, *21*, 10-14.

(27) Belosludtsev, Y.; Iverson, B.; Lemeshko, S.; Eggers, R.; Wiese, R.; Lee, S.; Powdrill, T.; Hogan, M. *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 250-256.

(28) Benters, R.; Niemeyer, C. M.; Wöhrle, D. *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 686-694.

(29) Zammatteo, N.; Jeanmart, L.; Hamels, S.; Courtois, S.; Louette, P.; Hevesi, L; Remacle, J. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 143-150.

(30) Yershov, G.; Barsky, V.; Belgovskiy, A.; Kirillov, E.; Kreindlin, E.; Ivanov, I.; Parinov, S.; Guschin, D.; Drobishev, A.; Dubiley, S.; Mirzabekov, A. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **1996**, *93*, 4913-4918.

(31) Pirrung, M. C.; Davis, J. D.; Odenbaugh, A. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 2185-2191.

(32) Zhao, X.; Nampalli, S.; Serino, A. J.; Kumar, S. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 955-959.

(33) Butler, J. H.; Cronin, M.; Anderson, K. M.; Biddison, G. M.; Chatelain, F.; Cummer, M.; Davi, D. J.; Fisher, L.; Frauendorf, A. W.; Frueh, F. W:; Gjerstad, C.; Harper, T. F.; Kernahan, S. D.; Long, D. Q.; Pho, M.; Walker II, J. A.; Brennan, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8887-8894.

(34) Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 381A-390A.

(35) Pease, A. C.; Solas, D.; Sullivan, E. J.; Cronin, M. T.; Holmes, C. P.; Fodor, S. P. A. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **1994**, *91*, 5022-5026.

(36) (a) Nuwaysir, E. F.; Huang, W.; Albert, T. J.; Singh, J.; Nuwaysir, K.; Pitas, A.; Richmond, T.; Gorski, T.; Berg, J. P.; Ballin J.; McCormick, M.; Norton, J.; Pollock, T.; Sumwalt, T.; Butcher, L.; Porter, D.; Molla, M.; Hall, C.; Blattner, F.; Sussman, M. R.; Wallace, R. L.; Cerrina, F.; Green, R. D. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1749-1755. (b) Albert, T. J.; Norton, J.; Ott, M.; Richmond, T.; Nuwaysir, K.; Nuwaysir, E. F.; Stengele, K.-P.; Green, R. D. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e35-35.

(37) Charles, P. T.; Vora, G. J.; Andreadis, J. D.; Fortney, A. J.; Meador, C. E.; Dulcey, C. S.; Stenger, D. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1586-1591.

(38) Podyminogin, M. A.; Lukhtanov, E. A.; Reed, M. W. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5090-5098.

(39) Rehman, F. N.; Audeh, M.; Abrams, E. S.; Hammond, P. W.; Kenney, M.; Boles, T. C. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 649-655.

(40) Dolan, P. L.; Wu, Y.; Ista, L. K.; Metzenberg, R. L.; Nelson, M. A.; Lopez, G. P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e107-107.

(41) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205-1209.

(42) Lamture, J. B.; Beattie, K. L.; Burke, B. E.; Eggers, M. D.; Ehrlich, D. J.; Fowler, R.; Hollis, M. A.; Kosicki, B. B.; Reich, R. K.; Smith, S. R.; Varma, R. S.; Hogan, M. E. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2121-2125.

(43) Knickerbocker, T.; Strother, T.; Schwartz, M. P.; Russel, J. N.; Butler, J.; Smith, L. M.; Hamers, R. J. *Langmuir*, **2003**, *19*, 1938-1942.

(44) Frutos, A. G.; Smith, L. M.; Corn, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10277-10282.

(45) Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4948-4956.

(46) Johnson, P. A.; Levicky, R. *Langmuir* **2003**, *19*, 10288-10294.

(47) Livache, T.; Fouque, B.; Roget, A.; Marchand, J.; Bidan, G.; Téoule, R.; Mathis, G. *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 188-194.

(48) Gilles, P. N.; Wu, D. J.; Foster, C. B.; Dillon, P. J.; Chanock, S. J. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 365-370.

(49) Matson, R. S.; Rampal, J.; Pentoney Jr., S. L.; Anderson, P. D.; Coassin, P. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 110-116.

(50) Sortino, S.; Petralia, S.; Condorelli, G. G.; Conoci, S.; Condorelli, G. *Langmuir* **2003**, *19*, 536-539.

(51) Guschin, D.; Yershov, G.; Zaslavsky, A.; Gemmell, A.; Shick, V.; Proudnikov, D.; Arenkov, P.; Mirzabekov, A. *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 203-211.

(52) (a) Fuji, N.; Akaji, K.; Hayahi, Y.; Yajima, H. *Chem. Parm. Bull.* **1985**, *33*, 362-367. (b) Duncan, R. J.; Weston, P. D.; Wrigglesworth, R. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 68-73.

(53) Tour, J. M.; Jones II, L.; Pearson, D. L.; Lamba, J. J. S.; Burgin, T. P.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Parikh, A. N.; Atre, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9529-9534.

(54) Partis, M. D.; Griffiths, D. G.; Roberts, G. C.; Beechey, R. B. *J. Protein Chem.* **1983**, *2*, 263-277.

(55) Frey, B. L.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187-3193.

(56) McKittrick, P. T.; Katon, J. E. *J. E. Appl. Spec.* **1990**, *44*, 812-817.

(57) Grasetti, D. R.; Murray, J. F. Jr. *Anal. Biochem.* **1967**, *21*, 427.

(58) Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4939-4947.

(59) (a) Tarlov, M. J.; Burgess Jr., D. R. F.; Gillen, G. *J. Am. Chem Soc.* **1993**, *115*, 5305-5306. (b) Huang, J.; Dahlgren, D. A.; Hemminger, J. C. *Langmuir* **1994**, *10*, 626-628.

(60) Gillmor, S. D.; Thiel, A. J.; Strother, T. C.; Smith, L. M.; Lagally, M. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 7223-7228.

(61) Glen Research Corp. *User Guide for DNA Modification and Labeling;* **1990**.

(62) Frey, B. L.; Hanken, D. G.; Corn, R. M. *Langmuir* **1993**, *9*, 1815-1820.

(63) Nelson, B. P.; Frutos, A. G.; Brockman, J. M.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3928-3934.

Capítulo 4

Modificação de superfícies por adsorção electrostática da poli-L-arginina

4.1 Introdução

4.1.1 Montagem com base em interacções electrostáticas: uma abordagem alternativa aos SAMs para funcionalizar superfícies com grupos reactivos

4.1.2 Imobilização de proteínas em superfícies

4.2 Adsorção electrostática da poli-L-arginina em superfícies de Au modificadas com monocamadas de alcanotióis com grupos ω ionizáveis

4.3 Reactividade de superfícies funcionalizadas com poli-L-arginina

4.3.1 Montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA)

4.3.2 Reacção com α-dicarbonilos

4.4 Utilização da adsorção electrostática da poli-L-arginina para imobilização de proteínas em superfícies de ouro

4.5 Imunoteste

4.6 Conclusões

4.7 Procedimento experimental e instrumentação

4.8 Bibliografia

4.1 Introdução

4.1.1 Montagem com base em interacções electrostáticas: uma abordagem alternativa aos SAMs para funcionalizar superfícies com grupos reactivos

A automontagem com base em interacções electrostáticas (ESA) é actualmente reconhecida, como uma técnica extremamente versátil para modificar superfícies. Esta versatilidade reside no facto da atracção electrostática entre moléculas de carga oposta ser não específica e não possuir requerimentos estereoquímicos. O único requesito para que ocorra automontagem é a existência de bastantes pontos de interacção entre a molécula e o substracto.[1] A forma mais comum de explorar esta versatilidade é a construção de filmes multicamadas através de montagem camada-a-camada com base na formação de pares iónicos, com o sucesso que foi referido no capítulo 1.

Uma extensão lógica à aplicação do ESA seria a sua utilização para funcionalizar superfícies com grupos reactivos permitindo desta forma um caminho de modificação baseado na formação de ligações covalentes. Nesta aplicação o ESA apresenta duas vantagens importantes relativamente aos SAMs: em primeiro lugar como a interacção electrostática não é específica e não possui requerimentos estereoquímicos não existem praticamente limitações à natureza, forma e topologia do substracto que pode ser modificado; em segundo lugar, uma plataforma constituída por cadeias de polímero que tendem a adoptar arquitecturas flexíveis com laços e caudas projectando-se para o seio da solução,[2,3] minimiza os impedimentos estereoquímicos, consequentemente é previsível que, para o mesmo grupo funcional, seja bastante mais reactiva que outra em que os grupos estão sujeitos a um empacotamento rígido, como é o caso nos SAMs. Por exemplo, num estudo recente, compararam-se as velocidades da reacção de hidrólise dos grupos éster NHS de SAMs e de filmes poliméricos, com a reacção em solução, tendo-se observado que, embora o facto dos grupos estarem

confinados à superfície cause, em ambos os casos, uma redução do valor da constante de velocidade comparativamente à reacção em solução, essa redução foi de três ordens de grandeza no caso do SAM e somente de duas ordens de grandeza para o caso dos grupos da superfície polimérica. Mais exactamente a constante de velocidade para os grupos éster NHS do SAM foi cinco vezes menor que para os grupos éster NHS do polímero imobilizado na superfície.[4]

Por outro lado os filmes poliméricos obtidos por ESA tendem a ser menos estáveis que os SAMs relativamente a variações de pH e força iónica.[5] A ligação electrostática que fixa as moléculas de polielectrólito ao subtracto depende do número de pares iónicos formados, com uma energia da interacção proporcional a kT (onde k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura) por cada par iónico,[2] ao passo que num SAM de um alcanotiol em Au (por exemplo), cada molécula é fixada por uma ligação covalente S–Au cuja energia ronda os 167-188 kJ/mol.

A estratégia de funcionalizar a superfície usando a adsorção electrostática já foi utilizada anteriormente.[6-11] Um exemplo bastante comum consiste em adsorver electrostaticamente poli-L-lisina quando se pretende introduzir grupos amino numa superfície. O grupo ϵ-amino da lisina reage facilmente com grupos éster NHS[8] ou grupos isotiocianato,[9] e têm sido utilizados *cross-linkers* bifuncionais contendo estes grupos reactivos para imobilizar biomoléculas, nomeadamente ADN, em superfícies de ouro[8-10] e silício[11] funcionalizadas com poli-L-lisina.

A adsorção de polilisina modificada com biotina também foi utilizada para controlar a adsorção da proteína avidina em superfícies[12] e mais recentemente foi proposto um novo processo químico de preparação de superfícies (para serem utilizadas em biosensores de afinidade) que minimizam a adsorção não específica, baseada na adsorção do copolímero formado por polilisina e PEG-biotina.[13]

O objectivo do geral do trabalho apresentado neste capítulo foi o de investigar os processos químicos de modificação de superfícies proporcionados pela adsorção electrostática do poliaminoácido sintético poli-L-arginina. Um objectivo mais específico foi o de averiguar a possibilidade de utilizar esses processos químicos para imobilizar proteínas em superfícies.

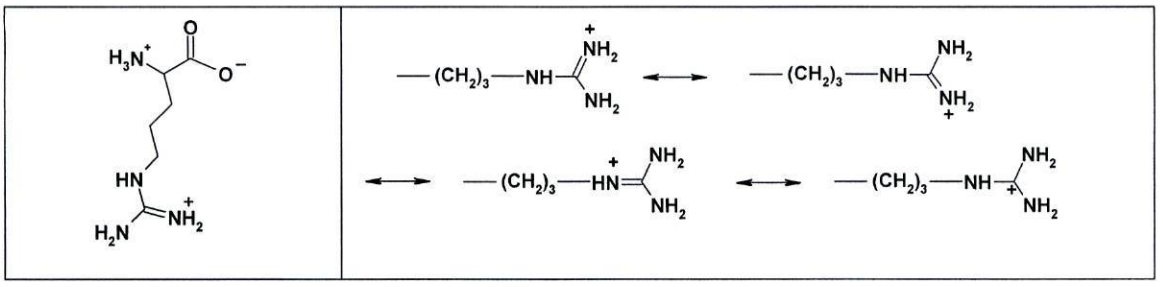


Figura 4.1: O aminoácido arginina. A geometria do grupo guanidino é planar devido à ressonância.

O interesse na molécula de poli-L-arginina está relacionado com duas propriedades do grupo δ-guanidino dos resíduos de arginina, figura 4.1. A sua forte basicidade (pK_a>12) e a sua fácil reacção com α-dicarbonilos originando produtos de condensação heterocíclicos.[14-16] Esta reacção é vulgarmente utilizada para bloquear os resíduos arginina em proteínas[17-19] e já foi utilizada com sucesso na criação de uma monomada de citocromo *c* na interface ar/água através da reacção do resíduo arginina exterior da proteína com uma molécula "âncora" com uma longa cadeia alifática terminada por um grupo dicetona.[20] A primeira característica sugere que a poli-L-arginina se deve comportar como um policatião que adsorve em superfícies com carga negativa, mesmo em condições bastante alcalinas, o que pode ser aproveitado em estratégias de modificação baseadas na montagem camada-a-camada com base em interacções electrostráticas. Por outro lado e, caso os grupos guanidino das moléculas de poli-L-arginina na superfície mantenham a sua reactividade, a adsorção da poli-L-arginina também vai permitir estratégias de modificação baseadas na formação de ligações covalentes passando a ser possível imobilizar moléculas neutras ou pouco carregadas. Esta é uma outra forma de olhar para a superfície modificada com a poli-L-arginina: não como um conjunto de cargas na superfície mas como uma funcionalizada com grupos guanidino.

4.1.2 Imobilização de proteínas em superfícies

A imobilização de proteínas em superfícies tem sido amplamente estudada e usada em imunotestes,[21] biosensores[21] e cromatografia de afinidade.[22] O desenvolvimento de processos químicos de imobilização para proteínas em superfícies

adquiriu ainda mais relevância recentemente, após se terem reconhecido as potencialidades da tecnologia *microarray*.[23] A utilização de sensores com este formato permite distinguir múltiplos analitos numa única experiência consumindo quantidades reduzidas de amostra. A investigação ao nível dos *microarrays* de proteínas fornece informação complementar à obtida com *microarrays* de ADN já que a informação obtida a partir da análise dos níveis de mARN decorrentes da expressão genética não está necessariamente relacionada com a quantidade de proteínas produzidas nem fornece informação acerca de modificações pós-tradução.

Para além da medição directa de níveis de tradução (proteoma)[24] os *microarrays* de proteínas estão a ser utilizadas para investigar as interações proteína-proteína (por exemplo, anticorpo-antigénio),[25,26a,27-29] enzima-substracto[27] e proteína-ligando.[27,29,30] Em todas estas aplicações a vantagem deste formato de sensor é o facto de numa única experiência ser possível seleccionar o anticorpo, substracto ou fármaco adequado de entre centenas (ou mesmo milhares) de possibilidades obtendo-se em poucos minutos uma resposta que anteriormente demorava meses ou anos.

Na tabela 4.1 são apresentadas alguns dos processos químicos propostos até à data para a imobilização proteínas em superfícies.

O requesito óbvio de qualquer processo químico é que a proteína retenha a sua actividade biológica na superfície o que no caso das proteínas pode pressupor a manutenção de estrutura terciária. A química de imobilização tem que proporcionar uma superfície que previna a desnaturação da proteína. Sabe-se, por exemplo, que o contacto directo com superfícies metálicas provoca perda de actividade devido à desnaturação da proteína.[58] Além disso a actividade biológica das proteínas é extremamente sensível à química de imobilização, densidade na superfície, pH, temperatura e força iónica o que complica bastante o fabrico do *microarray* comparativamente ao caso do ADN. Processos químicos que funcionam para determinadas proteínas são inadequados para outras.

Como se pode observar na tabela uma das abordagens utilizadas para imobilizar proteínas em superfícies é sua foto-imobilização utilizando superfícies terminadas por grupos fotossensíveis, por exemplo, grupos benzofenona ou arilazeto.[44-46, 59] Têm sido utilizados vários métodos para introdução destes grupos na superfície, nomedamente, a conversão *in-situ* dos grupos ω de SAMs de alcanotióis[45] ou explorando a afinidade da

molécula biotina funcionalizada com um grupo arilazeto para superfícies modificadas com avidina.[44]

Neste trabalho investigou-se a possibilidade de fabricar uma superfície fotossensível, para imobilização de proteínas em superfícies de ouro, através da reacção entre a camada de poli-L-arginina electrostaticamente adsorvida e uma molécula bifuncional contendo um grupo α-dicarbonilo numa extremidade e um grupo fotoactivo arilazeto na outra.

A fotólise dos grupos arilazeto origina um intermediário aril nitreno[59-61] que é extremamente reactivo relativamente a diversos grupos, figura 4.2.[60-63] Uma das vantagens desta química de imobilização advém precisamente da pouca especificidade da reacção do aril nitreno já que a proteína não tem que possuir um grupo específico para reagir.

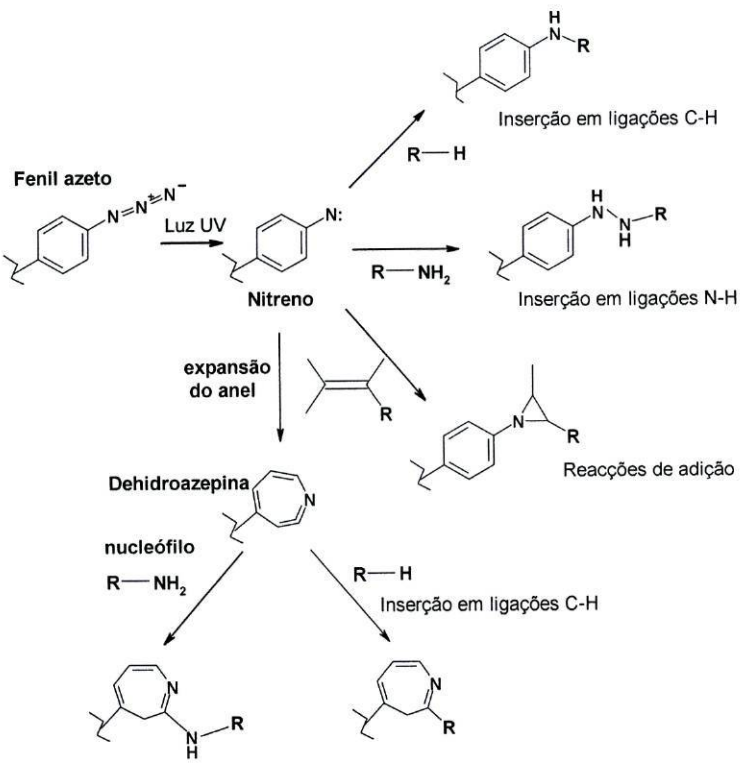


Figura 4.2: A fotólise dum fenil azeto com luz UV origina um nitreno extremamente reactivo. Os nitrenos podem reagir de diversas formas incluindo a inserção em ligações C–H ou N–H, a adição a ligações duplas ou triplas ou sofrer uma expansão do anel com a formação de uma dehidroazepina, que por sua vez é extremamente reactiva relativamente a nucleófilos, especialmente aminas (referências 60 a 63).

Tabela 4.1: Processos químicos para imobilização de proteínas em superfícies.

Superfície	Proteína	Processo químico de imobilização	Referência
vidro	imuno globulinas, GFPs, avidina	*vidro/proteína*: adsorção sobre vidro hidrofílico	Wild *et al.*[25]
vidro	anticorpos da citoquinina humana e do factor de crescimento	*vidro/nitrocelulose/proteína*: absorção sobre uma camada dum polímero microporoso de nitrocelulose. moléculas de proteína/cm^2: $\sim 5\times10^{12}$	Reichert *et al.*[31]
vidro	imuno globulinas,[24a] anticorpos para a *Escherichia coli* 0157 H:7 e para o *Renibacterium salmoninarum*[24b]	*(–SiOH)-clorodimetilsilano/proteína*: imobilização devido a interacções hidrofóbicas sobre o vidro silanizado.	Reifenberger *et al.*[26]
vidro	alergénios específicos da IgE	*(–SiOH)-GOPS-proteína*: a imobilização é promovida por interações hidrofóbicas e formação de ligações covalentes por reacção dos grupos ω-epóxido da monocamada de poli(siloxano) ((3-glicidiloxipropil) trimetoxissilano (GOPS)) com grupos –NH_2 da proteína.	Weller *et al.*[32]
vidro	proteína G, p50, domínio FKBP12 que liga à rapimicina, estreptavidina, ratinho anti-clone da digoxigenina IgG	*(–SiOH)-aldeídosilano-proteína*: formação de ligação covalente (base de Schiff) entre grupos amino da proteína e os grupos carbonilo da monocamada de poli(siloxano).	MacBeath *et al.*[27]
vidro	Kemptide, inibidor-2 da proteína fosfatase, ElK1	*(–SiOH)-aldeídossilano-BSA-DSC-proteína*: formação de ligação covalente (ligação amida) entre grupos amino da proteína e os grupos NHS duma camada de BSA derivatizada *in-situ* com o *cross-linker* homobifuncional *N,N'*-disuccinimidil carbonato (DSC).	MacBeath *et al.*[27]

vidro	IgG, BSA, glucose oxidase	*(–SiOH)-MTS-GMBS-proteína*: formação de ligação covalente (ligação amida) por reacção entre os grupos NHS da superfície e os grupos $-NH_2$ da proteína. A superfície activada com grupos NHS é obtida através da reacção dos grupos ω-SH da monocamada de poli(siloxano) (mercaptopropilsilano (MPS)) com o términos maleimida do *cross-linker* heterobifuncional *N*-(γ-maleimidobutiriloxi) succinimido éster (GMBS).	Ligler *et al.*[33]
vidro	citocromo *c*	*(–SiOH)-APTES-PDITC-proteína:* formação de ligação covalente (ligação tioureia) por reacção dos grupos isotiocinato da monocamada de polisiloxano (3-(aminopropil)trietoxissilano) (APTES)) activada com o *cross-linker* homobifuncional 1,2-fenileno diisotiocianato (PDITC)) e grupos $-NH_2$ da proteína.	Otto *et al.*[34]
vidro	anti-*B. globigii* IgG de coelho, coelho anti-MS2 IgG, coelho anti-SEB	*(–SiOH)-silano-SMB-NeutrAvidina-(biotina-anticorpo)*: a proteína neutravidina é ligada covalentemente à superfície através do *cross-linker* heterobifuncional *N*-hidroxisuccinimidil 4-maleimidobutirato (SMB). A interacção bioespecífica entre a biotina e a neutravidina é usada para imobilizar proteínas biotiniladas.	Ligler *et al.*[35]
vidro	receptores da proteína G	*(–SiOH)-γ-aminopropilsilano/proteína*: adsorção da proteína e lípidos a ela associados sobre a camada de silano.	Lahiri *et al.*[30]
vidro	HRP	*(–SiOH)-APTMS-(Au coloidal (12nm) /proteína):* a imobilização da proteína é mediada pela nanopartícula de ouro com a qual ela foi conjugada. A nanopartícula liga-se à superfície por interacção entre os grupos terminais $-NH_2$ da monocamada de poli(siloxano) (aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)) e os átomos de Au ou devido a interacções com as moléculas de proteina.	Natan *et al.*[36]

vidro	proteoma da levedura	*(–SiOH)-NTA-(GST-His × 6-proteína)*: reacção de complexação (formação dum quelato) entre os átomos de níquel na superfície de Ni-ácido nitriloacético (NTA) e a etiqueta de histidinas (His×6) com a qual as proteínas foram conjugadas no seu grupo $-NH_2$ terminal via reacção com a glutationa *S*-transferase-poli(histidina).	Snyder *et al.*[24]
vidro	estreptavidina, E-caderina	*(–SiOH)-MTPS-(Mal-PEG^{3400}-biotina)-estreptavidina-(biotina-proteína)*: a derivatização da monocamada de poli(siloxano) (mercaptopropilsilano (MPTS)) com a *cross-linker* heterobifuncional Mal-PEG^{3400}-biotina, via reacção com o términos maleimida, cria uma superfície terminada com grupos biotina. A interacção bioespecífica entre a biotina e a estreptavidina é usada para imobilizar proteínas biotiniladas. moléculas de proteína/cm^2: $\sim 3.3\times10^{12}$	Nassoy *et al.*[37]
vidro	estreptavidina	*(–SiOH)-MTPS-(VS-PEG^{3400}-NHS-estreptavidina)*: formação de ligação covalente (ligação tioéter) por reacção entre os grupos –SH da monocamada de poli(siloxano) (MTPS) e os grupos vinilsulfona da estreptavidina derivatizada com o *cross-linker* heterobifuncional VS-PEG^{3400}-NHS. moléculas de proteína/cm^2: $\sim 2.0\times10^{12}$	Nassoy *et al.*[37]
vidro	tioredoxina (Trx)	*(–SiOH)-APTES-DSC-etiqueta ELP/(ELP-proteína)*: imobilização reversível devido a interacções hidrofóbicas entre uma etiqueta ELP(*elastin-like polipeptide*) na superfície e a proteína derivatizada com a mesma etiqueta ELP. Nesta forma de imobilização é explorado o facto das ELPs exibirem uma transição hidrofílico-hidrofóbico reversível que pode ser estimulada por variações de temperatura, pH ou força iónica.	Chilkoti *et al.*[38]

vidro	IgG de galinha e anti-galinha IgG, fibrinogénio, mioglobina	*(–SiOH)-HMDS/(AAPO-ABP)/proteína*: a exposição a luz UV do copolímero formado entre *O*-acriloil acetofenona óxima e 4-acriloiloxibenzofenona, depositado por *spin coating* sobre vidro silanizado (hexametildissilazano) cria regiões terminadas com grupos $-NH_2$. Por outro lado a ablação laser cria zonas hidrofóbicas, onde as proteínas adsorvem preferencialmente. Desta forma é possível criar superfícies com padrões de proteínas.	Nicolau *et al.*[39]
quartzo	Fab	*(–SiOH)-APTS-MPANHS-proteína*: a superfície de poli(siloxano) (3-aminopropiltrialcoxisilano (APTS)) terminada com grupos amino é covertida *in-situ* numa superfície terminada por grupos maleimida por reacção com a extermidade NHS do cross-linker heterobifuncional ácido 3-maleimidopropiónico *N*-hidroxissuccinimido éster (MPANHS). A proteína liga-se através dos seus resíduos cisteína (–SH) que reagem com os grupos maleimida formando ligações tioéter. moléculas proteína/cm^2: $\sim 1.6\times10^{12} - 2.1\times10^{12}$	Dubrovsky *et al.*[40]
quartzo	IgG	*(–SiOH)/EDAP-glutaraldeído-IgG*: um filme de etilenodiamina sobre quartzo, obtido por polimerização de plasma, contém grupos $-NH_2$ que podem ser reagidos com glutaraldeído de forma a criar uma superfície activada com grupos carbonilo que reagem com grupos amino da proteína ligando-a covalentemente à superfície.	Karube *et al.*[41]
quartzo	IgG	*(–SiOH)/EDAP-glutaraldeído-proteína A-DMP-IgG*: neste caso a superfície derivatizada com o glutaraldeído é adicionalmente modificada com proteína A. A IgG é ligada à proteína A na superfície através da reacção com o *cross-linker* homobifuncional dimetil pimelimidato dihidroclorídrico (DMP).	Karube *et al.*[41]

quartzo	Fab' da IgG	*(–SiOH)/EDAP-EMCS-Fab'*: da reacção da extremidade éster NHS do *cross-linker* heterobifuncional *N*-succinimidil 6-maleimidoexanoato (EMCS) com os grupos $-NH_2$ do EDAP resulta uma superfície activada com grupos maleimida que reagem com os grupo tiol da proteína.	Karube *et al.*[41]
silício	anti-HBsAg IgG	*(–SiOH) -APTES- (aldeído-anti-HBsAg IgG)*: formação de ligação covalente (base de Schiff) decorrente da reacção entre grupos amino da monocamada de poli(siloxano) (3-aminopropiltrietoxissilano (APTES)) e os grupos carbonilo introduzidos na proteína via oxidação com periodato das cadeias de carbohidratos (C-terminal) da proteína.	Yu *et al.*[42]
ouro	BSA, proteína da cápside do vírus *etch* do tabaco, proteína da cápside do vírus mosaico do tabaco	*Au-MBA/proteína*: adsorção da proteínas devido a interacções electrostáticas com a superfície carregada negativamente (grupos ω-COO^- da monocamada de ácido 4-mercaptobutanóico (MBA).	Liu *et al.*[43]
ouro	IgG	*Au/Avidina D-fotobiotina-proteína*: a fotobiotina (*N*-4-azido-2-nitrofenil)-aminopropil-*N'*-(*N-d*-biotinil-3-aminopropil)-*N'*-metil-1,3-propanodiamina)) possui numa das extermidades a molécula de biotina e na outra um grupo aril azeto que origina um aril nitreno por exposição a luz UV. Este intermediário pode reagir com diversos grupos da proteína.	Cooper *et al.*[44]

ouro	anti-PSA, IgG, F_5	*Au-MDNHS-EDA-IBP-proteína*: uma superfície terminada com o grupo fotossensível benzofenona é obtida via sucessivas modificações *in-situ* duma monocamada de 10,10'-ditiobis(ácido decanóico *N*-hidroxisuccinimido éster) (MDNHS) terminada com o grupo NHS. Primeiramente é criada uma superfície terminada com grupos $-NH_2$ através da reacção com a etilenodiamina (EDA). Os grupos amino reagem com os grupos isotiocianato do foto *cross-linker* benzofenona 4-isotiocianato (IBP) donde resulta a superfície fotossensível que pode ser activada por exposição a luz UV.	Michel *et al.*[45]
ouro	BSA, quimotripsina	*Au-(Glu-Cys-Glu-Cys-AMBBA)-proteína:* a superfície de Au é coberta com a molécula Glu-Cys-Glu-Cys-AMBBA. Os resíduos cisteína são responsáveis pela automontagem sobre o Au. As moléculas organizam-se na superfície formando estruturas em triângulo. Os resíduos glutamato promovem a adsorção de moléculas com carga positiva ao passo que os grupos ácido *p*-aminometilbenzoil-*p*-benzóico (AMBBA) possuem um grupo benzofenona fotossensível que reage preferencialmente com grupos C–H α relativamente a um grupo electrófilo mediante activação com luz UV.	Sasaki *et al.*[46]
ouro	péptidos IYGEFKKKCe Arg-Gly-Asp	*Au-(D(M+P))-(Tiol-proteína)*: monocamadas terminadas com grupos maleimida, obtidas por quimissorção dum dissulfeto misto (D(M+P)) terminado com grupos maleimida e penta(etilenoglicol) são utilizadas para ligar covalentemente proteínas através de ligações tioéter. Os grupos penta(etilenoglicol) impedem a adsorção não específica da proteína.	Mrksich *et al.*[47]

ouro	Avidina	*Au-MUA-NHSS-PAMAN (G4)-(biotina-NHS)-Avidina*: a derivatização *in-situ* da monocamada de MUA com grupos NHSS por reacção com éster N-hidroxisulfosuccinimido na presença de EDC permite a imobilização do dendrímero de 4ª geração (G4), terminado com grupos $-NH_2$, poli(amidoamina) PAMAN. A camada de dendrímero é subsequentemente biotinilada por reacção com a molécula ácido biotinil-ϵ-amidocapróico *N*-hidroxissulfossuccinimidoato. A avidina é imobilizada na superfície devido à interacção biotina-avidina. moléculas de proteína/cm^2: $\sim 4.5 \times 10^{12}$	Kim *et al.*[48]
ouro	várias	*Au-(carboximetildextran-NHS)-proteína*: formação de ligação covalente (ligação amida) por reacção dos grupos NHS da camada de hidrogel (introduzidos *in-situ* por reacção de parte dos grupos carboxilato com o éster *N*-hidroxissuccinimido (NHS) na presença da carboimida EDC) e grupos amino das proteínas. moléculas de proteína/cm^2: $\sim 4.2 \times 10^{12}$	Lindquist *et al.*[48]
ouro	cutinase, cutinase-calmodulina	*Au-(D(Ph+P))-(cutinase-proteína)*: uma monocamada terminada com um grupo fosfonato (dissulfeto fosfonato, (DP)), que funciona como ligando de captura, é utilizada para ligar covalentemente proteínas de fusão cutinase-proteína. A cutinase forma aductos covalentes com ligandos fosfonato.	Mrksich *et al.*[50]
ouro	BSA, BIgG, fibronectina,[48] cataláse[49]	*Au-MUA-NHS-proteína*: a monocamada terminada com o grupo –COOH (MUA) é derivatizada com grupos NHS através da reacção *N*-hidroxissuccinimido na presença da carboimida 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)carboimida (EDC). As proteínas são ligadas covalentemente a esta superfície através da reacção dos grupos NHS com os grupos $-NH_2$.	Zhang *et al.*,[51] Patel *et al.*[52]

ouro	anti-IgG	*Au-MPA/n ×(pAH/pSS)/anti-IgG....*: adsorção electrostática sobre multicamadas de polielectrólitos. (MPA: ácido mercaptopropiónico)	Caruso *et al.*[53]
ouro	GOx, m-HRP	*Au-MUA/PAA/proteína*: adsorção electrostática da proteína derivatizada com grupos amino (de forma a exibirem carga positiva) sobre filmes de ácido poliacrílico com estrutura em árvore obtidos *in-situ*, por enxertos sucessivos da superfície de –COOH com o polímero α,ω-diaminopoli(*terc*-butilacrilato), na presença de cloroformato de etilo.	Pishko *et al.*[54]
ouro	Fab	*Au-(MUD+MBD)-estreptavidina-(biotina-proteína)*: proteínas biotiniladas são imobilizadas à custa da interacção bioespecífica biotina-estreptavidina. O primeiro passo desta química de imobilização consiste na automontagem duma monocamada mista de mercaptoundecanol (MUD) e 12-mercapto(8-biotinamida-3,6-dioxaoctil)dodecanamida (MBD).	Knoll *et al.*[55]
alumínio	IgG do murganho, IgE de humano	*(AlOH)-APTES-Dextran oxidado-proteína*: formação de ligações covalentes (base de Schiff) entre os grupos aldeído da camada de dextran e grupos $-NH_2$ da proteína.	Morozov *et al.*[28]
ITO	HIgG, BIgG, CIgG, estreptavidina	*ITO-proteína*: automontagem promovida pela interacção entre os grupos –OH da superfície de ITO e os grupos $-COO^-$ da proteína.	Li *et al.*[29]
Nb_2O_5	imunoglobulina anti-coelho	*Nb_2O_5/(pLis-g-PEG/PEG-biotina)-estreptavidina-(biotina-proteína)*: a carga positiva dos resíduos lisina das moléculas de pLis onde foram enxertados cadeias de polietilenoglicol (PEG) e biotina-PEG promove a adsorção electrostática do polímero. As cadeias de PEG impedem a adsorção não-específica de moléculas na superfície. A imobilização sobre esta camada de moléculas de estreptavidina cria uma superfície onde podem ser imobilizadas proteínas derivatizadas com grupos biotina.	Spencer *et al.*[13]

PTFE, PET, silício, ouro, aço inox, vidro	anti-α_5-integrina Humana	*superfície-revestimento reactivo-biotina-estreptavidina-(biotina-proteína)*: um revestimento reactivo com grupos anidrido (poli(*p*-xilileno-2,3-anidrido dicarboxílico)) ou pentafluorofenol éster (poli(*p*-xilileno-ácido carboxílico pentafluorofenol éster-*co*-*p*-xilileno) é obtido por polimerização CVD. Estes grupos reagem com o grupo amino da molécula (+)-biotinil-3,6,9-trioxaundecanodiamina resultando uma superfície biotinilada.	Langer *et al.*[56]
policarbonato	anticorpo pIgG	*policarbonato/PDDA/silica coloidal-APTES-glutaraldeído-pIgG*: formação de ligação covalente (base de Schiff) por reacção entre grupos amino da proteína e os grupos carbonilo da monocamada de poli(siloxano) (APTES) derivatizada *in-situ* com glutaraldeído. Os primeiros dois passos desta química de modificação são de automontagem electrostática: primeiro duma camada de policatião (PDDA) sobre a qual se adsorve a silica coloidal que é subsequentemente silanizada.	Campbell *et al.*[57]

4.2 Adsorção electrostática da poli-L-arginina em superfícies de Au modificadas com monocamadas de alcanotióis com grupos ω ionizáveis

A adsorção da poli-L-arginina (pArg) sobre uma superfície de ouro modificada com um SAM de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) é facilmente detectada nos espectros de FT-IRRAS, figura 4.3.

O espectro da superfície de ouro modificada com a monocamada MUA, obtido após lavagem com água Millipore, apresenta as bandas características dum ácido carboxílico: a banda a 1717 cm^{-1} correspondendo a grupos envolvidos em ligações de hidrogénio e a banda a 1740 cm^{-1} correspondendo ao grupo COOH livre. A banda a

1416 cm^{-1} é atribuída à combinação das bandas associadas à deformação *scissors* dos grupos metileno (δ (CH_2)), e ao *stretching* simétrico dos grupos carboxilato $\nu_s(COO^-)$, (ver tabela 2.1 para mais detalhes). Após lavagem da superfície com solução tampão pH 9 as bandas atribuídas à forma protonada desaparecem quase completamente, restando uma pequena banda a 1690 cm^{-1}. As bandas associadas ao *stretching* assimétrico do grupo carboxilato a 1585 cm^{-1} e *stretching* simétrico a 1416 cm^{-1} tornam-se as bandas mais intensas (ver figura 2.19).

Uma mudança semelhante na extensão de ionização do grupo carboxilo é notada quando o policatião pArg é adsorvido na superfície modificada com o MUA, figura 4.3.

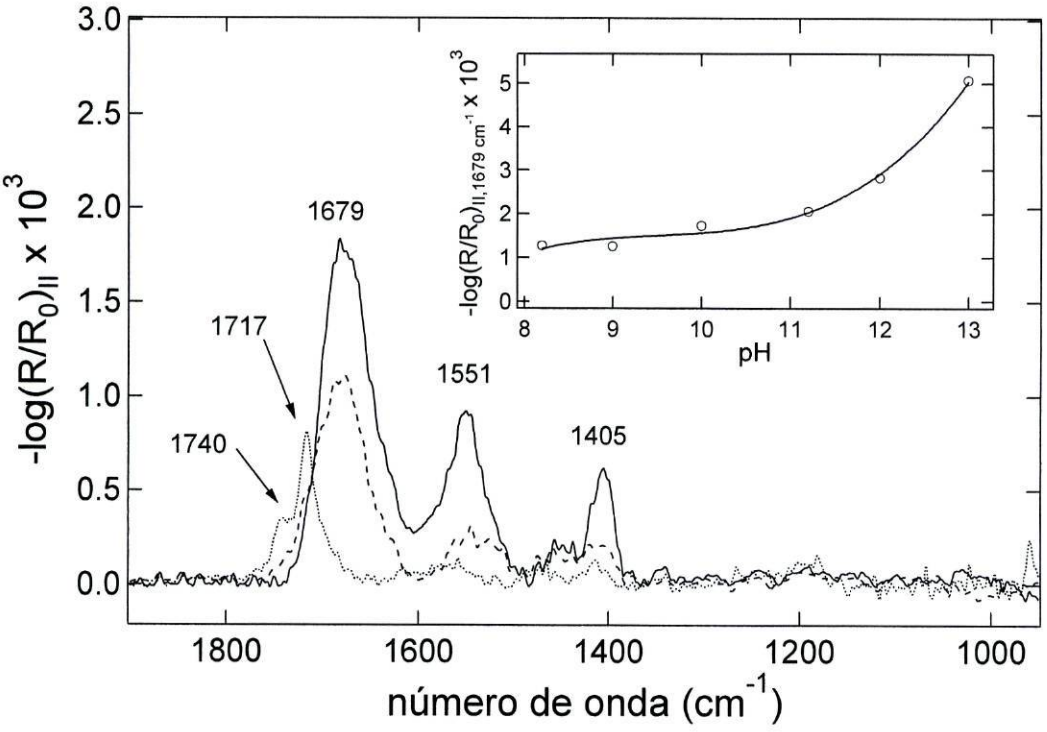


Figura 4.3: Espectros de FT-IRRAS da adsorção electrostática da poli-L-arginina sobre uma monocamada de um alcanotiol tendo como grupo ω um grupo carboxilo (MUA) (linha a ponteado), como representado esquematicamente na figura 4.4. A linha a tracejado mostra o espectro da superfície MUA/pArg após imersão numa solução pH 3 durante 2 hrs. A figura inserida mostra a absorvância da banda a 1679 cm^{-1} em função do pH da solução de deposição.

Desta feita o deslocamento do equilíbrio de ionização para o carboxilato é irreversível, no sentido em que a lavagem com água Millipore não recupera a forma COOH do MUA. Isto reflecte o facto da pArg estar fortemente ligada à superfície

devido à formação de múltiplos pares iónicos entre os grupos guanidino positivamente carregados (pK_a>12) e os grupos COO^- do MUA. A adsorção da pArg (representada esquematicamente na figura 4.4) é demonstrada pelas bandas a 1679 cm^{-1} e 1551 cm^{-1}. A banda a 1679 cm^{-1} inclui várias contribuições: *stretching* CN do grupo guanidino, banda amida I (*stretching* CO do grupo carbonilo) e possivelmente o *stretching* CO de grupos carboxilo protonados. A banda amida II a 1551 cm^{-1} e a banda atribuída ao modo *stretching* assimétrico dos grupos COO^- estão sobrepostas. As duas outras bandas observadas no espectro a 1455 cm^{-1} e a 1405 cm^{-1} correspondem aos modos deformação *scissors* dos grupos metileno e *stretching* simétrico dos grupos carboxilato do MUA, respectivamente.

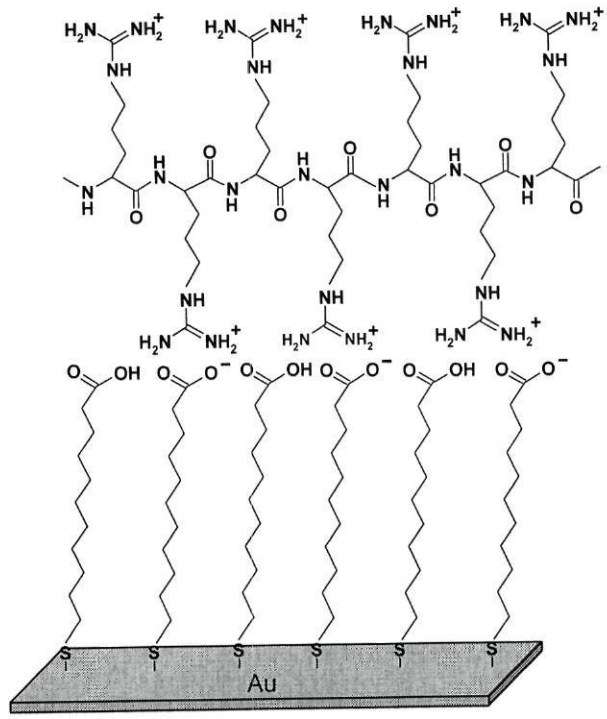


Figura 4.4: Representação esquemática da adsorção electrostática da poli-L-arginina sobre uma monocamada de MUA.

Após a adsorção da camada de pArg também é observada uma variação no ângulo de contacto formado por uma gota de água Millipore na superfície, figura 4.5. O valor passa de $51.6° \pm 0.7°$ (monocamada de MUA) para $42.8° \pm 1.8°$ (conjunto MUA/pArg). Os ângulos de contacto são extremamente sensíveis à composição e estrutura de uma superfície.[64] Para a monocamada de MUA têm sido publicados valores

que vão de 15° [65] até 58°.[10] O valor inferior pode estar associado a monocamadas com um empacotamento rígido e extremamente ordenadas. O ângulo aumenta à medida que aumenta a desordem da monocamada e mais grupos metileno são expostos à superfície. A adsorção da camada de pArg além de promover o ordenamento das moléculas de MUA aumenta o número de grupos hidrofílicos na superfície.

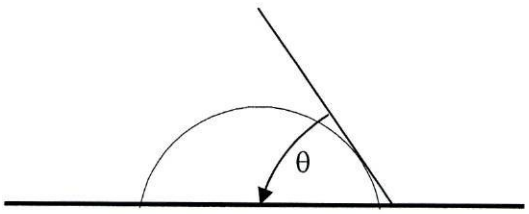


Figura 4.5: Quando um líquido não molha completamente uma superfície forma-se o chamado ângulo de contacto (θ). Se não há interacção entre a superfície e o líquido o ângulo de contacto é de 180°. À medida que a interacção aumenta o líquido espalha-se até que θ = 0°.

Tabela 4.2: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a camada de poli-L-arginina adsorvida sobre a monocamada de MUA.

Superfície	$\overline{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição	Figura
pArg	1676	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo) + ν(C=N), stretching guanidino	4.3, 4.7, 4.8, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.16
	1620-1560	δ(N–H$^+$), deformação –NH_2^+	
	1545	ν(C–N) + δ(N–H), banda amida II (stretching CN e bending NH)	
	1452, 1408	δ(CH_2), deformação scissors dos metilenos	
	1350	ν(C–N) + ω(CH_2), banda amida III,[a] stretching (C–N) e deformação wagging dos metilenos	

[a] da referência 66.

Quando a superfície Au|MUA/pArg é mergulhada numa solução com pH 3 durante várias horas, há remoção parcial de moléculas de pArg, restando aproximadamente 40% das inicialmente depositadas (cálculo efectuado com base na intensidade da banda a 1551 cm^{-1}). Esta experiência sugere que existem moléculas de pArg mais fortemente ligadas à superfície que outras. As moléculas que estejam só

parcialmente ligadas, isto é, em que só um número limitado de grupos guanidino forma pares iónicos com os grupos COO^-, constituem cadeias fracamente ligadas, e apesar de resistirem à dessorção a pH~6 (lavagem com água Millipore) são removidas quando o equílibrio de ionização é forçado no sentido da forma protonada de MUA (pH 3). O facto da adsorção electrostática de polielectrólito resultar em cadeias com diferentes graus de ligação à superfície, não é díficil de imaginar e foi anteriormente sugerido por outros autores para explicar o mecanismo que conduz ao crescimento exponencial das multicamadas.[67]

A figura inserida (figura 4.3) mostra a dependência da absorvância a 1679 cm^{-1} em função do pH da solução a partir da qual a pArg é electrostaticamente adsorvida. A análise dos espectros de FT-IRRAS revela que a influência do pH só se começa a sentir a partir de pH 11. O facto do grupo δ-guanidino ser uma base forte faz com que a pHs inferiores a 11 as moléculas de pArg adsorvam num estado de ionização total. A partir deste pH as cadeias de pArg devem ficar parcialmente ionizadas e consequentemente mais moléculas passam a ser necessárias para neutralizar as cargas na superfície. Também é de esperar que o empacotamento de moléculas parcialmente ionizadas na superfície seja favorecido pelo aumento do número de ligações de hidrogénio e interacções hidrofóbicas entre cadeias devido à diminuição das repulsões electrostáticas. Em trabalhos anteriores,[3, 5, 68] o aumento na espessura dos filmes obtidos por montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA), quando a densidade de carga é diminuída, foi associado a alterações nas conformações adoptadas pelas macromoléculas na superfície, o número de "laços" e "caudas" aumenta relativamente ao número de segmentos com muitos pontos de ligação à superfície, figura 4.6.

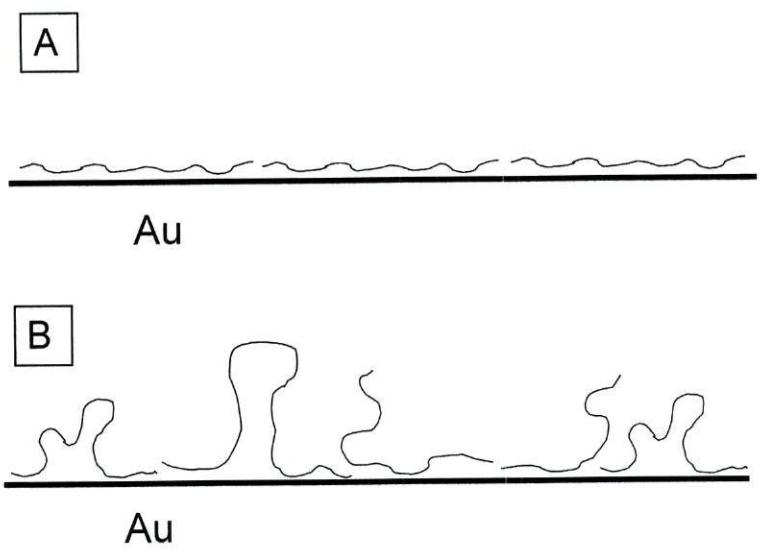


Figura 4.6: Possíveis conformações adoptadas pela pArg quando adsorvida num estado de ionização quase total (A) ou parcial (B).

É possível que uma alteração conformacional deste tipo ocorra nesta experiência quando a densidade de carga das cadeias de pArg é reduzida devido ao pH da solução de deposição ser superior a 11. O aumento no número de cadeias fracamente ligadas quando a pArg é adsorvida a partir de uma solução pH 13 é também sugerido pelo facto de somente 16% da quantidade inicialmente depositada resistir à exposição a uma solução pH 3. Estas observações apontam para um aspecto bastante interessante associado à automontagem com base em interacções electrostáticas da pArg e que é o facto de, por simples manipulação do pH, ser possível ter algum controlo sobre a extensão da funcionalização da superfície com grupos guanidino e mesmo sobre o arranjo conformacional desses grupos na superfície. Pode, desta forma, desenhar-se a matriz de grupos guanidino que vai ser utilizada em passos de modificação subsequentes.

Estes resultados também sugerem que uma forma de prevenir a dessorção da pArg causada pelo pH é a utilização de um alcanotiol tendo um grupo funcional do tipo ácido forte (por exemplo um grupo sulfónico) como grupo ω.

4.3 Reactividade de superfícies funcionalizadas com poli-L-arginina

4.3.1 Montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA)

Como referido no capítulo 1 a adsorção alternada de polielectrólitos de carga contrária numa superfície de forma consecutiva, permite a obtenção de filmes multicamadas cuja espessura e composição podem ser controladas com precisão variando o número de ciclos de adsorção e a natureza das espécies adsorvidas.[1]

Na figura 4.7 estão representados os espectros FT-IRRAS na região 2000-1000 cm^{-1} obtidos durante a automontagem sequencial de camadas de poli-L-arginina e poli(ácido-L-glutâmico) (pGlu) sobre a monocamada de MUA. A comparação da intensidade da banda a 1400 cm^{-1}, atribuída ao modo *stretching* simétrico dos

carboxilatos com a da banda a 1700 cm^{-1} devida ao *stretching* do carbonilo do ácido glutâmico (ver tabela 4.3), sugere que o pGlu está no filme predominantemente sob a forma aniónica.

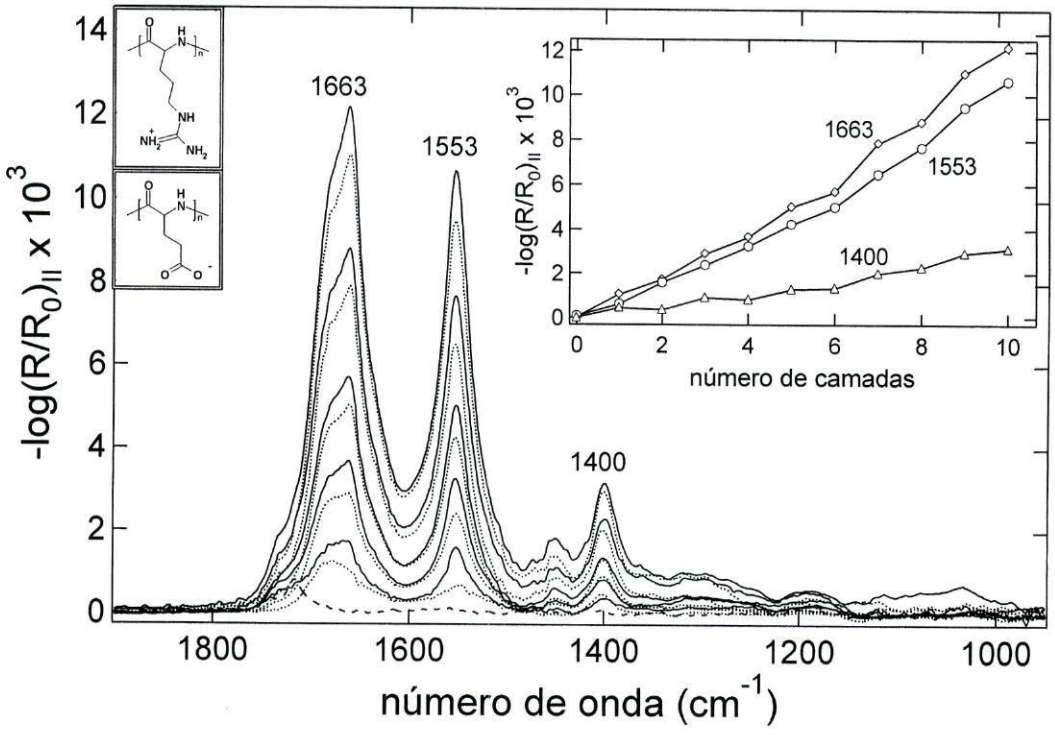


Figura 4.7: Espectros de FT-IRRAS da montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) do filme pArg/pGlu numa monocamada de MUA (as linhas a ponteado correspondem às camadas de pArg). A figura inserida mostra a evolução, com o número de camadas depositadas, da absorvância das bandas amida I (1663 cm^{-1}), amida II (1553 cm^{-1}) e *stretching* dos carboxilatos (1400 cm^{-1}).

Um aspecto interessante observado para este filme é o crescimento não linear na intensidade das bandas de FT-IRRAS (figura inserida) sugerindo que a quantidade de polielectrólito adsorvida aumenta à medida que o número de camadas aumenta. Como foi referido na secção anterior, alguns autores observaram este fenómeno para outros filmes de polielectrólitos,[67] interpretando-o com base num mecanismo de crescimento exponencial associado à existência de difusão, no interior do filme, das moléculas de polieletrólito fracamente ligadas.[67] Esta difusão ocorre da superfície para o interior do filme na etapa de deposição e em sentido contrário quando se depositam moléculas de carga oposta. Isto significa que a carga de superfície a compensar se deve não só às moléculas da última camada mas também às cadeias fracamente ligadas, que se

difundem do interior para a superfície aquando da deposição de moléculas de carga contrária. Como o número destas aumenta com a massa do filme, aumenta também o número de moléculas de carga contrária que se deposita.

Tabela 4.3: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para as superfícies modificadas com os filmes multicamadas constituídos com a poli-L-arginina e os polianiões poli-L-(ácido glutâmico) (pGlu) e poli-L-tirosina (pTir).

Superfície	$\overline{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição	Figura
pGlu	1732	ν(C=O), stretching do grupo carboxilo dos resíduos ácido glutâmico	4.7
	1663	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo)	
	1553	$\nu(C-N) + \delta(N-H)$, banda amida II (stretching CN e bending NH)+ $\nu_{as}(COO^-)$, stretching assimétrico dos carboxilatos	
	1450	$\delta(CH_2)$ deformação scissors dos metilenos	
	1400	$\nu_s(COO^-)$, stretching simétrico dos resíduos glutamato	
	1317,1127	$\omega(CH_2)+\tau(CH_2) + \rho(CH_2)$, deformações wagging , twisting e rocking dos metilenos	
	1248	$\nu(C-OH)$, stretching do grupo carboxilo	
pTir	1670	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo)	4.8
	1617,1596, 1518	ν(C=C), stretching do anel aromático	
	1540	$\nu(C-N) + \delta(N-H)$, banda amida II (stretching CN e bending NH)	
	1450	$\delta(CH_2)$ deformação scissors dos metilenos	
	1348	$\nu(C-N) + \omega(CH_2)$, banda amida III (C–N stretching) e wagging dos metilenos	
	1260, 1175	Interacção dos modos deformação O–H e stretching C–O do grupo fenol	
	1110	=C–H, deformação no plano do anel	

Em estudos recentes[69] foi demonstrado que existe um valor limite para a densidade de carga abaixo do qual não ocorre sobrecompensação de carga impossibilitando-se a deposição sequencial camada-a-camada. O facto da pArg manter

uma densidade de carga elevada, mesmo quando adsorvida a partir de soluções de pH elevado foi utilizado na construção dos filmes de polipéptidos contendo pArg e poli-L-tirosina (pTir) como polianião. O grupo fenol do aminoácido tirosina tem um pK_a entre 9.7 e 10.1[14] o que significa que a pTir só está suficientemente ionizada para que ocorra automontagem com base em interacções electrostáticas a pHs bastante alcalinos (pH 12). Na figura 4.8 está representada a evolução dos espectro FT-IRRAS durante a montagem camada-a-camada do filme pArg/pTir, até às 10 camadas. A presença da pTir no filme contribui para a absorvância a 1670 cm^{-1} (banda amida I), 1540 cm^{-1} (banda amida II), e é responsável pelos picos adicionais a 1518 cm^{-1} (pico atribuído às vibrações *stretching* C=C do anel aromático) a 1260 cm^{-1} e 1175 cm^{-1} (devido à interacção dos modos deformação O–H e *stretching* C–O do grupo fenol).

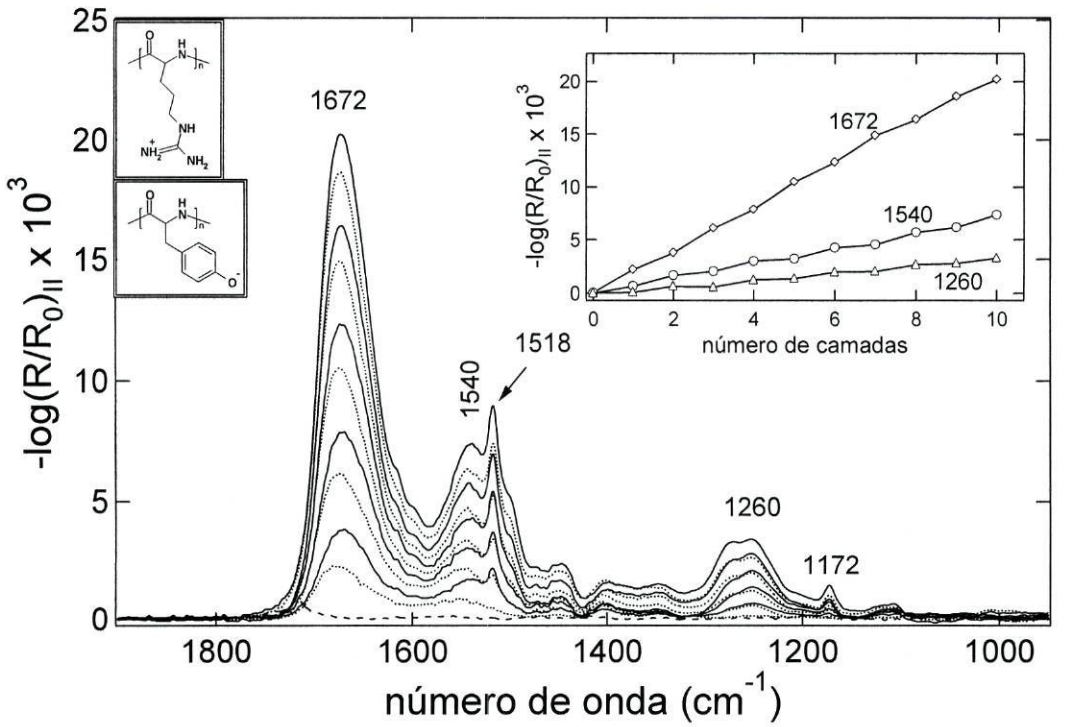


Figura 4.8: Espectros de FT-IRRAS do processo de LBLA, a partir de soluções pH 12, do filme pArg/pTir. A figura inserida mostra a evolução da intensidade das bandas amida I (1672 cm^{-1}), amida II (1540 cm^{-1}) e da banda a 1260 cm^{-1}, com o número de camadas depositadas.

A figura inserida mostra que a intensidade da banda amida I aumenta duma forma reprodutível à medida que se adicionam mais camadas indicando um crescimento

regular do filme. Contrariamente ao filme pArg/pGlu neste filme a massa de polieletrólitos depositada por bicamada é constante.

Os filmes obtidos por automontagem electrostática camada-a-camada usando outros polipéptidos sintéticos, nomedamente o par polilisina/ poli(ácido glutâmico) foram anteriormente propostos para o fabrico de filmes electroactivos em superfícies de eléctrodos[70,71] ou como sistemas modelo para estudar as estruturas secundárias adoptadas por proteínas em filmes de polielectrólitos.[72] A densidade de carga da polilisina varia drasticamente a pH 9.5,[70] devido ao facto dos resíduos lisina serem bases fracas. O pK_a do grupo ϵ-amino da poli-L-lisina é aproximadamente 10.5 o que impossibilita a adsorção deste policatião em superfícies carregadas negativamente a pH 10.6[70] e provoca a sua dessorção por exposição a soluções com pH 12.[6] Os resultados anteriores indicam que a utilização da pArg possibilita a automontagem e resistência à dessorção a pHs mais elevados, o que se pode revelar fundamental para a robustez de processos químicos de modificação de superfícies, não só em aplicações ligadas à obtenção de multicamadas com base na automontagem electrostática mas também quando a adsorção do polielectrólito é usada para funcionalizar a superfície para posteriormente ligar moléculas usando reações químicas.

4.3.2 Reacção com α-dicarbonilos

A adsorção electrostática da pArg é uma forma de criar uma superfície terminada com grupos guanidino (figura 4.4).

É conhecido que moléculas com grupos α-dicarbonilo, α-cetoaldeídos e α-dicetonas, reagem especificamente com os resíduos arginina das proteínas. Em meio alcalino o α-dicarbonilo condensa com o grupo guanidino originando um complexo tipo base de Schiff mas mais estável.[14, 16, 17, 20, 73]

A reacção entre uma α-dicetona com uma longa cadeia alifática e o resíduo arginina da proteína citocromo c foi anteriormente utilizada por Riccio e colaboradores[20] para criar uma monocamada desta proteína em interfaces ar/água.

Com o propósito de avaliar a disponibilidade de grupos guanidino para reacção com espécies da solução, a superfície terminada com a camada de pArg foi exposta a

soluções de vários reagentes contendo o grupo α-dicarbonilo, especificamente, o glioxal, fenilglioxal e o *p*- azidofenil glioxal (APG).

De acordo com a literatura[15, 16, 74] o producto da reacção entre a arginina e α-dicarbonilos é uma carbinolamina dupla, como representado na figura 4.9.

Os espectros FT-IRRAS obtidos após as reacções são apresentados na figura 4.10.

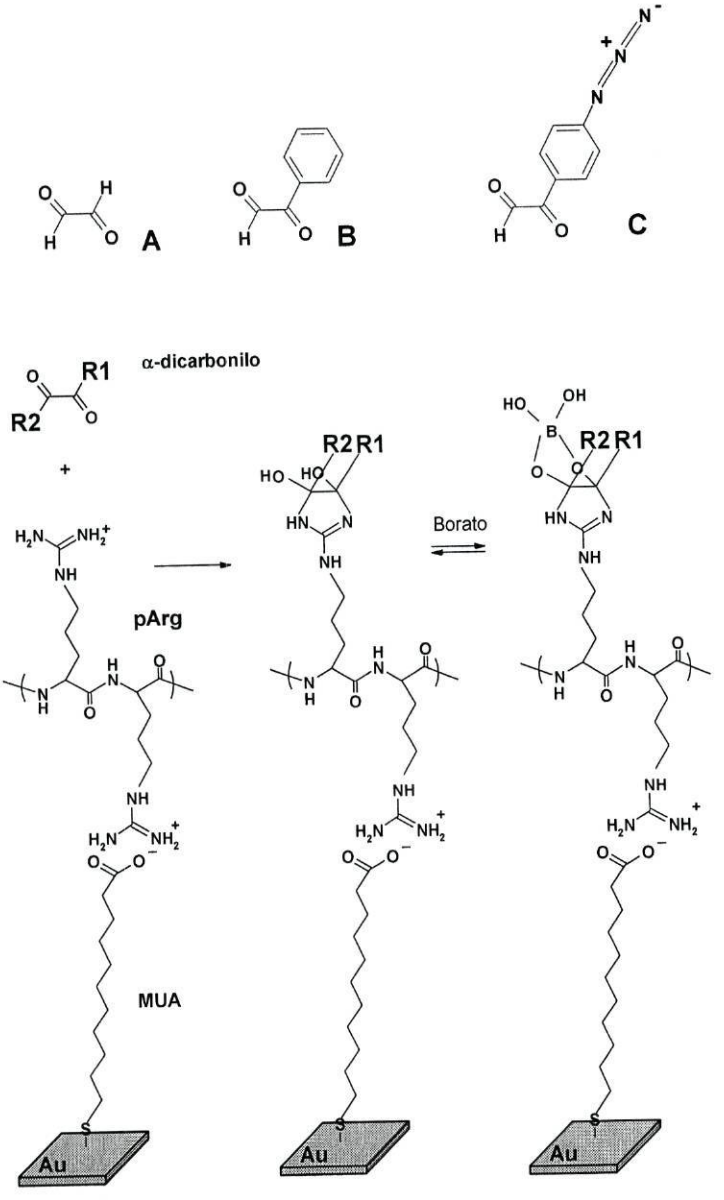


Figura 4.9: Esquema reaccional para a formação dos aductos de condensação heterocíclicos (dihidoxiimidazolidinas) entre os grupos guanidino das moléculas de pArg adsorvidas electrostaticamente e os várias moléculas contendo grupos α-dicarbonilo: A – glioxal, B – fenilglioxal, C – *p*-azidofenil glioxal. A possibilidade da estabilização pelo borato é tida em conta.

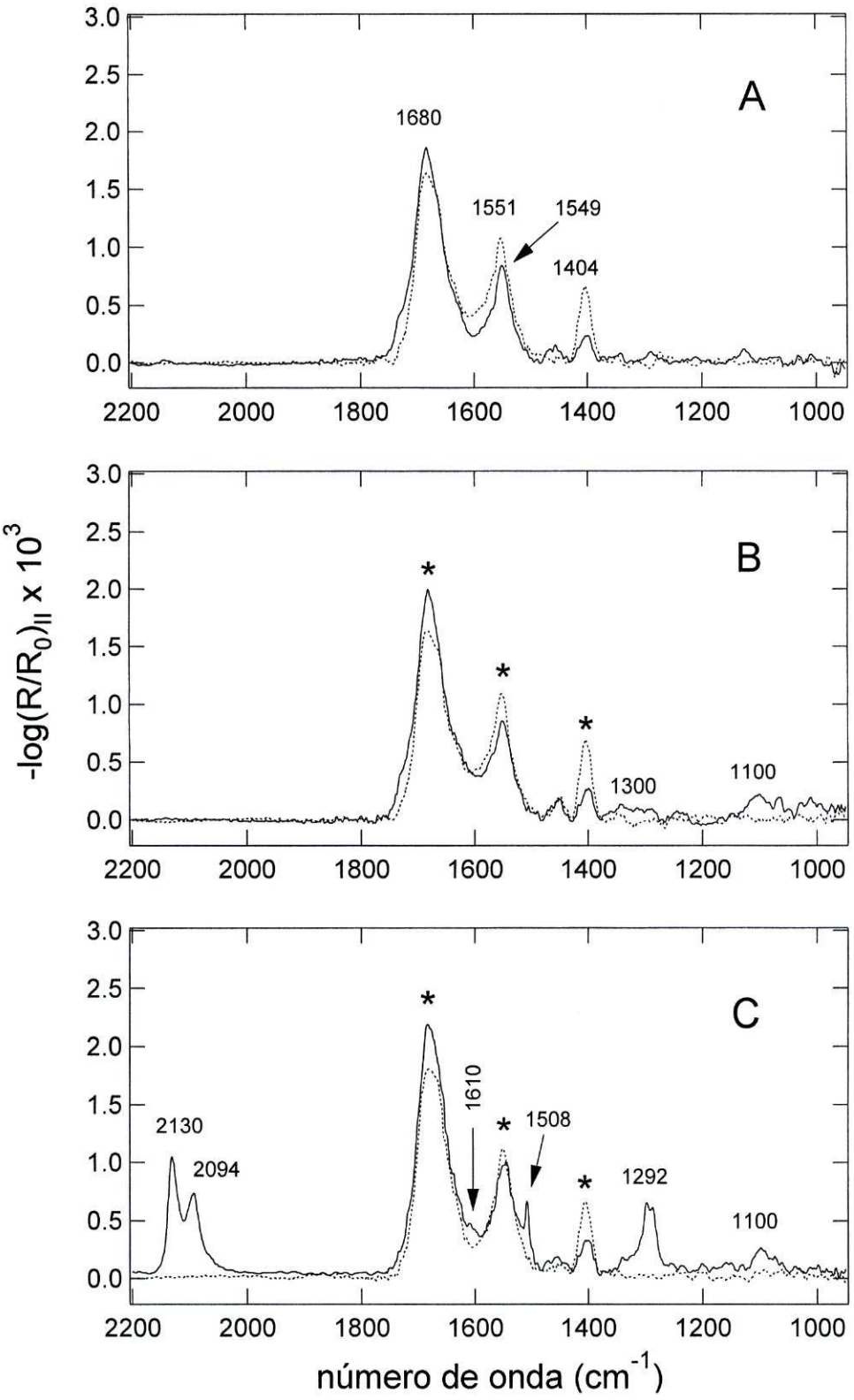


Figura 4.10: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à reacção dos α-dicarbonilos com os grupos guanidino na superfície (linhas contínuas). A – glioxal, B – fenilglioxal, C – APG. Os asteriscos (*) assinalam as variações no espectro causadas pelo deslocamento do equílibrio de ionização do MUA no sentido $COO^- \rightarrow COOH$ devido à ocorrência das reacções de superfície.

Os espectros são consistentes com a formação dos produtos representados na figura 4.9.

No caso da reacção do glioxal, figura 4.10A, o espectro não revela bandas intensas além das atribuídas ao MUA ou pArg. Este facto não é de estranhar já que o aducto formado neste caso não possui grupos que originem bandas intensas no infravermelho. Como se irá explicar mais adiante as variações nas bandas da estrutura MUA/pArg, assinaladas pelos asteriscos são, por si, uma boa evidência da ocorrência de reacção. Estas variações são observadas em todos os casos. No caso da reacção do fenilglioxal, figura 4.10B, aparece uma nova banda a ~1100 cm^{-1} que pode ser atribuída à combinação das vibrações de deformação do anel aromático e ao *stretching* C–O. A banda fraca a ~1300 cm^{-1} pode dever-se à combinação da deformação O–H e ao *stretching* B–O (devido à estabilização pelo borato).[20] A diferença entre este espectro e o correspondente à reacção do APG (figura 4.10C) são as bandas intensas a 2130 cm^{-1} (dupleto) e 1292 cm^{-1}, correspondendo, respectivamente ao *stretching* assimétrico $\nu_{as}(N{=}N{=}N)$ e simétrico $\nu_s(N{=}N{=}N)$ do grupo aril azeto, e o pico a 1509 cm^{-1} correspondente ao *stretching* do anel aromático para-substituído (tabela 4.5).

Medições de ângulos de contacto confirmam a ocorrência de modificação da superfície. O ângulo de contacto da superfície terminada com a camada de pArg aumentou de $42.8° \pm 1.8°$ para $62.3° \pm 1.0°$, $64.1° \pm 1.1°$ ou $63.1° \pm 0.5°$ após as reacções do glioxal, fenilglioxal e APG respectivamente (tabela 4.4). O decréscimo na hidrofilicidade da superfície sugere que parte dos grupos guanidino hidrofílicos reagiram com os reagentes contendo os grupos α-dicarbonilo. Os valores dos ângulos de contacto após reacção dos três compostos são semelhantes o que pode estar relacionado com o facto de originarem o mesmo tipo de produto, uma dihidoxiimidazolidina estabilizada pelo borato, figura 4.9.

Tabela 4.4: Evolução dos ângulos de contacto com a modificação da superfície desde a monocamada de MUA até à modificação da camada de pArg com os α-dicarbonilos.

Superfície	θ (graus)
MUA	51.6 ± 0.7
MUA+pArg	42.8 ± 1.8
MUA+pArg+Glioxal	62.3 ± 1.0
MUA+pArg+fenilglioxal	64.1 ± 1.1
MUA+pArg+APG	63.1 ± 0.5

Na figura 4.11 mostra-se como a extensão da modificação com α-dicarbonilos, exemplificada para o caso da reacção com o APG, pode ser controlada variando o pH da solução a partir da qual a pArg é adsorvida. Como referido na secção 4.2, há um aumento na quantidade de pArg adsorvida quando se usam soluções com pHs superiores a 11 relacionado com a diminuição da densidade de carga das cadeias de pArg (figura 4.3). O arranjo das moléculas na superfície também se altera, passando a haver um maior número de segmentos com poucos pontos de ligação, "laços" e "caudas" (figura 4.6) o que torna os grupos guanidino estereoquimicamante mais acessíveis para reacção com moléculas da solução.

Tabela 4.5: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para a superfície activada com o APG.

Superfície	$\overline{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição	Figura
APG	2130(dupla)	ν_{as}(N=N=N), stretching assimétrico do aril azeto[a]	4.10C, 4.11, 4.12C, 4.16, 4.17
	1610	ν(C=C), stretching do anel aromático	
	1509	ν(C=C), stretching do anel aromático	
	1292	ν_s(N=N=N)+δ(O–H)+ν(B–O), stretching simétrico do aril azeto[a], deformação OH da dupla carbinolamina e stretching BO[a]	
	1130, 1010	=C–H, deformação no plano do anel benzénico para-substituído	
	1100	ν(C–O), stretching CO	
MPSA	1215	$\nu_{as}(SO_3^-)$, stretching assimétrico do sulfonato	4.12B, 4.12C
	1041	$\nu_s(SO_3^-)$, stretching simétrico do sulfonato	

[a] da referência 75.

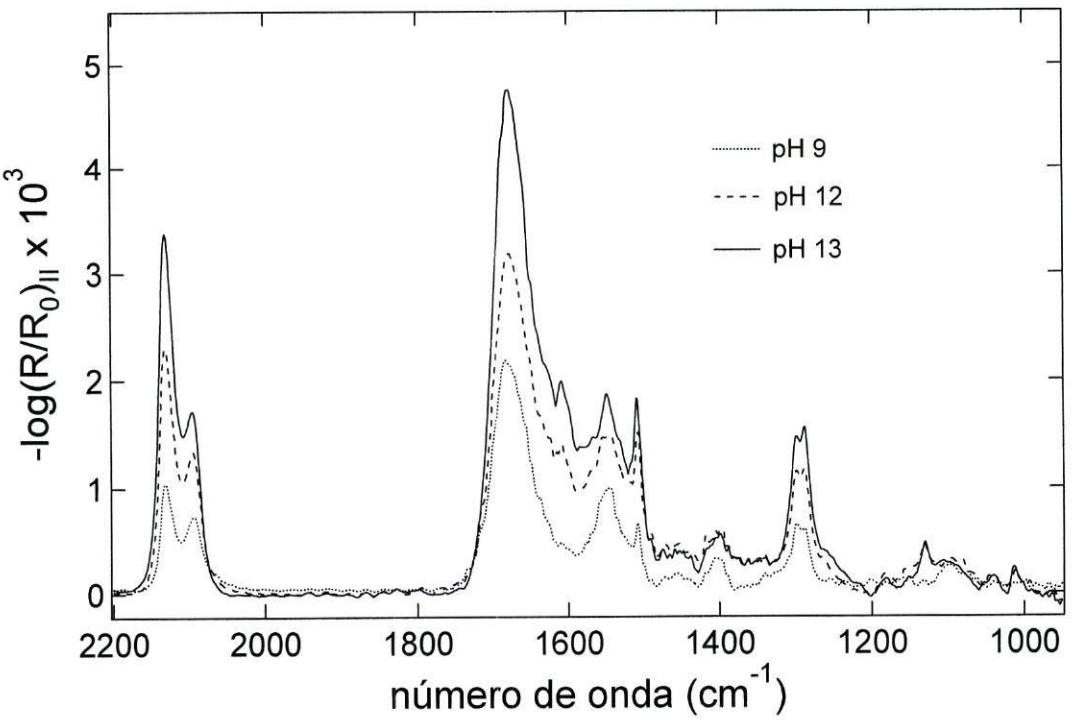


Figura 4.11: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à reacção do APG com superfícies terminadas com pArg adsorvida a partir de soluções com diferentes pHs.

Como foi referido, todos os espectros FT-IRRAS obtidos após reacção da superfície terminada pela camada de pArg com os α-dicarbonilos revelam variações nas bandas a 1680 cm^{-1}, 1551 cm^{-1} e 1405 cm^{-1}, previamente atribuídas ao conjunto MUA/pArg. Para explicar a origem destas variações foram tidas em consideração as seguintes observações: estas variações também são observadas em consequência da adsorção electrostática duma camada do polianião pSS sobre a estrutura MUA/pArg como é mostrado na figura 4.12A (a atribuição das bandas do pSS é feita na tabela 2.2), sugerindo que estas variações, nomeadamente o aumento na absorvância a 1680 cm^{-1}, não se deve a grupos carbonilo que não reagiram; por outro lado quando a pArg é adsorvida sobre uma monocamada formada por um alcanotiol contendo um grupo sulfónico como grupo ω, não são observadas estas variações quer no caso da adsorção electrostática da camada de pSS (figura 4.12B) quer no caso das reacções de superfície (figura 4.12C). Todos estes resultados apontam no sentido de estas variações estarem relacionadas com o MUA. O decréscimo na intensidade das bandas a 1405 cm^{-1} e 1551 cm^{-1}, que correspondem ao *stretching* simétrico e assimétrico respectivamente, do grupo

COO^-, é acompanhado pelo aumento de intensidade da banda a 1680 cm^{-1}, a região onde o grupo COOH absorve. Parece existir uma correlação entre as reacções que ocorrem ao nível da camada de pArg e o equílibrio de ionização do grupo ω-COOH da camada interna de MUA. Em estudos recentes[76,77] foi descrito um fenómeno semelhante. Quando um ácido policarboxílico foi adsorvido entre camadas de polielectrólitos fortes observaram-se oscilações no seu grau de ionização. O grau de ionização aumentava de cada vez que era depositada uma camada de policatião diminuindo de seguida quando se depositava a camada de polianião. Estas oscilações foram facilmente detectadas devido ao facto da absorção das formas protonada e desprotonada do grupo carboxilo ocorrer a frequências bastante distintas. As variações na extensão de ionização do MUA podem ser explicadas da seguinte forma: na estrutura formada pela camada de pArg adsorvida sobre o SAM de MUA a maioria dos grupos COOH estão ionizados devido a estarem envolvidos na formação de pares iónicos com os grupos guanidino da pArg. Por outras palavras o pK_a do grupo ω-COOH do MUA no conjunto MUA/pArg é menor que na monocamada de MUA.[3] O pK_a publicado para este último caso situa-se entre 6 e 7.[78] Quando parte dos grupos guanidino reagem com as moléculas contendo os grupos α-dicarbonilo, ou formam pares iónicos com os grupos sulfonato do pSS, alguns dos carboxilatos são deslocados e ficam livres para formar pares iónicos com iões pequenos (o meio reaccional é alcalino). Quando a superfície é lavada com água Millipore pH~6, estes iões pequenos são removidos. O balanço final é um aumento no número de moléculas de MUA protonadas relativamente à situação preexistente do MUA/pArg.

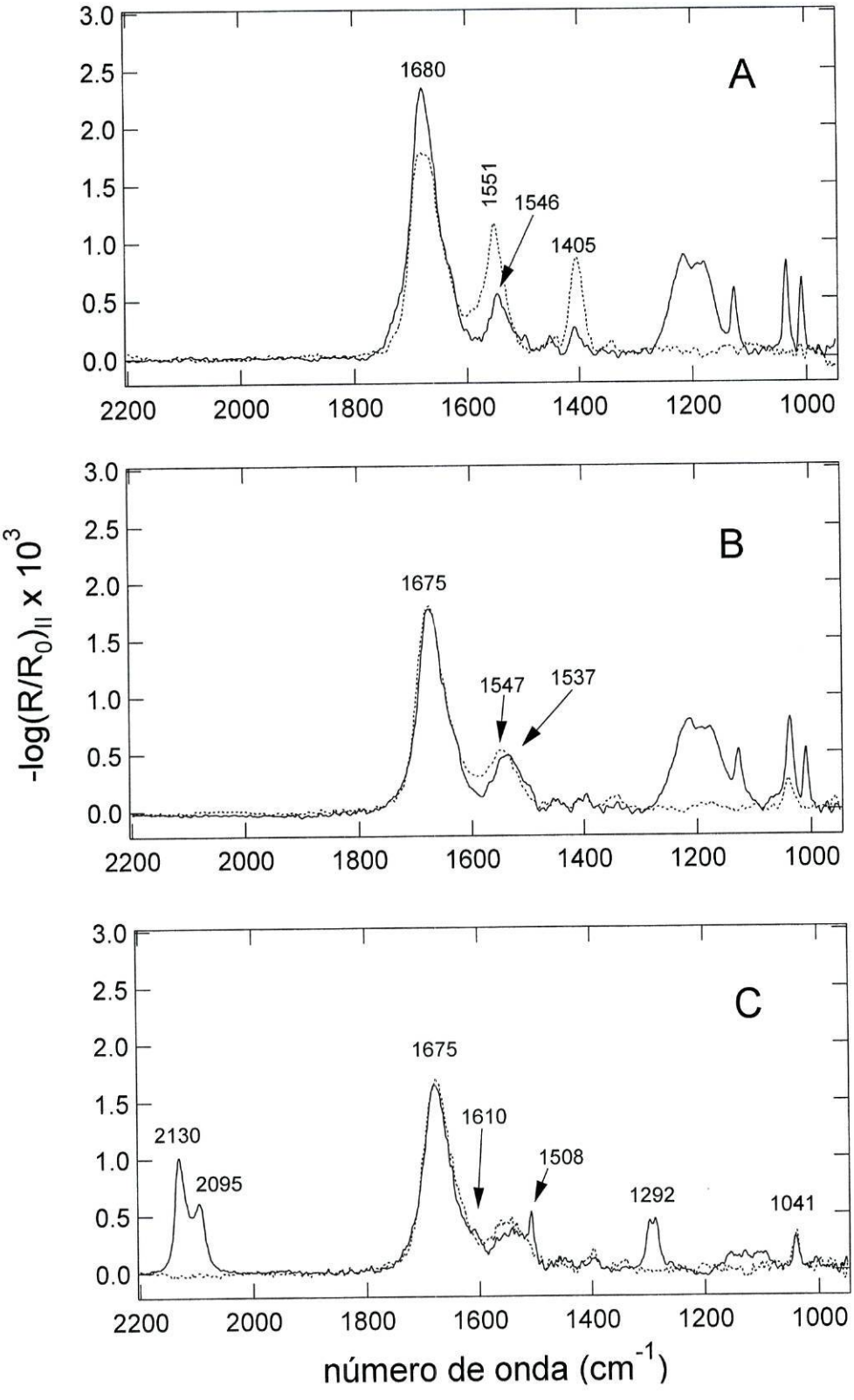


Figura 4.12: Espectros de FT-IRRAS resultantes da montagem electrostática duma camada de pSS (linhas contínuas) sobre a estrutura MUA/pArg (A), ou MPSA/pArg (B). O espectro C foi obtido após reacção do APG com a camada de pArg adsorvida sobre um SAM de MPSA.

Esta reorganização ocorre sempre que se adsorve uma nova camada, assim se ao filme terminado por pSS se adicionar mais uma camada de pArg, parte dos grupos sulfonato envolvidos em pares iónicos com a camada interior de pArg são deslocados para interagirem com grupos guanidino da nova camada de pArg. Por sua vez, os grupos da camada de pArg interna têm que compensar a sua carga por formação de pares iónicos com os grupos COO^-, aumentado assim o grau de ionização do MUA relativamente ao filme MUA/pArg/pSS. Parece, assim, haver uma reestruturação de todo o filme cada vez que se adsorve uma nova camada, existindo uma titulação progressiva do MUA. Este efeito pode ser observado quando se segue a montagem sequencial camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) do filme pSS/pArg sobre um SAM de MUA, figuras 4.13 e 4.14.

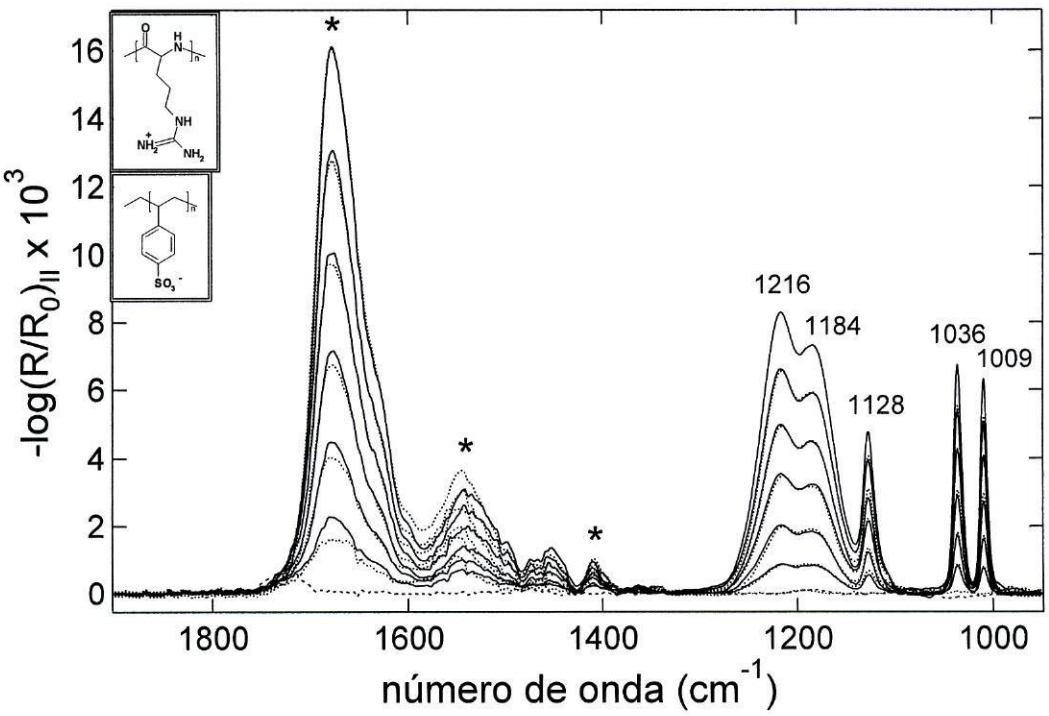


Figura 4.13: Espectros de FT-IRRAS da montagem camada-a-camada do filme pSS/pArg (as linhas a ponteado correspondem às camadas de pArg) numa monocamada de MUA. Os asteriscos assinalam as bandas com contribuição do grupo carboxilo do MUA.

Para comparação, na figura 4.14 são apresentados valores de absorvâncias para o mesmo filme montado sobre uma monocamada de MPSA.

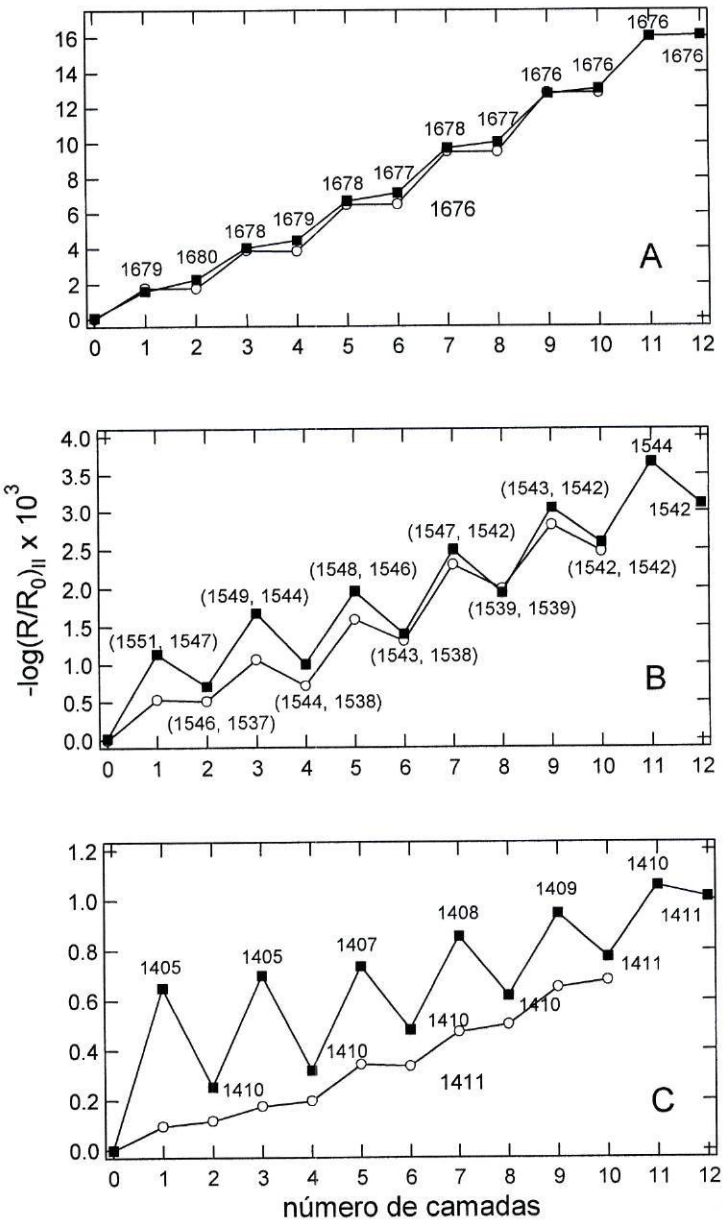


Figura 4.14: Evolução, camada-a-camada, da intensidade das bandas a ~1676 cm^{-1} (A), ~1542 cm^{-1} (B) e ~1411 cm^{-1} (C) para filmes pSS/pArg construídos sobre monocamadas de MUA (quadrados) ou MPSA (círculos).

Apesar das oscilações observadas nas bandas com contribuição do MUA (assinaladas pelos asteriscos, figura 4.13) é facilmente verificável que a intensidade das bandas cresce de uma forma linear com o número de bicamadas indicando um crescimento também linear para a massa de polielectrólito adsorvida. Se não fossem as oscilações relacionadas com a variação da extensão de ionização do MUA o crescimento da banda a ~1676 cm^{-1} (amida I + ν(C=O) do grupo COOH do MUA) e da

banda a ~1411 cm^{-1} ($\delta(CH_2)+\nu_s(COO^-)$) seria em degrau tal como quando se usa o MPSA como SAM (círculos na figura 4.14).

As oscilações não só nestas duas bandas como na banda a ~1542 cm^{-1} (amida II + $\nu_{as}(COO^-)$) atenuam-se com o número de camadas, até desaparecerem por completo após a adsorção de 6 bicamadas. As frequências das bandas vão-se aproximando dos valores das bandas na mesma posição para o filme construído sobre o MPSA. É provável que, após a adsorção de 5 bicamadas, todo o MUA exista já sob a forma COO^-; em qualquer caso a não observação da oscilação só permite afirmar que a nova carga adicionada (6ª camada de pArg) é compensada sem a intervenção do MUA, talvez porque a reestruturação referida não se propaga para além de 4 bicamadas.

O carácter oscilatório da banda a ~1542 cm^{-1} não está somente associado ao equílibrio de ionização do MUA já que também é observado no caso do MPSA embora a maior oscilação observada para as camadas iniciais no caso do MUA (bem como os valores da frequência) reflicta a contribuição da banda $\nu_{as}(COO^-)$, figura 4.14B. Estas oscilações na posição mas sobretudo na intensidade da banda, que diminui de ~0.00035 u.a. de cada vez que se adsorve a camada de pSS, já foram observadas por outros investigadores[7] no caso de filmes de poli-L-lisina, na situação em que esta é imobilizada na superfície por ligações covalentes por comparação com a imobilização associada a interacções electrostáticas e foram associadas a variações no número de ligações de hidrogénio ou a alterações na conformação do polipéptido.

Granick e colaboradores[76] sugeriram o uso de um poliácido fraco inserido num filme de multicamadas para o desenvolvimento de sensores para detecção da adsorção de poliões. Os resultados aqui apresentados demonstram que é possível detectar a ocorrência de formação de ligações covalentes ao nível da camada de pArg, seguindo as variações no espectro FT-IRRAS associadas ao deslocamento do equilíbrio de ionização de um SAM de MUA, sobre o qual a pArg foi electrostaticamente adsorvida.

Como pode ser observado por comparação da figura 4.10 com a figura 4.12A, a adsorção electrostática da camada de pSS parece ter um maior efeito sobre o equilíbrio de ionização do MUA que a formação de ligação covalente com as moléculas pequenas. A interacção entre as macromoléculas de pArg e pSS deve, portanto, envolver um maior número de grupos guanidino. Se atendermos ao tipo de interacções envolvidos nas duas

situações é compreensível que assim seja: a reacção química deve estar limitada aos grupos mais superficiais já que tem alguns requerimentos estereoquímicos para ocorrer ao passo que a adsorção electrostática da molécula de polianião se caracteriza por uma interpenetração considerável entre as camadas de polielectrólito[1] e inversão da carga superficial.[79]

4.4 Utilização da adsorção electrostástica da poli-L-arginina para imobilização de proteínas em superfícies de ouro

Os passos do processo químico de imobilização das proteínas idealizado são apresentados na figura 4.15.

No primeiro passo, a molécula de *p*-azidofenil glioxal (APG), que é um derivado do glioxal contendo o grupo fotossensível fenilazeto, é feito reagir com a camada de pArg. Desta reacção resulta um produto de condensação heterocíclico, como foi descrito na secção anterior, ficando a metade foto-reactiva disponível para *cross-linking* por fotoactivação. No segundo passo a superfície foto-reactiva, imersa na solução de proteína alvo, é exposta a luz UV, daí resultando a sua foto-imobilização. O nitreno que resulta da fotólise do arilazeto, é um intermediário extremamente reactivo podendo reagir de diversas formas, figura 4.2.[58-60] O caminho mais provável é a expansão do anel com a formação um intermediário, uma dehidroazepina,[59] que é extremamente reactiva relativamente a grupos nucleófilos, especialmente aminas. Este é o caminho reaccional esquematizado na figura 4.15.

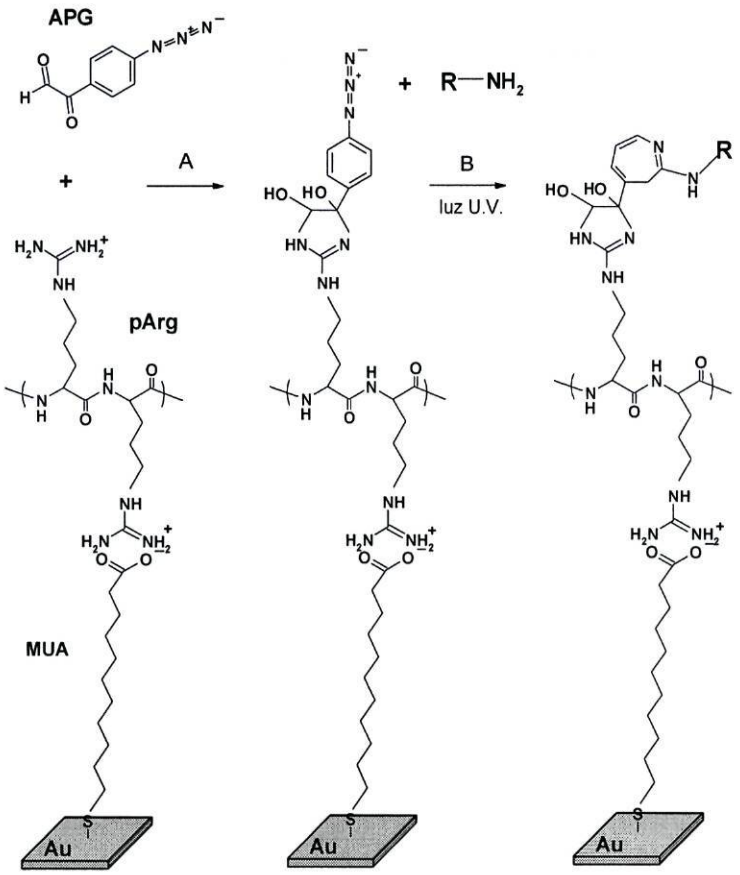


Figura 4.15: Esquema da ligação fotoquímica de proteínas a superfícies. Alguns grupos guanidino da pArg adsorvida electrostaticamente, são feitos reagir com o grupo α-dicarbonilo da molécula de APG, resultando desta reacção uma superfície terminada por um grupo foto-reactivo arilazeto (A). Fotólise subsequente com luz UV, na presença da proteína alvo, conduz à sua imobilização na superfície por formação de ligações covalentes.

Na figura 4.16 são mostradas as alterações observadas no espectro FT-IRRAS em função do tempo de fotólise, durante a imobilização covalente da poli-L-lisina. Os resultados mostram que 5 minutos de irradiação são suficientes para converter ~90% do aril azeto. O aumento de intensidade, nomeadamente das bandas amida I a 1670 cm^{-1} e amida II a 1547 cm^{-1}, indicam a imobilização do polipéptido. Após a reacção também é observado um aumento da hidrofilicidade da superfície consistente com a imobilização de poli-L-lisina: o ângulo de contacto decresce de $63.1° \pm 0.5°$ para $54.1° \pm 1.3°$.

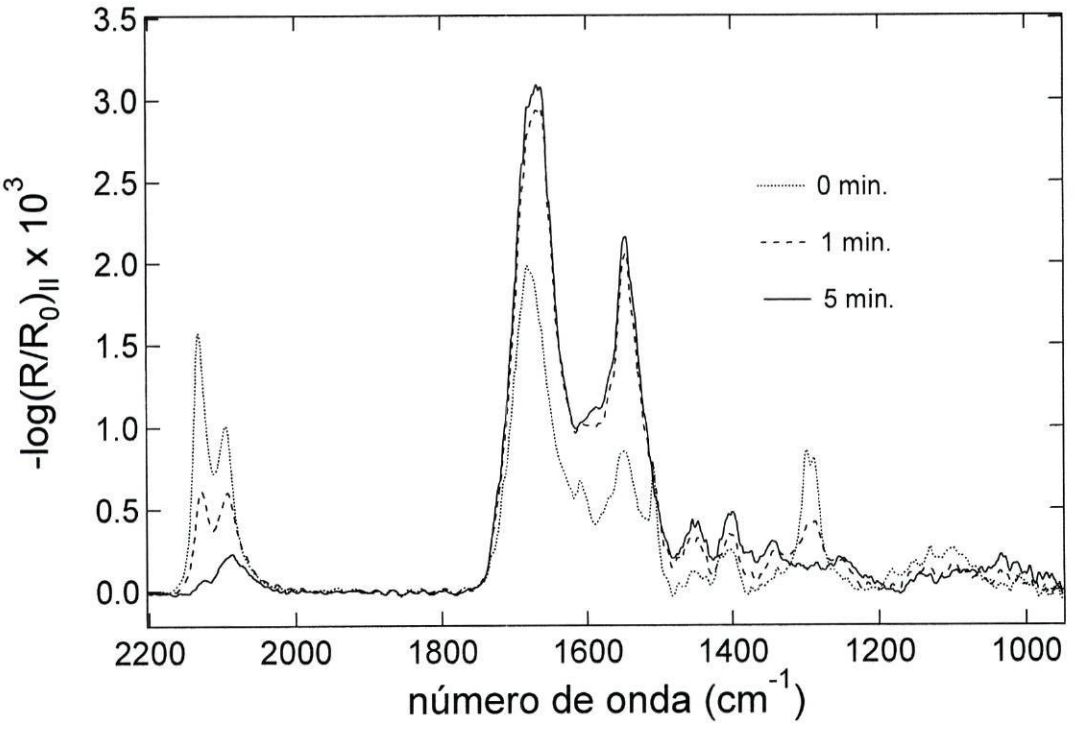


Figura 4.16: Espectros de FT-IRRAS da imobilização fotoquímica da poli-L-lisina, mostrando o desaparecimento das bandas do azeto durante a fotólise. A imobilização da poli-L-lisina é evidenciada pelo aumento das bandas amida.

Também é possível observar que a quantidade de poli-L-lisina imobilizada aumenta pouco após o primeiro minuto de fotólise. Isto pode indicar que o aril azeto ainda por reagir após esse intervalo de tempo, reage com grupos de moléculas já imobilizadas, aumentando o número de pontos de ligação para a mesma molécula. É de esperar que isto ocorra para moléculas grandes, com múltiplos pontos de reacção.

Esta estratégia foi implementada para imobilizar outras proteínas, o tripéptido Gly-Gly-His, a glucose oxidase (GOx) e o anticorpo HIgG (imunoglobulina G humana).

Na figura 4.17 são mostrados os espectros FT-IRRAS obtidos após as reacções de foto-imobilização.

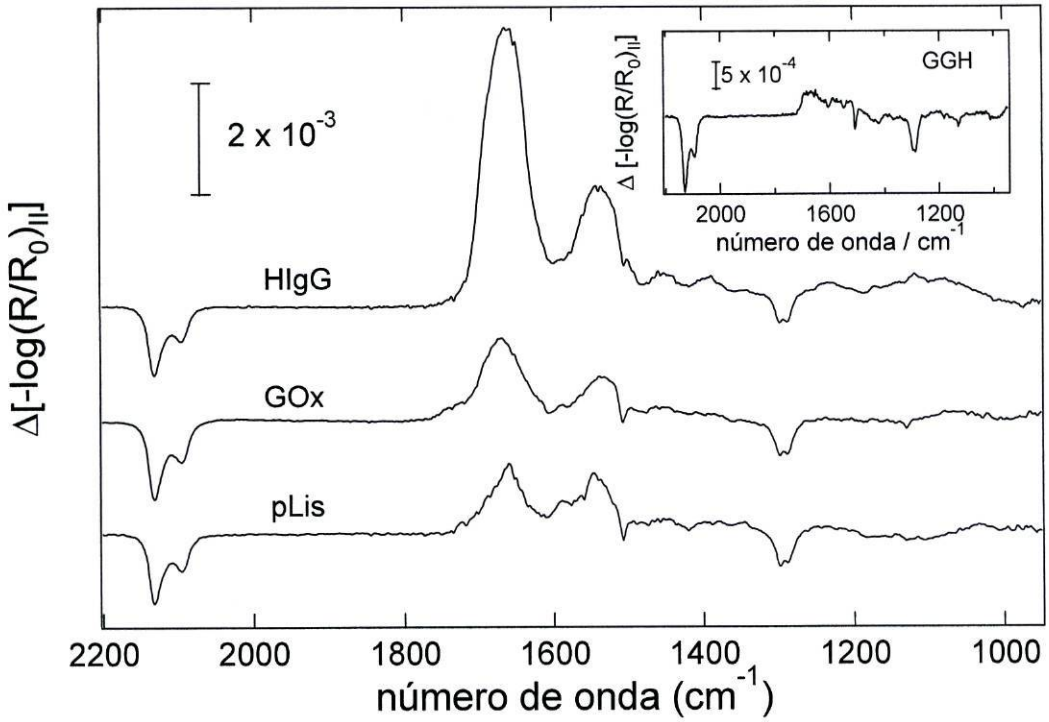


Figura 4.17: Espectros de FT-IRRAS obtidos após foto-imobilização das proteínas poli-L-lisina (pLis) (baixo), glucose oxidase (GOx) (centro) HIgG (cima) e Gly-Gly-His (GGH) figura inserida. A superfície de referência foi a terminada com o APG.

Os espectros mostram para todas as imobilizações o desaparecimento, após fotólise, das bandas do azeto a 2130 cm^{-1}, 1509 cm^{-1} e 1292 cm^{-1} acompanhado pelo aumento de intensidade das bandas amida I e amida II. As variações nos ângulos de contacto (tabela 4.6) também suportam a ocorrência de modificação.

Tabela 4.6: Ângulos de contacto após a imobilização das proteínas.

Superfície	**θ (graus)**
MUA+pArg+APG	63.1 ± 0.5
MUA+pArg+APG+pLis	54.1 ± 1.3
MUA+pArg+APG+GOx	55.9 ± 1.5
MUA+pArg+APG+GGH	54.8 ± 1.8

É notório que o aumento na intensidade das bandas amida, logo a quantidade de proteína imobilizada é bastante menor no caso do tripéptido Gly-Gly-His comparativamente com os polipéptidos. Este resultado pode dever-se ao facto da

reacção do nitreno ser extremamente rápida e pouco específica daí resultando uma menor eficiência na imobilização de moléculas pequenas com poucos pontos de reacção. Os rendimentos mais elevados no caso das macromoléculas podem ser explicados pelo facto destas possuirem múltiplos pontos onde o nitreno pode "atacar".

Também é de referir que os grupos guanidino por reagir transportam carga positiva o que pode dificultar a imobilização no caso de proteínas com excesso de carga positiva por dificultar a sua aproximação à superfície devido a repulsões electrostáticas. Este facto pode ajudar a explicar o porquê da quantidade de pLis imobilizada ser bastante inferior à de HIgG. Outros factores que podem condicionar a extensão de imobilização das proteínas são o número de grupos amino disponíveis para reacção e a estrutura das proteínas. O primeiro factor por estar relacionado com o número de sítios onde o nitreno pode atacar e o segundo porque a estrutura condiciona a forma como as macromoléculas se organizam na superfície.

O facto dos grupos externos da GOx serem essencialmente cadeias de oligossacáridos pode ser o principal factor que condiciona a extensão de imobilização desta enzima.

A HIgG apesar de não possuir tantos pontos de ligação possíveis como a poli-L-lisina, tem um ponto isoeléctrico de aproximadamente 6.8, o que significa que não é repelida da superfície. É também uma molécula bastante maior (~150 kDa) que a poli-L-lisina e possui uma estrutura em forma de Y o que pode favorecer o empacotamento de mais moléculas na superfície.

4.5 Imunoteste

A imobilização da HIgG proporciona uma boa forma de testar a viabilidade do processo químico apresentado. As imunoglobulinas têm grande afinidade para ligandos específicos (<1μM) de forma que a avaliação da retenção da sua bioactividade após imobilização pode ser feita duma forma prática e ao mesmo tempo relevante. A interacção entre a HIgG imobilizada e o anticorpo secundário específico (anti-HIgG) foi empregue com esta finalidade. As imagens de fluorescência, obtidas em duas experiências são apresentadas na figura 4.18.

A imagem A foi obtida após exposição da superfície de HIgG a uma gota de secundário específico anti-HIgG (*goat anti-human*) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FTIC). A mancha escura indica que se formou um par complementar anticorpo-antigénio na área onde a gota foi inicialmente colocada. A experiência correspondente à imagem B foi realizada com o propósito de avaliar a extensão da adsorção não-específica. Foram colocadas duas gotas na superfície terminada com HIgG, uma na metade superior duma solução contendo o secundário específico, outra na metade inferior contendo um secundário não-específico (anti-coelho (*swine anti-rabbit)* marcado com FTIC). Como é visível existe uma diferença enorme na fluorescência das duas manchas o que demonstra que a extensão de interacção não-específica é desprezável.

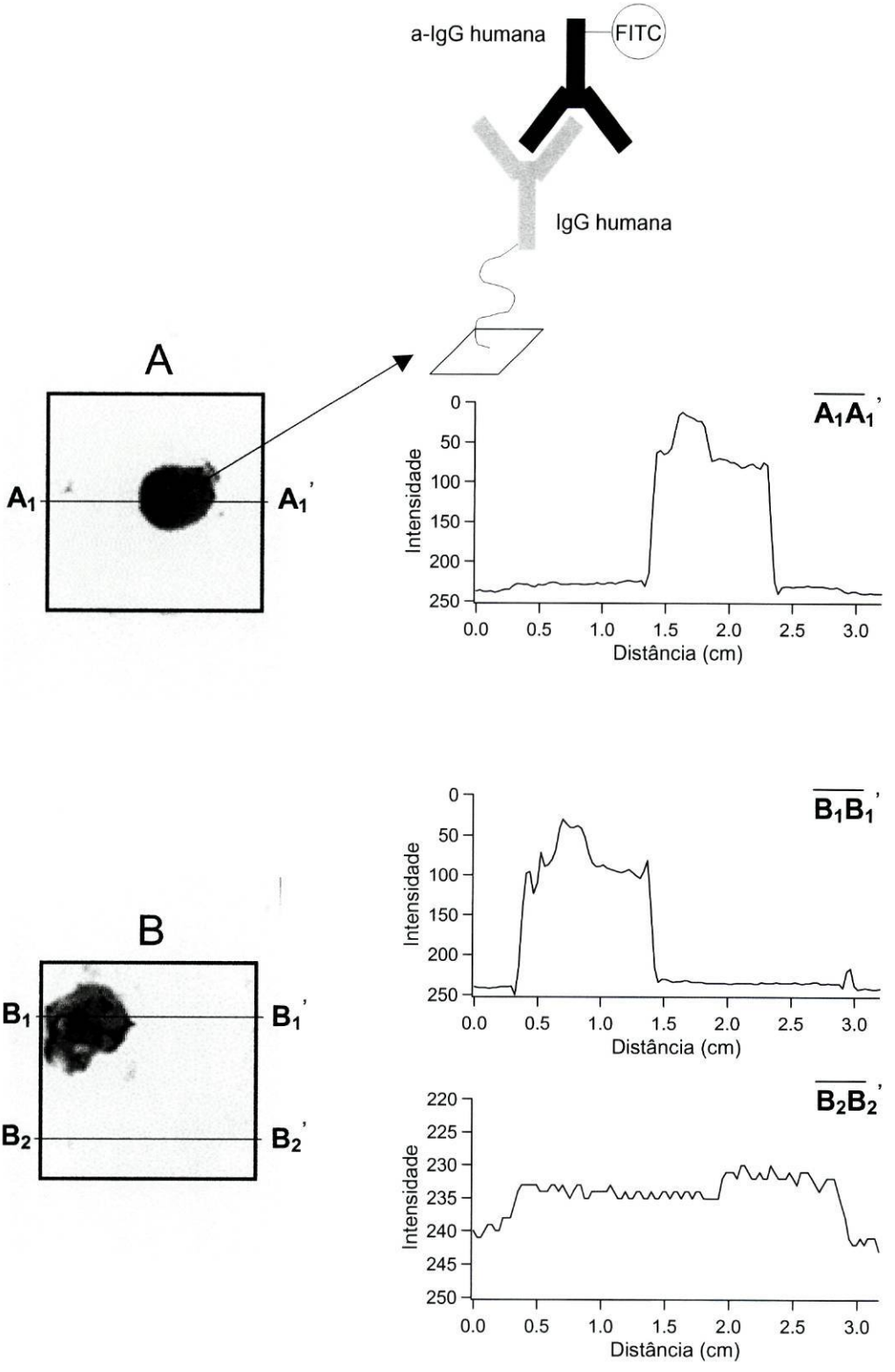


Figura 4.18: Imagens e perfis de intensidade de fluorescência do imunoteste: A - superfície terminada pela HIgG sondada com anti-HIgG marcado com FTIC. B - experiência controlo onde se demonstra a insignificância da adsorção não-específica. A mancha escura corresponde à solução contendo o secundário específico como na imagem A. Uma gota de uma solução contendo um secundário não-específico (anti-coelho IgG marcada com FTIC) foi colocada na metade inferior do slide.

4.6 Conclusões

Este estudo demonstra que a adsorção electrostática da poli-L-arginina proporciona uma plataforma versátil para modificar superfícies devido às propriedades do grupo guanidino: a sua forte basicidade (pK_a>12) e a sua capacidade para formar aductos heterocíclicos estáveis com reagentes contendo grupos α-dicarbonilo. A primeira propriedade garante resistência à desorção conferindo robustez a toda a química de modificação que se baseie na adsorção electrostática da pArg, enquanto que a condensação de α-dicarbonilos permite ligar covalentemente moléculas à superfície modificada com pArg. A utilidade prática deste processo químico foi exemplificada através da criação duma superfície foto-reactiva, obtida por reacção da superfície terminada com poli-L-arginina com um reagente α-dicarbonilo contendo um grupo arilazeto, que foi utilizada na imobilização de anticorpos com retenção da sua actividade biológica. Estes resultados antevêm a possível aplicação desta estratégia de imobilização no fabrico de imunosensores.

4.7 Procedimento experimental e instrumentação

I. Reagentes e Material

Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, Aldrich), 3-mercaptopropanossulfonato de sódio (MPSA, Aldrich), hidrocloreto de poli-L-arginina (MM, 38 300) (pArg, Sigma), poli-L-glutamato de sódio (MM, 71 700) (pGlu, Sigma), poli-L-tirosina (MM, 16 500) (pTir, Sigma), glioxal (Sigma), fenilglioxal (Fluka), *p*-azidofenil glioxal (APG, Pierce), poli(4-estirenessulfonato de sódio) (MM, 70 000) (pSS, Aldrich), etanol (absoluto, AGA), metanol (Merck, p.a.), ácido bórico (SIF), HCl (Merck), NaOH (Pronalab), H_2SO_4 (Pronalab), peróxido de hidrogénio 30% (Pronalab), NH_3 (solução 25%) (Merck), NaCl (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck), KCl (Merck), acetona (Riedel-deHaën), ácido acético 100% (Pronalab), hidrobrometo de poli-L-lisina (MM, 32 600) (pLis, Sigma), Gly-Gly-His (Sigma), glucose oxidase (GOx) de Aspergillus niger (23 U/mg) (Fluka), IgG humana (HIgG) (Sigma), IgG anti-humana (desenvolvida em cabra, *goat anti-human IgG*) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), anti-coelho IgG (desenvolvida em porco, *swine anti-rabbit IgG*) marcada com FITC (DAKO).

Na preparação de soluções e nos procedimentos de lavagem foi utilizada água Millipore (resistividade > 18 MΩ·cm).

Os slides de Au (18 mm × 18 mm , 5 nm Cr, 100 nm Au) (figura 2.1) foram adquiridos à empresa Evaporated Metal Films e foram utilizados como substracto após lavagem com acetona seguida de imersão numa solução 3:1 de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogénio (30%) (solução "piranha") durante aproximadamente 1 minuto e lavagem com água Millipore.

Atenção! O manuseamento da solução "piranha" requer cuidados especiais visto tratar-se duma solução altamente corrosiva que reage violentamente com matéria orgânica.

II . Química de modificação da superfície

Os alcanotióis MUA ou MPSA foram quimissorvidos nas superfícies de Au a partir de soluções 1 mM em etanol durante pelo menos 24 hrs. Após automontagem as superficies foram minuciosamente lavadas com etanol e àgua sendo depois secas numa corrente de N_2.

a. Adsorção electrostática da poli-L-arginina

A poliarginina (pArg) foi adsorvida electrostaticamente sobre a monocamada de alcanotiol mergulhando o substracto numa solução 1 mg/mL de pArg em meio tampão (pHs 8.2-13, dependendo da aplicação). Os tampões empregues foram borato (pHs 8.2-10), amonia (pH 10 e 11.2) e soluções de NaOH (0.01 M (+0.09 M NaCl) e 0.1 M). Foram feitas experiências em que se variou o tempo de imersão do subtracto na solução de pArg e observou-se que a quantidade depositada não aumentava após 10 minutos indicando que o equilíbrio se atinge nos primeiros minutos de imersão. Após adsorção a superfície foi lavada com água e seca numa corrente de N_2.

b. Montagem camada-a-camada com base em interacções electrostáticas (LBLA) dos filmes de polielectrólitos

A montagem camada-a-camada dos filmes de polipéptidos pArg/pGlu e pArg/pTir foi feita por repetição sequencial da exposição da superfície de Au modificada com a monocamada de alcanotiol com o grupo ω ionizável a soluções de pArg (1 mg/mL, tampão NH_3/NH_4^+ 0.1 M pH 9 ou NaOH 0.01 M) seguida da solução de polianião (1mg/mL, tampão NH_3/NH_4^+ 0.1 M pH 9 no caso do pGlu e 0.5 mg/mL NaOH 0.01 M no caso da pTir) durante 10 minutos em cada caso. Entre cada imersão, a superfície foi lavada com água e seca numa corrente de N_2. A adsorção de pSS foi levada a cabo mergulhando a superfície terminada com a camada de pArg numa solução 1 mg/mL de pSS (preparada no mesmo tampão) durante 10 minutos.

c. Reacções de superfície

A reacção do glioxal com a camada de pArg (adsorvida a partir de tampão borato 0.1 M pH 9) foi levada a cabo molhando a superfície terminada com pArg com uma solução

de 10 mM do glioxal tamponada a pH 9 (tampão borato 0.1 M) durante 4 horas. No caso do fenilglioxal usou-se uma mistura 1:1 de metanol e tampão borato como solvente. Foi demonstrado[80] que a presença de borato no meio reaccional aumenta a velocidade da reacção que conduz à formação dos aductos entre a arginina e compostos carbonilo e evita a formação de produtos de diadição.

A superfície foto-reactiva foi obtida molhando a superfície terminada com pArg numa solução de APG 6 mM (tampão borato pH 8.5) durante pelo menos 4 hrs. Esta reacção foi realizada no escuro e a superfície resultante foi manipulada sempre em condições de fraca luminosidade de forma a evitar a perda de actividade.
Após cada reacção a superfície foi minuciosamente lavada com tampão e água e seca numa corrente de N_2.

A imobilização das proteínas foi levada a cabo expondo a superfície terminada com a camada de APG mergulhada na solução de proteína 1 mg/mL (tampão borato pH 8.5, tampão fosfato salino (PBS, 10 mM tampão fosfato, 3 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7.4) no caso dos anticorpos) a luz UV (λ = 312 nm) durante 5 minutos. A lâmpada usada foi uma Vilber Lourmat TFX-20M com uma potência de aproximadamente 180 W. O intervalo de activação do APG vai de 240 a 350 nm.[81]
Após foto-imobilização a superfície foi cuidadosamente lavada com tampão e água.

III. Caracterização da superfície usando FT-IRRAS

Todos os passos de modificação da superfície foram seguidos por FT-IRRAS tendo sido usada a montagem experimental e o procedimento descrito no capítulo2.

IV. Medição dos ângulos de contacto

Os ângulos de contacto são extremamente sensíveis à composição e estrutura duma superfície daí a sua frequente utilização para caracterizar superfícies.[64]

A modificação da superfície de ouro foi seguida medindo a variação no ângulo de contacto formado por uma gota de àgua Millipore na superfície. Foi utilizado um sistema Dataphysics Contact Angle System OCA (Dataphysics Instruments GmbH Hamburgo, Alemanha). As medições foram realizadas a 25° C em condições de 100% de humidade. Os ângulos de contacto foram medidos fazendo descer gotas com 4 μL a partir duma agulha de ponta plana ligada a uma seringa de 500 μL. O ângulo de contacto foi medido imediatamente após a gota se ter separado da ponta da agulha. Foi usado o programa de ajuste de elipses fornecido com o software SCA 202. Cada ângulo é a média de, pelo menos, 5 medições.

V. Imunoteste

A retenção da actividade biológica dos anticorpos imobilizados foi avaliada através dum imunoteste. Após a foto-imobilização do anticorpo primário HIgG, o slide foi lavado com esguicho de PBS e imerso em 50 mL de PBS durante aproximadamente 1 hr. Após este período a superfície foi novamente lavada com um esguicho de PBS e exposto ao anticorpo secundário marcado com FTIC (10 μg/mL em PBS). A incubação decorreu durante 30 min. numa câmara húmida. Após o período de incubação a superfície foi lavada, primeiro com PBS (esguicho) e depois por imersão durante 10 mins. em 50 mL de PBS. As imagens de fluorescência destas amostras foram obtidas num Typhon variable mode imager de marca Molecular Dynamics. As superfícies foram colocadas com a face voltada para baixo no tabuleiro do scanner colocando-se uma gota de PBS entre o slide e a superfície do tabuleiro. As amostras foram protegidas da luz durante todos os passos que antecederam a imagiologia.

4.8 Bibliografia

(1) Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.

(2) Lowack, K.; Helm, C. A. *Macromolecules* **1998**, *31*, 823-833.

(3) Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213-4219.

(4) Schönherr, H.; Feng, C.; Shovsky, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 10843-10851.

(5) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3736-3740.

(6) Jordan, C. E.; Frey, B. L.; Kornguth, S.; Corn, R.M. *Langmuir* **1994**, *10*, 3642-3648.

(7) Frey, B. L.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187-3193.

(8) Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4939-4947.

(9) Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4948-4956.

(10) Gillmor, S. D.; Thiel, A. J.; Strother, T. C.; Smith, L. M.; Lagally, M. G. *Langmuir*, **2000**, *16*, 7223-7228.

(11) Strother, T. C.; Cai, W.; Zao, X.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205-1209.

(12) Frey, B. L.; Jordan, C. E.; Kornguth, S.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4452-4457.

(13) Huang, N.-P.; Vörös, J.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2002**, *18*, 220-230.

(14) Creighton, T. E. *Proteins, Structures and molecular properties*; Freeman: New York, 1984.

(15) Pathy, L.; Thész, J. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *105*, 387-393.

(16) Glomb, M. A.; Lang, G. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 1493-1501.

(17) Konishi, K.; Fujioka, M. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8496-8502.

(18) Yamasaki, R. B.; Shimer, D. A.; Feeney, R. E. *Anal. Biochem.* **1981**, *111*, 220-225.

(19) Pathy, L.; Smith, E. L. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 557-564.

(20) Riccio, A.; Lanzi, M.; Antolini, F.; De Nitti, C.; Tavani, C.; Nicolini, C. *Langmuir* **1996**, *12*, 1545-1549.

(21) Lvov, Y.; Möhwald, H. Eds. *Protein Architecture, Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*; Marcel Dekker: Nova Iorque, 2000.

(22) Hermanson, G. T.; Krishna Mallia, A.; Smith, P. K. In *Immobilized Affinity Ligand techniques*; Academic Press: New York, 1992.

(23) (a) Pandey, A.; Mann, M. *Nature* **2000**, *405*, 837-846. (b) Templin, M. F.; Stoll, D.; Schrenk, M.; Traub, P. C.; Vöhringer, C. F.; Joos, T. O. *Trends Biotech.* **2002**, *20*, 160-166. (c) MacBeath, G. *Nature Genet.* **2002**, *32*, 526-532.

(24) Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M. *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.

(25) Renault, J. P.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E.; Kreiter, M.; Hecht, B.; Wild, U. P. *J. Phys. Chem B* **2003**, *107*, 703-711.

(26) Howell, S. W.; Inerowicz, H. D.; Regnier, F. E.; Reifenberger, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 5263-5268.

(27) MacBeath, G.; Schreiber, S. L. *Science*, **2000**, *289*, 1760-1763.

(28) (a) Avseenko, N. V.; Morozova, T. Y.; Ataullakhanov, F. I.; Morozov, V. N. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6047-6052. (b) Avseenko, N. V.; Morozova, T. Y.; Ataullakhanov, F. I.; Morozov, V. N. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 927-933.

(29) Ng, H. T.; Fang, A.; Huang, L.; Li, S. F. Y. *Langmuir* **2002**, *18*, 6324-6329.

(30) Fang, Y.; Frutos, A. G.; Lahiri, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2394-2395.

(31) Li, Y.; Reichert, W. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1557-1566.

(32) Fall, B. I.; Eberlein-König, B.; Behrendt, H.; Niessner, R.; Ring, J.; Weller, M. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 556-562.

(33) Bhatia, S. K.; Teixeira, J. L.; Anderson, M.; Shriver-Lake, L. C.; Calvert, J. M.; Georger, J. H.; Hickman, J. J.; Dulcey, C. S.; Schoen, P. E.; Ligler, F. S. *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 197-205.

(34) Wachter, E.; Machleidt, W.; Hofner, H.; Otto, J. *FEBS Lett.* **1973**, *35*, 97-102.

(35) Rowe, C. A.; Tender, L. M.; Feldstein, M. J.; Golden, J. P., Scruggs, S. B.; McCraith, B. D.; Cras, J. J.; Ligler, F. S. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3846-3852.

(36) Brown, K. R.; Keating, C. D.; Grabar, K. C.; Smith, P. C.; Botha, G. H.; Natan, M. J. in *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*; Ratner, B. D.; Castner, D. G., Eds; Plenum Press: Nova Iorque, 1997.

(37) Perret, E.; Leung, A.; Morel, A.; Feracci, H.; Nassoy, P. *Langmuir* **2002**, *18*, 846-854.

(38) Nath, N.; Chilkoti, A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 709-715.

(39) Wright, J.; Ivanova, E.; Pham, D.; Filipponi, L.; Viezzoli, A.; Suyama, K.; Shirai, M.; Tsunooka, M.; Nicolau, D. V. *Langmuir* **2003**, *19*, 446-452.

(40) Dubrovsky, T. B. In *Protein Architecture, Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*; Lvov, Y.; Möhwald, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000.

(41) Nakanishi, K.; Muguruma, H.; Karube, I. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1695-1700.

(42) Weiping, Q.; Bin, X.; Danfeng, Y.; Yihua, L.; Lei, W.; Chunxiao, W.; Fang, Y.; Zhuhong, L.; Yu, W. *Mater. Sci. Eng.C* **1999**, *8-9*, 475-480.

(43) Browning-Kelley, M. E.; Wadu-Mesthrige, K.; Hari, V.; Liu, G. Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 343-350.

(44) Pritchard, D. J.; Morgan, H.; Cooper, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 91-93.

(45) Delamarche, E.; Sundarabadu, G.; Biebuyck, H.; Michel, B.; Gerber, C.; Sigrist, H.; Wolf, H.; Ringsdorf, H.; Xanthopoulos, N.; Mathieu, H. J. *Langmuir* **1996**, *12*, 1997-2006.

(46) Baas, T.; Gamble, L.; Hauch, K. D.; Castner, D. G.; Sasaki, T. *Langmuir* **2002**, *18*, 4898-4902.

(47) Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.

(48) Hong, M.-Y.; Yoon, H. C.; Kim, H.-S. *Langmuir* **2003**, *19*, 416-421.

(49) Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268-277.

(50) Hodneland, C. D.; Lee, Y.-S.; Min, D.-H.; Mrksich, M. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **2002**, *99*, 5048-5052.

(51) Veiseh, M.; Zareie, M. H.; Zhang, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 6671-6678.

(52) Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 6485-6490.

(53) Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3427-3433.

(54) Franchina, J. G.; Lackowski, W. M.; Dermody, D. L.; Crooks, R.M.; Bergbreiter, D. E.; Sirkar, K.; Russel, R.J.; Pishko, M. V. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3133-3139.

(55) Spinke, J.; Liley, M.; Guder, H.-J.; Angermaier, L.; Knoll, W. *Langmuir* **1993**, *9*, 1821-1825.

(56) Lahann, J.; Balcells, M.; Rodon, T.; Lee, J.; Choi, I. S.; Jensen, K. F.; Langer, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 3632-3638.

(57) Cunningham, E.; Campbell, C. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 4509-4511.

(58) Yang, M.; Chung, F. L.; Thompson, M. *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 3713-3716.

(59) Yang, S.; Péres-Luna, V. H.; López, G. P. em *Protein Architecture, Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*; Editores, Yuri Lvov e Helmuth Möhwald; Marcel Dekker: New York, 2000.

(60) Ji, T. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *559*, 39-69.

(61) Brunner, J. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483-514.

(62) Ji, T. H. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1566-1570.

(63) Sgro, J.-Y.; Jacrot, B.; Chroboczek, J. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *154*, 69-76.

(64) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films*; Academic Press: Boston, 1991.

(65) Sabapathy, R. C.; Crooks, R. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 7783-7788.

(66) Nissink, J. W. M.; Van der Maas, J. H. *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 33-39.

(67) (a) Lavalle, Ph.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 4458-4465. (b) Picart C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo Y.; Prestwich G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavalle, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12531-12535.

(68) Plunkett, M. A.; Claesson, P. M.; Erntsson, M.; Rutland, M. W. *Langmuir* **2003**, *19*, 4673-4681.

(69) (a) Steitz, R.; Jaeger, W.; Klitzing, R. V. *Langmuir* **2001**, *17*, 4471-4474. (b) Glinel, K.; Moussa, A.; Jonas, A. M.; Laschewsky, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 1408-1412.

(70) Cheng, Y.; Corn, R. M. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8726-8731.

(71) Cheng, Y.; Murtomäki, L.; Corn, R. M. *J. Electoanal. Chem.* **2000**, *483*, 88-94.

(72) (a) Boulmedais, F.; Schwinté, P.; Gergely, C.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2002**, *18*, 4523-4525. (b) Boulmedais, F.; Bozonnet, M.; Schwinté, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 9873-9882.

(73) Pande, C. S.; Pelzig, M.; Glass, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 895-899.

(74) Werber, M. M.; Moldovan, M.; Sokolovsky, M. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *53*, 207-216.

(75) Socrates, G. *Infrared Characteristic Group Frequencies*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1980.

(76) (a) Xie, A. F.; Granick, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3175-3176. (b) Xie, A. F.; Granick, S. *Macromolecules* **2002**, *35*, 1805-1813.

(77) Kharlampieva, E.; Sukhishvili, S. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1235-1243.

(78) Creager, S. E.; Clarke, J. *Langmuir* **1994**, 10, 3675-3683.

(79) (a) Hoogeveen, N. G.; Stuart, M. A. C.; Fleer, G. J. *Langmuir* **1996**, *12*, 3675-3681. (b) Schlenoff, J. B.; Dubas, S. T. *Macromolecules* **2001**, *34*, 592-598. (C) Schwarz B.; Schönhoff, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 2964-2966.

(80) Expert-Besancon, A.; Hayes, D. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *103*, 365-375.

(81) Ngo, T. T.; Yam, C. F.; Lenhoff, H. M.; Ivy, J. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11313-11318.

Capítulo 5

Impedância electroquímica e voltametria cíclica de eléctrodos modificados com filmes multicamadas de polielectrólitos (PEMs) e sua relação com a estrutura dos filmes

5.1 Introdução

5.2 Espectroscopia de Impedância Electroquímica

5.2.1 Resposta de frequência de um sistema

5.2.2 Sistema: célula electroquímica

5.2.2.1 Impedância da reacção de eléctrodo

5.2.2.2 O circuito de Randles

5.3 Caracterização dos filmes obtidos por LBLA usando FT-IRRAS

5.4 Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica no eléctrodo modificado com o PEM

5.5 Modelos de transporte de massa das espécies electroactivas, para a superfície do eléctrodo, através do PEM

5.5.1 O modelo dos Caminhos Preferenciais

5.5.1.1 Definição

5.5.1.2 Impedância de difusão para o modelo dos caminhos preferenciais

5.5.2 O modelo *Membrana*

5.5.2.1 Definição

5.5.2.2 Impedância de difusão para o modelo membrana

5.5.3 Análise da impedância de eléctrodos de Au modificados com PEMs

5.5.3.1 Análise usando o modelo dos caminhos preferenciais

5.5.3.2 Análise usando o modelo membrana

5.5.3.3 Comparação dos dois modelos

5.6 Conclusões

5.7 Procedimento experimental e instrumentação

5.1 Introdução

Contrariamente ao que sucede com outros aspectos da estrutura e propriedades dos filmes multicamadas de polielectrólitos (PEMs), o transporte de massa nestes filmes é um tópico que ainda suscita bastante debate, tendo sido abordado em trabalhos recentes.[1-5] Além do interesse que este tema representa a nível fundamental, muitas das aplicações já propostas para os PEMs dependem essencialmente das suas propriedades como meio de transporte, nomeadamente, a sua aplicação como membranas de separação,[6] como microcontentores para armazenamento e libertação controlada de fármacos,[7] ou como certos tipos de sensores.[8] Em alguns casos, a questão fundamental ainda carece de resposta clara: como se processa o transporte em PEMs? Outras questões que interessa esclarecer são, por exemplo, a influência da natureza dos polielectrólitos que constituem o filme nas propriedades de transporte e a dependência destas do número de camadas e das condições de deposição.

O estudo dos PEMs usando técnicas electroquímicas tem-se revelado bastante importante para esclarecer os processos de transporte de espécies carregadas.[2-5] Através do uso de eléctrodos cobertos com PEMs constituídos por diversas combinações de polielectrólitos, foi possível generalizar os resultados de algumas observações fenomenológicas:

- apesar de bastante permeáveis aos iões monovalentes e divalentes do electrólito de suporte, a permeabilidade dos PEMs relativamente aos iões trivalentes ou tetravalentes como é o caso dos iões dos pares redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ou $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$, decresce drasticamente com o número de camadas;

- filmes terminados com uma camada de policatião são mais permeáveis face aos aniões, ocorrendo o oposto para o caso de filmes em que a última camada depositada foi de polianião.

Alguns autores atribuíram o decréscimo da permeabilidade com o número de camadas a um decréscimo da área activa do eléctrodo.[2, 3]

Outros autores,[4] trabalhando com filmes de poli(ácido acrílico) e poli-L-lisina (pAA/pLis) e baseando-se na observação de que a espessura do filme só era importante no caso de a espécie electroactiva ter a mesma carga do polielectrólito que constituía a camada terminal do filme, sugeriram que, nesse caso, a reacção de transferência electrónica deveria ocorrer na interface filme/solução, porque o filme impossibilitaria a penetração da espécie devido a repulsões electrostáticas. Estes autores associaram o aumento da resistência de transferência de carga com o número de camadas, a um aumento de espessura do filme.

Do ponto de vista teórico o transporte iónico começou por ser tratado considerando-se que o PEM podia ser modelado como uma pilha de membranas bipolares, sendo cada membrana composta por uma camada de policatião e uma camada de polianião. Esta estrutura multi-bipolar era responsável pela rejeição de iões da solução devido a exclusão de Donnan, em cada membrana.[9] A visão que se tem actualmente da estrutura dos PEMs é, contudo, bastante diferente de um conjunto ordenado de camadas. Os PEMs parecem assemelhar-se mais a uma amálgama de polielectrólitos devido à ocorrência de extensa interpenetração entre as sucessivas camadas depositadas.[10]

Recentemente, Schlenoff e colaboradores[5] propuseram um modelo de transporte iónico em que o PEM é tratado como uma membrana. Segundo estes autores a difusão de iões no filme é um *hopping* entre sítios de troca criados no interior do filme pelos iões do electrólito de suporte. Foi sugerido que o coeficiente de difusão no filme depende de uma forma não linear da concentração de electrólito de suporte, e que quanto maior a carga da espécie, maior deve ser a não linearidade dessa dependência. De acordo com estes autores, este facto permite explicar a existência de selectividade no transporte através de PEMs que justificam porque a difusão é muito mais lenta quanto maior a carga da espécie. A grande atenuação da corrente observada em filmes de poli(4-ácido estirenossulfónico) e cloreto de poli(dialildimetilamónio) (pSS/pDDA) com apenas algumas centenas de angstrons de espessura foi atribuída, por estes autores, ao efeito combinado de um baixo coeficiente de difusão e um gradiente de concentração também pequeno para a espécie electroactiva altamente carregada. O decréscimo na permebilidade com o número de camadas foi atribuído a um decréscimo do gradiente de concentração no filme devido ao aumento de espessura, ao passo que o efeito da carga da última camada na permebilidade foi explicado como sendo um efeito Donnan.

Embora a espectroscopia de impedância electroquímica já tenha sido utilizada na caracterização de eléctrodos modificados com PEMs, a interpretação dos resultados foi essencialmente qualitativa ou semiquantitativa, baseada no uso do circuito de Randles.[2-4] De facto, se as propostas actualmente discutidas para a electroactividade dos eléctrodos modificados com PEMs forem correctas, isto é, se a electroactividade estiver relacionada com a existência de áreas activas distribuídas na superfície do filme,[11] ou por outro lado, se este se comportar como uma membrana,[12] o circuito de Randles deixa de ser adequado como circuito equivalente, nomeadamente porque o transporte de massa deixa de ser correctamente representado pela impedância de Warburg, já que em ambas as situações são de esperar desvios significativos da situação de difusão linear semi-infinita.

O objectivo deste trabalho foi de, mediante a dedução teórica da resposta de frequência específica de cada uma das proposta referidas no parágrafo anterior, investigar a sua aplicabilidade a PEMs montados sobre eléctrodos de Au previamente modificados com monocamadas de alcanotióis e, se possível, obter a partir desta análise, informação estrutural relacionada com as propridedades de transporte desses PEMs.

Existem modelos teóricos publicados, desenvolvidos para lidar com a situação de eléctrodos parcialmente bloqueados com espécies electroinactivas.[11a,d,e] Estes modelos, geralmente, consideram a superfície do eléctrodo como sendo um *array* regular de zonas activas em forma de disco distribuídas num plano isolador. Este conjunto de zonas activas comporta-se como um *array* de microeléctrodos. Este tipo de modelo tem sido adoptado para explicar a electroactividade de diversos tipos de eléctrodos modificados com filmes. Existem, nomedamente, diversos trabalhos publicados em que se utiliza a EIS para estimar a separação e o tamanho dessas zonas activas para eléctrodos modificados com monocamadas de alcanotióis[11e, 13] e que demonstram que a sua electroactividade residual se deve à existência de *pinholes* na monocamada com raios da ordem de 0.1-10 μm e separações de 1 a 100 μm. Uma impedância de difusão baseada neste modelo poderá ser adequada ao eléctrodo modificado com o PEM se a montagem sequencial camada-a-camada originar um filme

heterogéneo no que respeita ao transporte de espécies altamente carregadas através dele, composto por caminhos preferenciais e áreas através das quais o transporte é desfavorável.

Em contraste com a visão anterior, um comportamento tipo membrana está associado à existência de um filme homogéneo. A impedância de difusão adequada ao modelo de membrana que é sugerido por diversos autores[5] é deduzida pela primeira vez neste trabalho e aplicada na análise das medições de impedância.

5.2 Espectroscopia de Impedância Electroquímica

5.2.1 Resposta de frequência de um sistema

A análise da resposta de frequência é uma das metodologias mais importantes no estudo da dinâmica dos sistemas.[14, 15] Os sistemas electroquímicos não são excepção.

Considere-se um sistema linear de ordem n ao qual está associado a variável de entrada $x(t)$ e a variável de saída $y(t)$:



Figura 5.1: Modelo entrada/saída utilizado para estudar a dinâmica dos sistemas.

Em estado estacionário o seu funcionamento é descrito por:

$$a_0 y(0) = b_0 x(0) \tag{5.1}$$

(onde a_0 e b_0 são constantes). Após a ocorrência de uma perturbação a resposta transitória é dada pela seguinte equação diferencial genérica* (sistema de parâmetros concentrados):

$$\sum_{j=1}^{n} a_j \frac{d^j \Delta y(t)}{dt^j} = \sum_{j=1}^{m} b_j \frac{d^j \Delta x(t)}{dt^j} \tag{5.2}$$

em que $\Delta x(t)$ e $\Delta y(t)$ são variáveis desvio definidas por:

$$\begin{aligned} \Delta y(t) &= y(t) - y(0) \\ \Delta x(t) &= x(t) - x(0) \end{aligned} \tag{5.3}$$

Em vez do domínio do tempo, há vantagem em analisar a relação entre variáveis de entrada e de saída, no domínio de Laplace, mediante o uso da função de transferência do sistema, *G(s)*:[16]

$$G(s) = \frac{\Delta \bar{y}(s)}{\Delta \bar{x}(s)} = \frac{\sum_{j=1}^{m} b_j s^j}{\sum_{j=1}^{n} a_j s^j} \tag{5.4}$$

porque esta é independente das condições iniciais ou do tipo de perturbação.

No estudo da dinâmica dos sistemas usam-se um conjunto de perturbações típicas: degrau, impulso, rampa e sinusoidal.

Demonstra-se[14, 15] que a resposta de frequência de um dado sistema linear, ou seja, a resposta uma perturbação sinusoidal do tipo,

$$x(t) = B \sin(\omega t) \tag{5.5}$$

em que B representa a amplitude da perturbação e ω a sua frequência radial

* Caso se trata-se de um sistema de parâmetros distribuídos, a resposta transitória era descrita por uma equação às derivadas parciais.

se obtém directamente de 5.4, substituído s por ωi onde i representa $\sqrt{-1}$:

$$G(\omega i) = \frac{\sum_{j=1}^{m} b_j (\omega i)^j}{\sum_{j=1}^{n} a_j (\omega i)^j} \tag{5.6}$$

O grande interesse na análise da resposta de frequência advém do facto desta constituir uma espécie de impressão digital do sistema.[14]

5.2.2 Sistema: célula electroquímica

No caso do sistema ser uma célula electroquímica, a variável de entrada é normalmente o potencial (E) e a variável de saída a corrente (I) (ou vice versa), sendo as função de transferência a admitância (Y) ou a impedância (Z) respectivamente. Neste caso particular, a resposta de frequência assume o nome de Espectroscopia de Impedância Electroquímica (EIS) e constitui uma das técnicas mais poderosas para o estudo de processos electroquímicos.

Em medições electroquímicas, mesmo nos casos mais simples, a reacção de eléctrodo, transporte de massa e efeitos de carga da dupla camada eléctrica, ocorrem em simultâneo. Uma das melhores formas de isolar e identificar cada um destes processos é através da resposta a uma perturbação que varra uma ampla escala de tempos, tal como é feito em EIS. Ao variarmos a frequência duma pequena perturbação de potencial de várias ordens de grandeza, é possível separar regiões onde a cinética ou o transporte de massa dominam, permitindo a quantificação, em simultâneo, dos parâmetros cinéticos e de transporte.

Na secção seguinte, vai ser derivada a resposta de frequência para um sistema electroquímico típico: eléctrodo plano, espécies electroactivas solúveis, contribuição da convexão e migração desprezáveis para o transporte de massa das espécies electroactivas.

5.2.2.1 Impedância da reacção de eléctrodo[17-21]

O sistema constituído por um eléctrodo onde pode ocorrer uma reacção de transferência electrónica é não linear (veja-se, por exemplo, a equação de Butler-Volmer, equação 5.13), contudo para perturbações pequenas de potencial (<20mV) é uma boa aproximação linearizar a equação que exprime a relação entre a corrente e o potencial fazendo um desenvolvimento em série de Taylor limitado ao primeiro termo. Sendo, $I = I(E, C_R(0), C_O(0))$, onde $C_R(0)$ e $C_O(0)$ representam os valores estacionários das concentrações interfaciais, a expansão referida é dada por:

$$\Delta I = \left(\frac{\partial I}{\partial E}\right)\Delta E + \left(\frac{\partial I}{\partial C_R(0,t)}\right)\Delta C_R(0,t) + \left(\frac{\partial I}{\partial C_O(0,t)}\right)\Delta C_O(0,t) \qquad (5.7)$$

A transformada de Laplace desta equação é:

$$\Delta \bar{I} = \left(\frac{\partial I}{\partial E}\right)\Delta \bar{E} + \left(\frac{\partial I}{\partial C_R(0,t)}\right)\Delta \bar{C}_R(0,s) + \left(\frac{\partial I}{\partial C_O(0,t)}\right)\Delta \bar{C}_O(0,s) \qquad (5.8)$$

(notar que as derivadas parciais são calculadas para o estado estacionário anterior à perturbação)

Portanto a função de tranferência (impedância) vem dada por:

$$Z = \frac{\Delta \bar{E}}{\Delta \bar{I}} = \left(\frac{\partial E}{\partial I}\right) - \left(\frac{\partial I}{\partial C_R(0,t)}\right)\left(\frac{\partial E}{\partial I}\right)\frac{\Delta \bar{C}_R(0,s)}{\Delta \bar{I}} - \left(\frac{\partial I}{\partial C_O(0,t)}\right)\left(\frac{\partial E}{\partial I}\right)\frac{\Delta \bar{C}_O(0,s)}{\Delta \bar{I}} \qquad (5.9)$$

Como se pode verificar a impedância duma reacção de eléctrodo é a soma de três termos (associação de três impedâncias em série). O primeiro está relacionado com a cinética da reacção de eléctrodo:

$$Z_{R_{CT}} = \frac{\partial E}{\partial I} \tag{5.10}$$

Os restantes dois termos são impedâncias de concentração e estão relacionados com o transporte de massa:

$$Z_{C_R} = -\left(\frac{\partial I}{\partial C_R(0,t)}\right)\left(\frac{\partial E}{\partial I}\right)\frac{\Delta \overline{C}_R(0,s)}{\Delta \bar{I}} \tag{5.11}$$

$$Z_{C_O} = -\left(\frac{\partial I}{\partial C_O(0,t)}\right)\left(\frac{\partial E}{\partial I}\right)\frac{\Delta \overline{C}_O(0,s)}{\Delta \bar{I}} \tag{5.12}$$

Impedância de transferência de carga

Se a cinética da reacção de eléctrodo obedecer à lei de Butler-Volmer:

$$I(t) = nFA\left[k_a^0 C_R(0)e^{\alpha nF\,E/RT} - k_c^0 C_o(0)e^{-(1-\alpha)nF\,E/RT}\right] \tag{5.13}$$

(onde n representa o número de electrões envolvidos na reacção de tranferência de carga, F é a constante de Faraday (96485 $Cmol^{-1}$), A é a área do eléctrodo, α é o coeficiente de transferência de carga, k_c^0, k_a^0 são as constantes de velocidade para a reacções catódica e anódica, respectivamente, R representa a constante dos gases ideais e T a temperatura) facilmente se verifica que, se as medições forem feitas no potencial de equilíbrio:

$$Z_{R_{CT}} = R_{CT} = \frac{RT}{nFI^0} \tag{5.14}$$

onde I^0 representa a intensidade de corrente de permuta:

$$I^0 = nFA\,k^0\,C_O(0)^{(1-\alpha)}C_R(0)^{\alpha} \tag{5.15}$$

ou seja, a impedância associada à transferência de carga reduz-se à chamada resistência de transferência de carga.

A impedância de Warburg

As impedâncias de concentração (equações 5.11 e 5.12) são o produto de três termos, um dos quais é a resistência de transferência de carga. Os restantes são

$$\frac{\partial I}{\partial C_R(0,t)} = nFA\,k_a^0 e^{\alpha\, nFE/RT} \tag{5.16}$$

$$\frac{\partial I}{\partial C_O(0,t)} = -nFA\,k_c^0 e^{-(1-\alpha)nFE/RT} \tag{5.17}$$

e um termo que depende das condições de contorno associadas ao transporte de massa.

No caso de difusão linear semi-infinita estas são

$$C_R(x,0) = C_R\,,\, C_O(x,0) = C_O \tag{5.18}$$

$$\lim_{x\to\infty} C_R(x,t) = C_R\,,\, \lim_{x\to\infty} C_O(x,t) = C_O \tag{5.19}$$

Escrevendo a segunda lei de Fick para cada uma das espécies:

$$\frac{\partial C_R(x,t)}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 C_R(x,t)}{\partial x^2} \tag{5.20}$$

$$\frac{\partial C_O(x,t)}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 C_O(x,t)}{\partial x^2} \tag{5.21}$$

(onde D_R e D_O representam os coeficientes de difusão do redutor e oxidante, respectivamente) e resolvendo no domínio de Laplace em ordem às concentrações obtém-se

$$\overline{C}_R(x,s) = \frac{C_R}{s} + A(s)e^{-\sqrt{\frac{s}{D_R}}x} \tag{5.22}$$

$$\overline{C}_O(x,s) = \frac{C_O}{s} - A(s)\sqrt{\frac{D_R}{D_O}}e^{-\sqrt{\frac{s}{D_O}}x}. \tag{5.23}$$

Tendo em conta que a igualdade de fluxos na interface eléctrodo/solução

$$\frac{\overline{I}(s)}{nFA} = D_R\left[\frac{\partial \overline{C}_R(x,s)}{\partial x}\right]_{x=0} = -A(s)\sqrt{sD_R} \tag{5.24}$$

obtém-se a relação entre as concentrações e a corrente no domínio de Laplace

$$\overline{C}_R(x,s) = \frac{C_R}{s} - \frac{\overline{I}(s)}{nFA\sqrt{sD_R}}e^{-\sqrt{\frac{s}{D_R}}x} \tag{5.25}$$

$$\overline{C}_O(x,s) = \frac{C_O}{s} + \frac{\overline{I}(s)}{nFA\sqrt{sD_O}}e^{-\sqrt{\frac{s}{D_O}}x} \tag{5.26}$$

e os termos pretendidos para calcular as impedâncias de concentração são

$$\frac{\Delta\overline{C}_R(0,s)}{\Delta\overline{I}} = \frac{d\overline{C}_R(0,s)}{d\overline{I}} = -\frac{1}{nFA\sqrt{sD_R}} \tag{5.27}$$

$$\frac{\Delta\overline{C}_O(0,s)}{\Delta\overline{I}} = \frac{d\overline{C}_O(0,s)}{d\overline{I}} = \frac{1}{nFA\sqrt{sD_O}}. \tag{5.28}$$

No domínio de frequência as duas impedâncias de concentração vêm dadas por:

$$Z_{C_R} = \frac{k_a^0 e^{\alpha nFE/RT}}{\sqrt{i\omega D_R}}R_{CT} \tag{5.29}$$

$$Z_{C_O} = \frac{k_c^0 e^{-(1-\alpha)nFE/RT}}{\sqrt{i\omega D_O}}R_{CT} \tag{5.30}$$

Da soma destas duas impedâncias (impedâncias em série) obtém-se a chamada impedância de Warburg,

$$Z_W = \frac{\sigma(1-i)}{\sqrt{\omega}} \tag{5.31}$$

onde,

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A\sqrt{2}}\left[\frac{1}{C_R\sqrt{D_R}} + \frac{1}{C_O\sqrt{D_O}}\right] \tag{5.32}$$

A representação desta impedância no plano complexo (diagrama de Nyquist) é uma recta de declive unitário, figura 5.2.

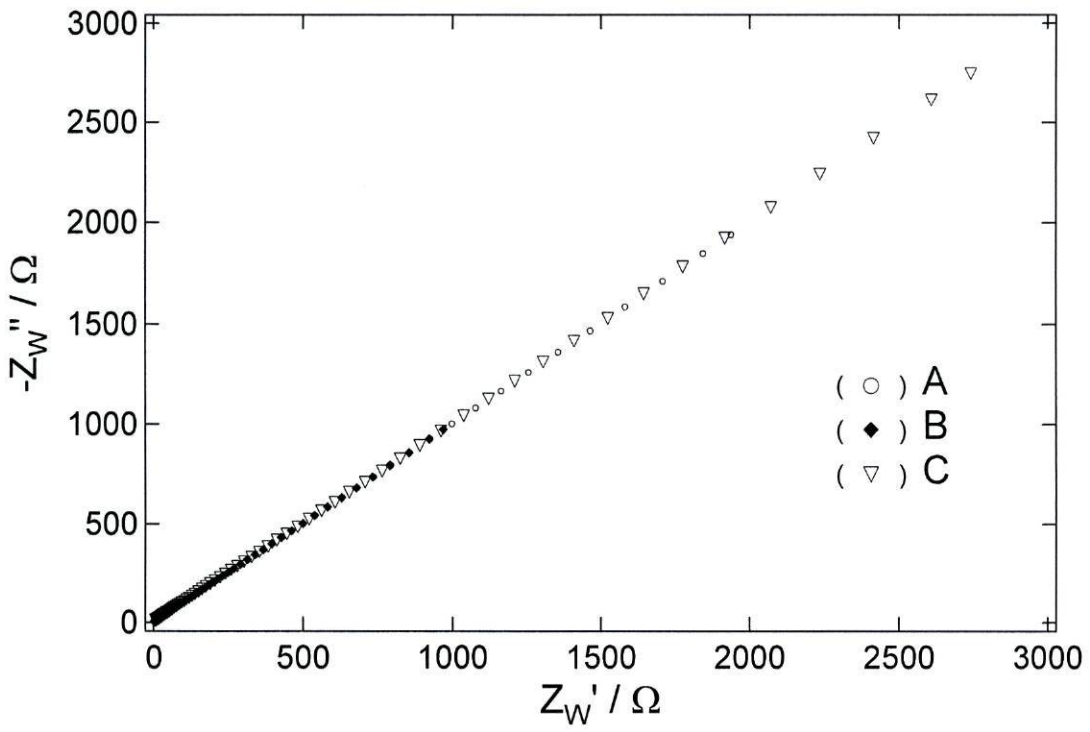


Figura 5.2: Diagramas de Nyquist para a impedância de Warburg entre 15 kHz e 0.1 Hz: área = 5 mm^2; A- $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 1$ mol m^{-3}; B- $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 2$ mol m^{-3}; C- $D_R = D_O = 3\times10^{-10}$ m^2 s^{-1}, $C_R = C_O = 1$ mol m^{-3}.

5.2.2.2 O circuito de Randles

Normalmente a interpretação quantitativa das medições de impedância é feita com base em circuitos eléctricos equivalentes.[17-21]

Numa célula electroquímica além do processo associado à reacção de eléctrodo há ainda a considerar a resistência não compensada da solução e o processo de carga da dupla camada eléctrica. A corrente total associada a uma reacção de eléctrodo é a soma de uma parcela capacitiva associada à carga da dupla camada eléctrica e de uma parcela faradáica correspondente à reacção de tranferência electrónica. A totalidade da corrente passa pela resistência da solução. O circuito de Randles, representado na figura 5.3, traduz estes factos.

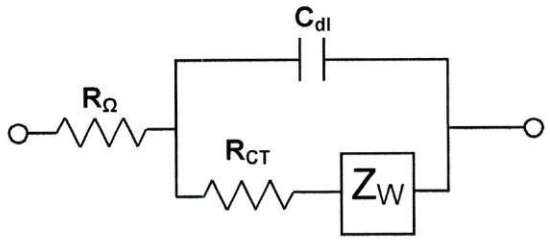


Figura 5.3: Circuito de Randles. R_Ω representa a resistência da solução, C_{dl} representa a capacidade da dupla camada eléctrica, R_{CT} representa a resistência de transferência de carga e Z_W a impedância de Warburg.

Tendo em conta as leis de associação de impedâncias, a impedância do circuito de Randles é dada por:

$$Z = R_\Omega + \frac{1}{\omega C_{dl} i + \dfrac{1}{R_{CT} + \dfrac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-i)}} \tag{5.33}$$

Na figura 5.4 está representada a resposta de frequência (sob a forma de diagrama de Nyquist) para diversos valores dos elementos que compõem o circuito de

Randles. A frequências elevadas o processo é dominado pela cinética, o semicírculo corresponde à associação em paralelo de R_{CT} e C_{dl}, enquanto que a frequências baixas o transporte de massa passa a ser limitante. Neste domínio a impedância global resume-se à impedância de Warburg. Notar que quanto maior o grau de irreversibilidade da reacção (medido por R_{CT}) menor é a frequência a partir da qual a impedância de Warburg passa a dominar.

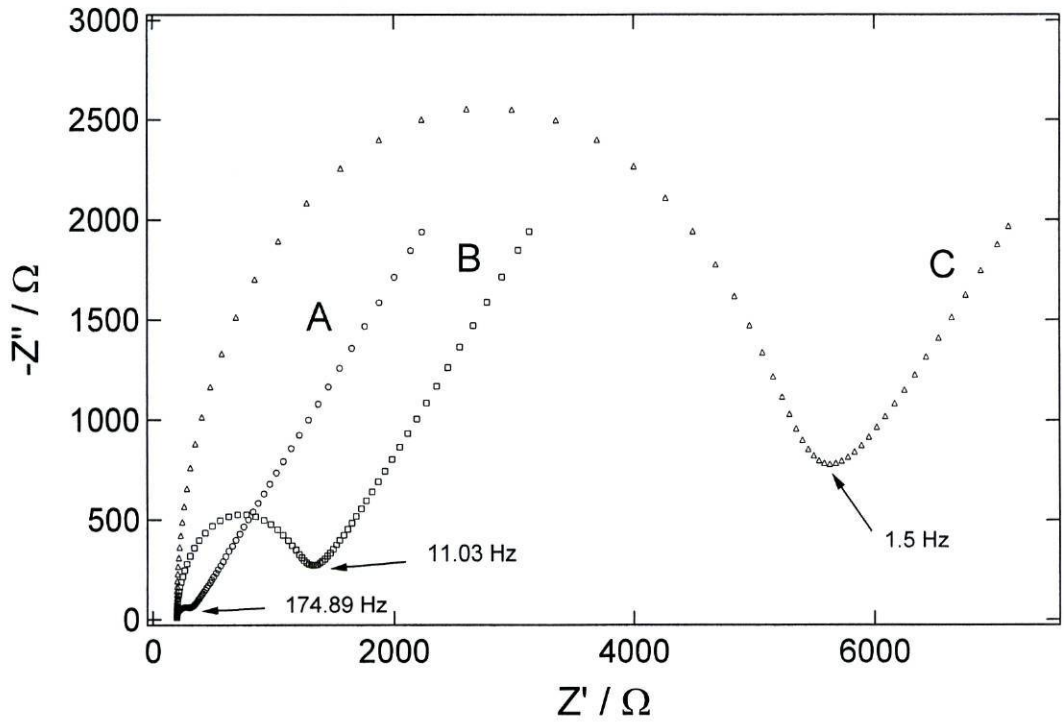


Figura 5.4: Diagramas de Nyquist para a circuito de Randles entre 15 kHz e 0.1 Hz. A- R_Ω = 200 Ω, C_{dl} = 1 μF, R_{CT} = 100 Ω, $D_R = D_O = 6\times10^{-10}$ m^2s^{-1}; B- R_{CT} = 1000 Ω; C- R_{CT} = 5000 Ω.

5.3 Caracterização dos filmes obtidos por LBLA usando FT-IRRAS

No trabalho apresentado neste capítulo, foi investigada a electroquímica do par óxido-redutor $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ em eléctrodos de ouro modificados com PEMs contendo pSS como polianião e os polipéptidos poli-L-histidina (pK_a~7), poli-L-lisina (pK_a~10) e poli-L-arginina (pK_a~12) como policatiões (quadro 2.1, cap. 2), usando espectroscopia de impedância electroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV). A montagem sequencial dos filmes de polielectrólitos nos eléctrodos de Au foi promovida por uma monocamada de cisteamina. O pK_a do grupo amino desta monocamada é de 8.19,[22] consequentemente esta monocamada origina uma superfície carregada positivamente para os valores de pHs utilizados neste trabalho.

Na figura 5.5 estão representados os espectros de FT-IRRAS para as diversas camadas de todos os filmes estudados. Estes espectros mostram que o processo de LBLA ocorre para todos os pares pSS/policatião. As bandas mais proeminentes, em todos os casos, são as bandas amida dos poliamino ácidos, amida I (~1665 cm^{-1}), amida II (~1540 cm^{-1}) e as bandas do pSS a 1200 cm^{-1}, 1127 cm^{-1}, 1009 cm^{-1} e 1036 cm^{-1}. A atribuição detalhada de todas as bandas é apresentada nas tabelas 2.2, 4.2 e 5.1.

As absorvâncias aumentam de uma forma quase linear com o número de bicamadas sugerindo a mesma tendência para a massa de polímero que é depositada, figura 5.6. Os espectros também mostram que a intensidade das bandas de pSS depende da natureza do policatião. A diferença, entre os três tipos de filmes, aumenta com o número de camadas. Após a deposição de 5 bicamadas a intensidade da banda a 1200 cm^{-1} é de 0.0040 u.a., 0.0019 u.a. e 0.0030 u.a. para os filmes pSS/pHis, pSS/pLis e pSS/pArg respectivamente (figura 5.6). Estas intensidades sugerem que a massa de pSS depositada em cada filme segue a seguinte ordem: pSS/pHis > pSS/pArg > pSS/pLis.

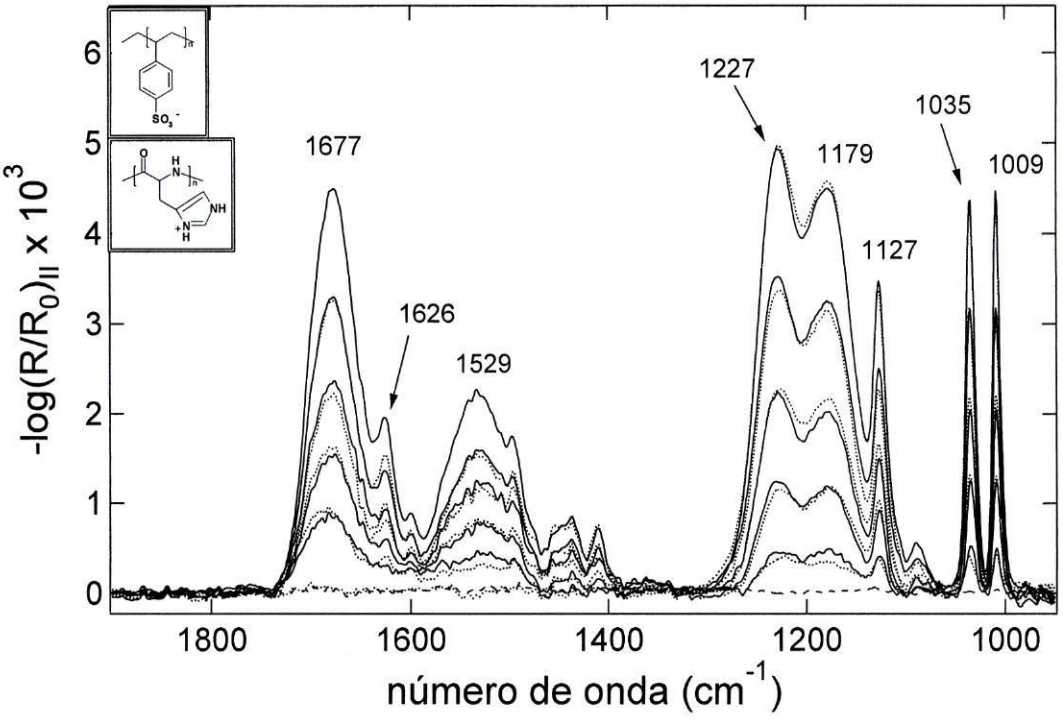


Figura 5.5A: Espectros de FT-IRRAS correspondentes à montagem camada-a-camada do filme pSS/pHis sobre uma superfície de Au modificada com uma monocamada automontada de cisteamina. Os espectros dos filmes em que a camada de pSS é a camada terminal estão representados a ponteado. O espectro correspondente à superfície de cisteamina está representado a tracejado.

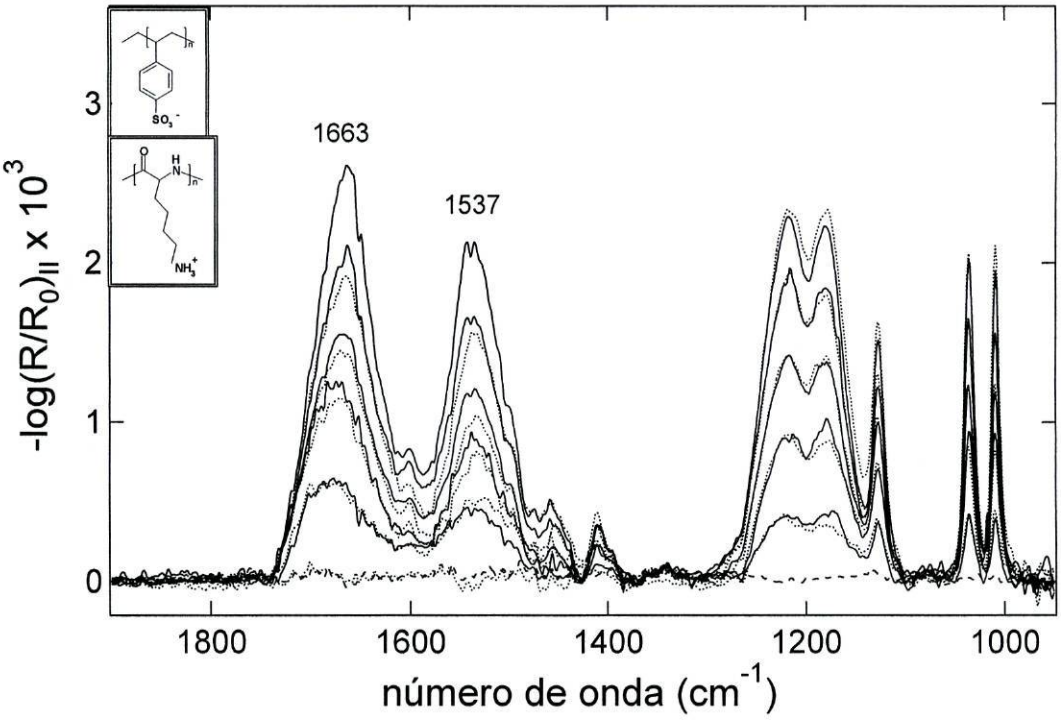


Figura 5.5B: O mesmo que a figura 5.5A para o filme pSS/pLis.

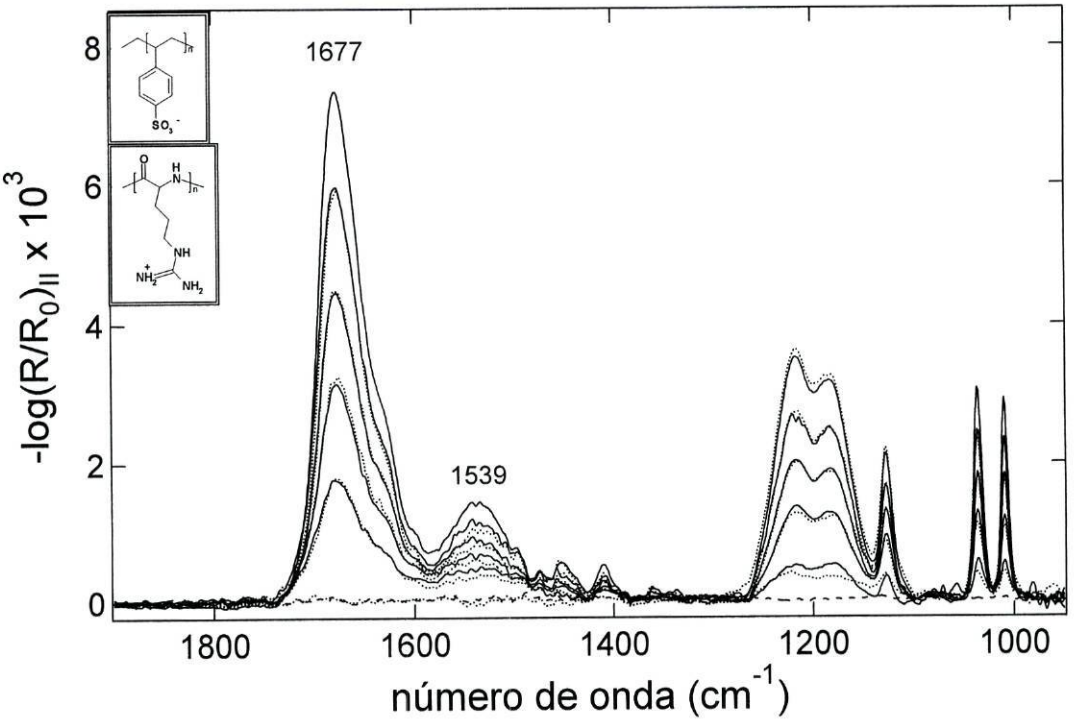


Figura 5.5C: O mesmo que a figura 5.5A para o filme pSS/pArg.

Tabela 5.1: Atribuição de bandas de FT-IRRAS para os filmes pSS/pHis e pSS/pLis obtidos por montagem camada-a-camada sobre uma superfície de Au modificada com uma monocamada de cisteamina.

Superfície	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição
pHis	1677	ν(C=O), banda amida I (stretching carbonilo)
	1626	banda imidazol I (stretching do anel)
	1531	ν(C–N) + δ(N–H), banda amida II (stretching CN e bending NH), stretching do anel, deformação do anel e stretching N=C–N
	1440, 1410	$\delta(CH_2)$, deformação scissors dos metilenos
	1090	deformação C–H e deformação do anel
pLis	1663	ν(C=O), banda amida I
	1539	ν(C–N) + δ(N–H), banda amida II
	1458, 1411	$\delta(CH_2)$, deformação scissors dos metilenos

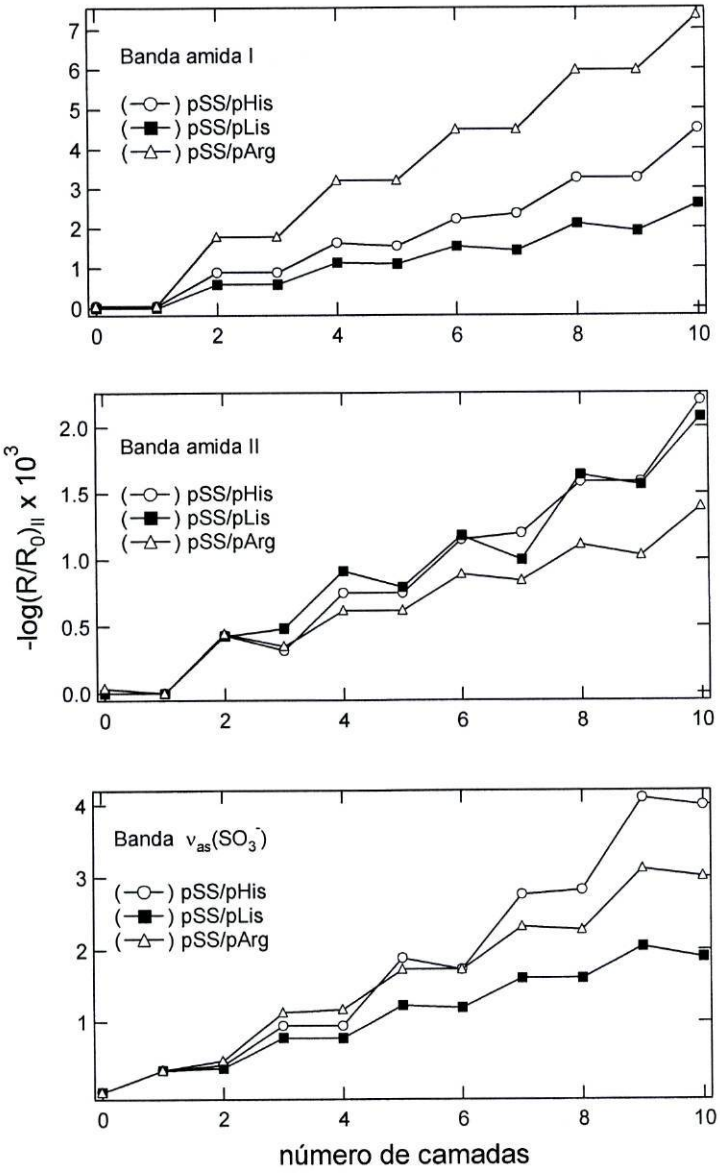


Figura 5.6: Evolução, camada-a-camada, da intensidade das bandas amida I, amida II e *stretching* assimétrico do grupo benzenossulfonato, para filmes pSS/policatião construídos sobre Au modificado com cisteamina.

Como já foi referido no Capítulo 1, uma forma de controlar as quantidades depositadas na experiência de LBLA consiste em manipular a densidade de carga dos polielectrólitos o que, no caso de poliácidos e polibases, se consegue ajustando o pH das soluções de deposição.[23] No presente caso não é de esperar que a densidade de carga dos diversos policatiões difira muito já que ao pH de deposição (tampão ácido acético/acetato 0.1 M pH 4.5) eles devem encontrar-se todos completamente ionizados. As diferenças observadas são provavelmente a manifestação do efeito de outras

interacções, para além das do tipo coulombico, no processo de LBLA, nomedamente hidrofóbicas e de van de Waals.[24] É de esperar que este tipo de interacções seja mais intenso entre o pSS e a pHis dado o carácter aromático dos resíduos histidina e dos grupos benzenossulfonato. O facto do grupo guanidino possuir uma geometria plana e extensa deslocalização de carga (figura 4.1) também deve favorecer uma melhor interacção entre estes grupos e os grupos benzenossulfonato promovendo uma maior deposição de pArg em comparação com a pLis.

5.4 Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica no eléctrodo modificado com o PEM

Nas figuras 5.7 e 5.8 representam-se os diagramas de Nyquist e os voltamogramas cíclicos, correspondentes à reacção do $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ no eléctrodo modificado com o PEM. Como é facilmente constatável nas figuras, a deposição sucessiva de camadas de polielectrólito tem um efeito dramático na resposta do eléctrodo. Este facto vai ser explorado para extrair informação sobre a estrutura e sobre o transporte de massa nos PEMs.

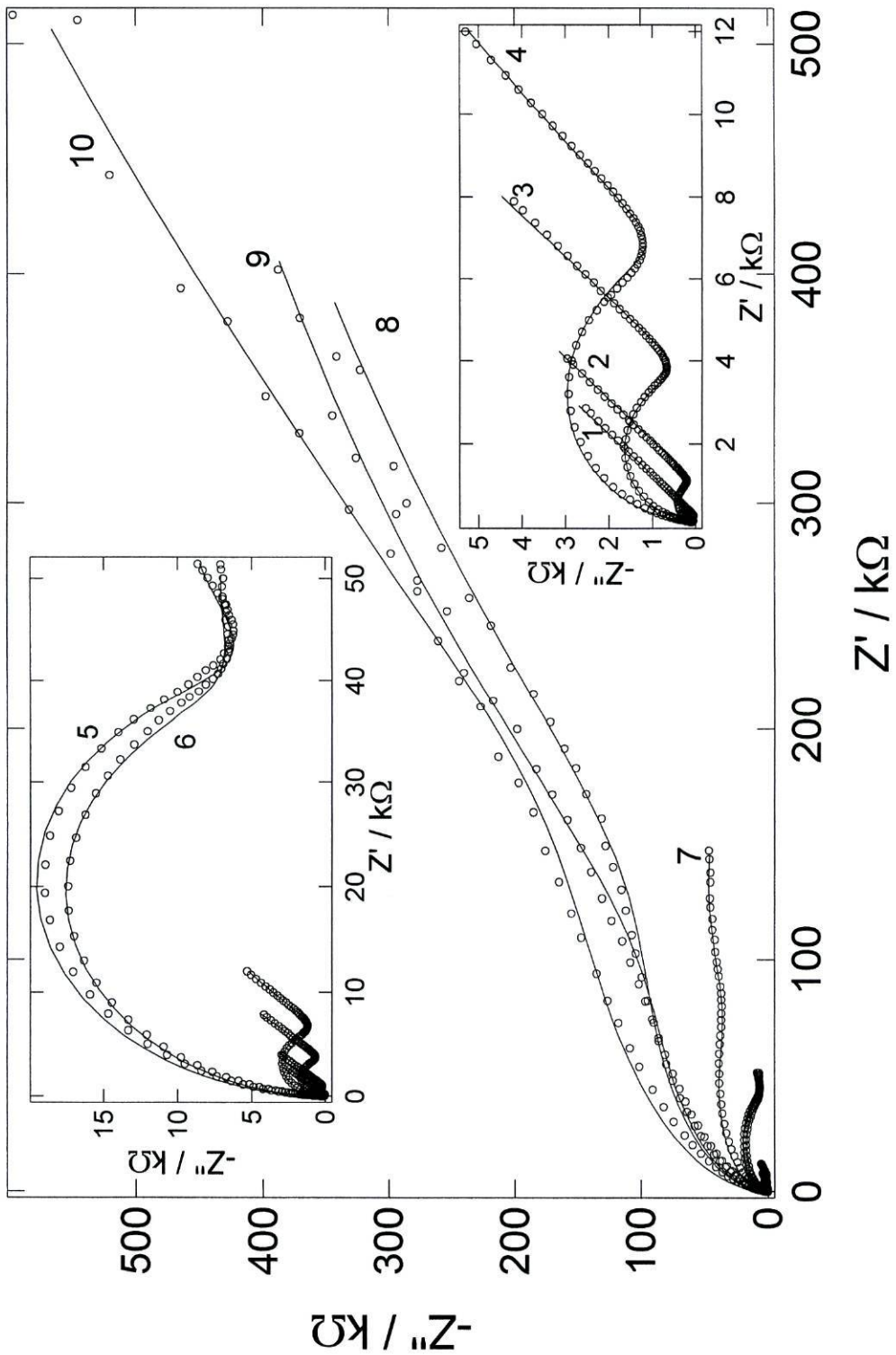


Figura 5.7A: Diagramas de Nyquist correspondentes à reacção de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5 mM) no eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pHis. O número de camadas depositadas sobre a monocamada automontada de cisteamina está assinalado pelos números. Os resultados experimentais estão representados pelos círculos e as curvas teóricas (modelo dos caminhos preferenciais) (secção 5.5) pelas linhas.

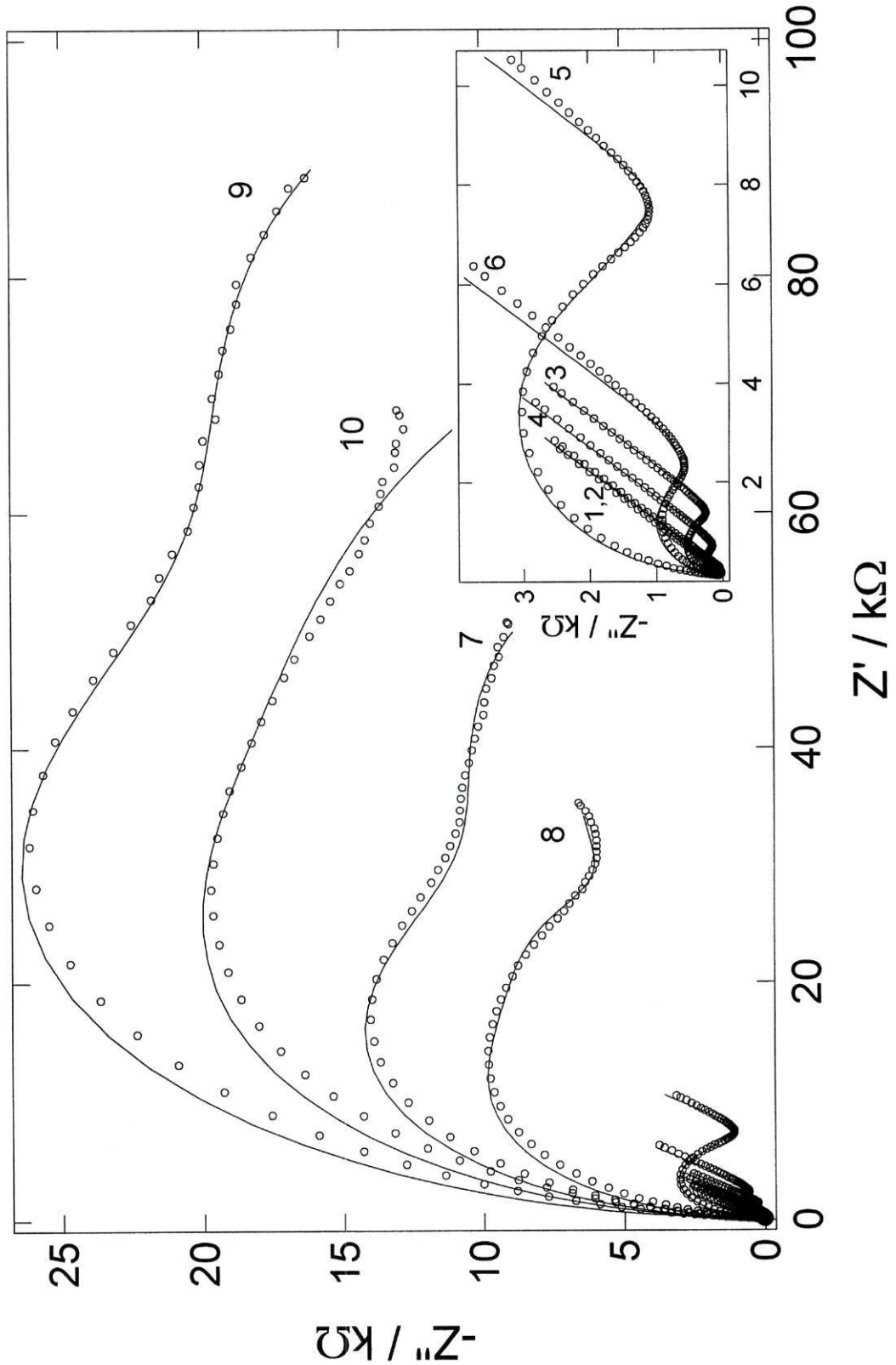


Figura 5.7B: O mesmo que a figura 5.7A neste caso para um eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pLis.

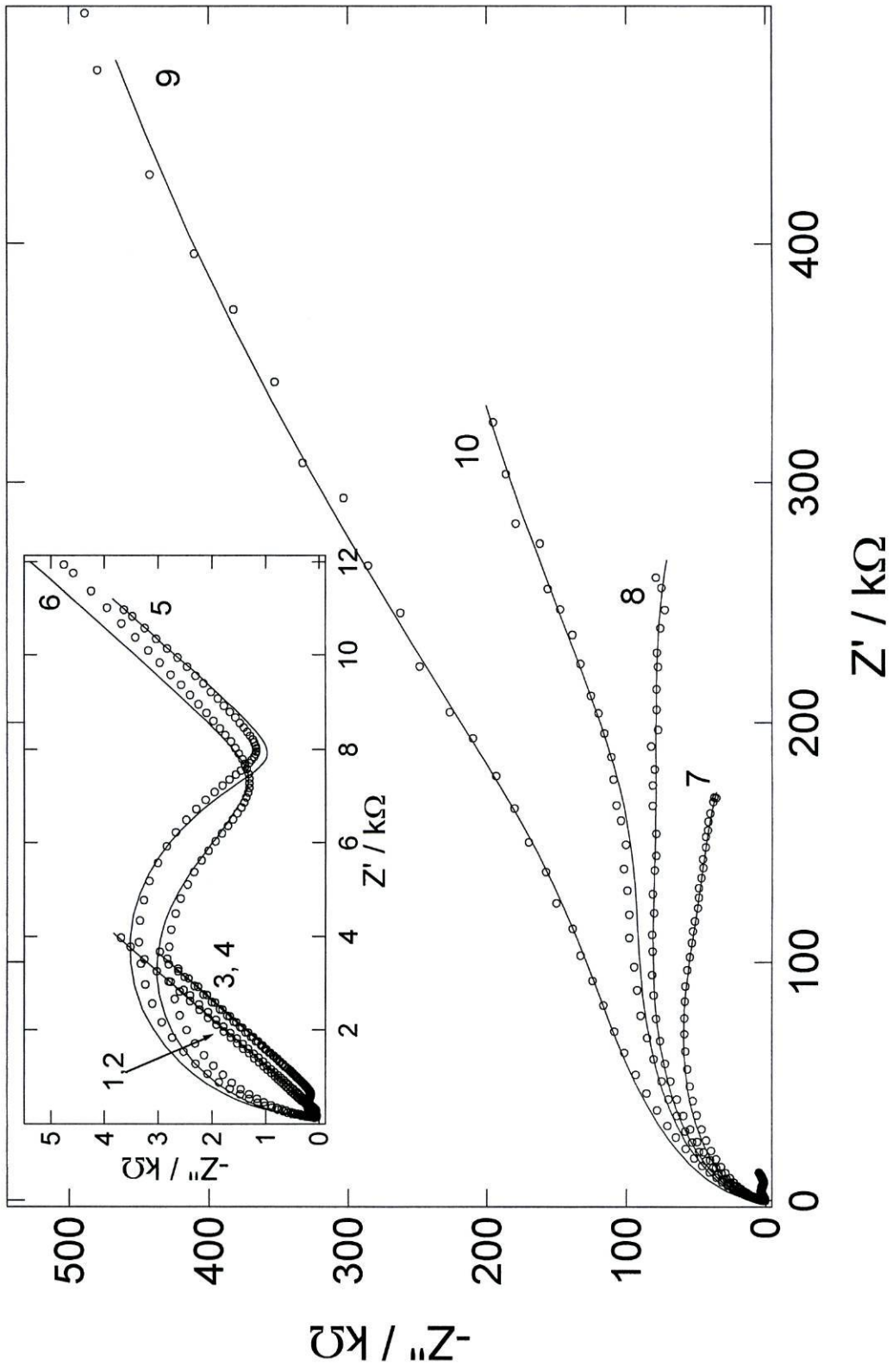


Figura 5.7C: O mesmo que a figura 5.7A neste caso para um eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pArg.

As características essenciais dos espectros de impedâncias não variam durante a deposição das primeiras 4 camadas, no caso do filme de pSS/pHis, 6 camadas no caso dos outros dois filmes (figuras inseridas nas figura 5.7). Os diagramas de Nyquist, excepto no caso da cisteamina, têm sempre um semicírculo a altas frequências e uma linha recta de declive aproximadamente unitário a baixas frequências. O semicírculo corresponde à associação de resistências e capacidades em paralelo ao passo que a linha recta é atribuída ao transporte de massa por difusão linear semi-infinita. No caso da monocama de cisteamina o espectro de impedância resume-se à linha recta portanto à impedância de difusão (não mostrado). A tendência global para as primeiras camadas é o aumento, de uma forma não linear, do diâmetro do semicírculo a altas frequências com o número de camadas. Isto é mais pronunciado para o filme de pSS/pHis. O maior aumento de impedância por bicamada é medido para este filme.

Já foi por diversas vezes referido na literatura que a permeabilidade destes filmes é maior no caso da espécie electroactiva ter carga oposta à do último polielectrólito depositado.[4, 5a, 25] No casos dos filmes aqui estudados isto só é observado para o filme pSS/pLis. Os valores de impedância decrescem após a automontagem de cada camada de pLis. No caso dos filmes de pSS/pHis, cada nova camada de pHis implica um aumento na impedância, ao passo que os filmes terminados com pArg, particularmente para $N < 7$, oferecem a mesma impedância que os precedentes, terminados por pSS.

Este comportamento diverso também é observado nos voltamogramas das figuras 5.8A, B e C. Após a adição de cada camada de policatião, a intensidade de corrente diminui no caso da pHis, aumenta no caso da pLis e mantem-se aproximadamente constante no caso da pArg. A tendência global é contudo um decréscimo das intensidades de corrente de pico, com o número de camadas, mais pronunciado no caso da pHis e um aumento na separação de picos, também mais pronunciada no caso dos filmes de pSS/pHis.

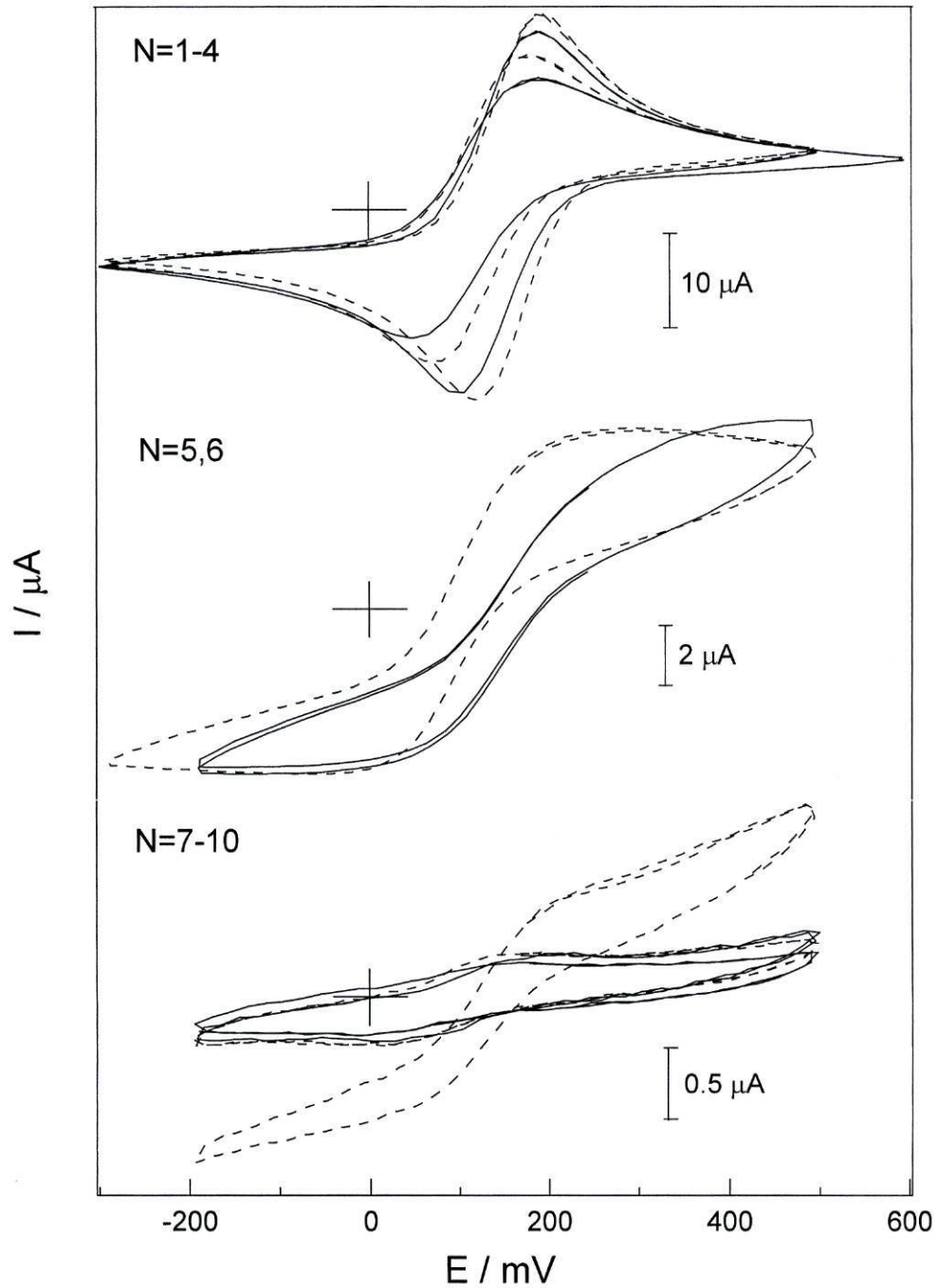


Figura 5.8A: Voltamogramas cíclicos correspondentes à reacção de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5 mM) no eléctrodo modificado com o PEM de pSS/pHis. Velocidade de varrimento 50 mVs^{-1}. Os voltamogramas correspondentes aos filmes terminados com camadas de pSS estão representados por linhas a tracejado. *N* representa o número de camadas depositadas sobre a monocamada automontada de cisteamina.

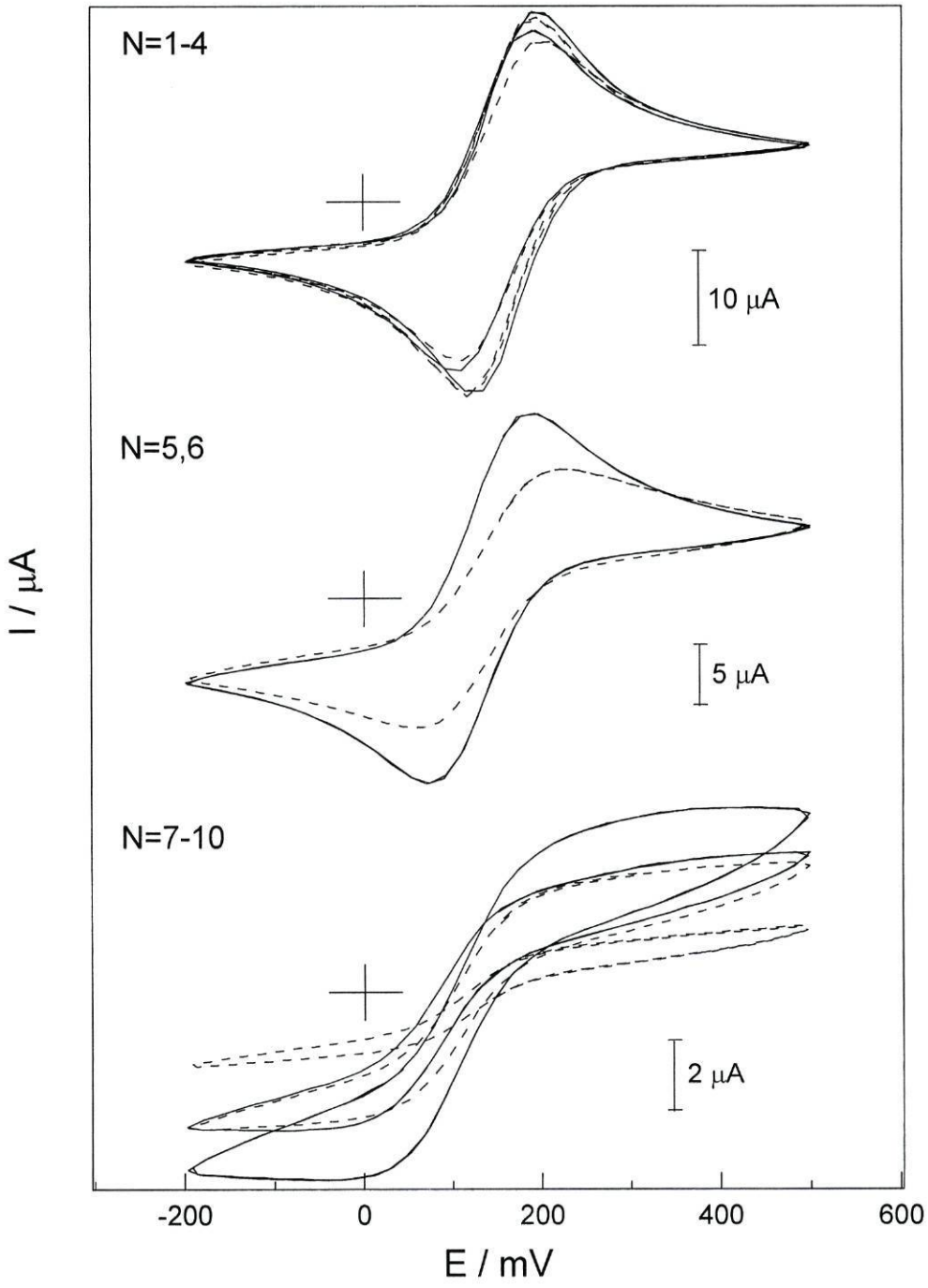


Figura 5.8B: O mesmo que na figura 5.8A para o PEM de pSS/pLis.

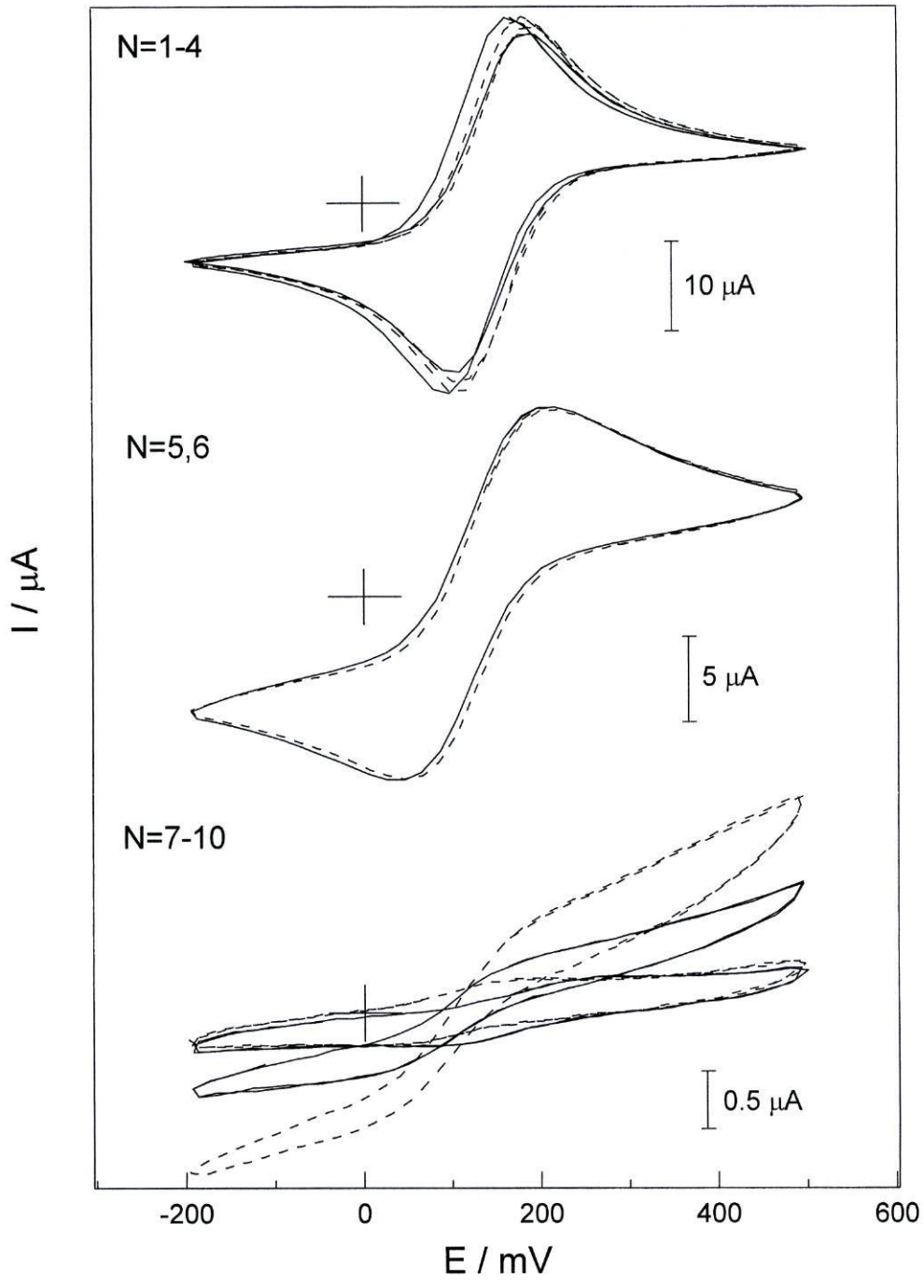


Figura 5.8C: O mesmo que na figura 5.8A para o PEM de pSS/pArg.

A montagem da 5ª camada no caso do filme de pSS/pHis, 7ª nos restantes dois filmes, produz um efeito dramático nos espectros de impedância. É observado um aumento muito mais pronunciado do semicírculo a altas frequências e a linha recta a baixas frequências, associada ao transporte de massa por difusão linear semi-infinita, dá

lugar ao que parece ser um segundo semicírculo. As camadas seguintes provocam aumentos adicionais no semicírculo a frequências elevadas, todavia não tão pronunciados como na transição atrás referida, e nos valores das impedâncias a baixas frequências.

As alterações significativas nos espectros de impedâncias a baixas frequências, isto é, à escala de tempos a que os CVs são medidos, devem ser claramente detectadas nos CVs, por oposição ao que se verifica para um número de camadas inferior em que o efeito da montagem LBL praticamente só se manifesta a altas frequências. Assim, após a deposição da 5ª camada nos filmes pHis/pSS, 7ª camada nos filmes de pSS/pLis e pSS/pArg, além de uma redução pronunciada nos valores das intensidades de corrente, são obtidos CVs em patamar, figuras 5.8.

O aspecto dos diagramas de Nyquist a baixas frequências e os CVs sugerem alterações na forma como o transporte de massa é efectuado para estes filmes.

Outro aspecto a salientar nos CVs a partir da 5ª camada no caso do filme de pSS/pHis, 7ª no caso dos filmes constituídos por pSS/pLis e pSS/pArg, é uma maior inclinação. Este fenómeno já foi relatado[5a] tendo sido associado a condução óhmica (corrente proporcional ao potencial) devida a *hopping* de electrões, outra possibilidade que há que considerar é tratar-se de uma contribuição da migração para o transporte de massa da espécie electroactiva.

5.5 Modelos de transporte de massa das espécies electroactivas, para a superfície do eléctrodo, através do PEM

O transporte de massa no caso de eléctrodos modificados pode diferir consideravelmente da difusão linear semi-infinita, representada pela impedância de Warburg.[11, 12] Se este facto não for tido em conta, pode levar a interpretações incorrectas dos resultados de impedâncias.

Os resultados apresentados nas figuras 5.7 e 5.8 parecem constituir a tendência geral para a electroactividade de eléctrodos modificados com este tipo de filmes face a

espécies electroactivas fortemente carregadas, tendo sidos relatados resultados semelhantes aos apresentados para outras combinações de polielectrólitos.[2-4]

Actualmente têm sido avançadas duas interpretações para explicar o comportamento observado. Uma defende que, em consequência do processo de LBLA, a área activa do eléctrodo é progressivamente diminuída, de forma que a reacção de tranferência electrónica passa a ficar restrita a um certo número de sítios activos distribuídos na superfície do filme.[2,3] Alternativamente o filme tem sido tratado como uma membrana e o decréscimo na permeabilidade com o número de camadas é associado ao aumento da da espessura do filme.[5a] Em ambos os casos esperam-se desvios significativos da situação de difusão de difusão linear semi-infinita. Assim sendo, os resultados de trabalhos anteriores, em que foi usado o circuito de Randles (com o elemento Warburg para modelar o transporte de massa) para interpretar os resultados de EIS para eléctrodos modificados com PEMs, devem ser vistos como bastante aproximados.[3, 4] Curiosamente os valores obtidos para a Warburg nunca foram publicados, talvez porque a sua estranha dependência com o número de camadas não seria fácil de explicar.

Uma análise mais rigorosa das medições de impedância, implica nomeadamente, que a impedância de Warburg seja substituída por impedâncias de difusão que traduzam as duas visões acima referidas. Essa análise vai ser posta em prática neste trabalho. A partir daqui o modelo que associa a electroactividade à existência de sítios activos na superfície do filme passa a ser designado por *Modelo dos Caminhos Preferenciais*, e o modelo que associa a redução da electroactividade ao aumento de espessura do filme (considerado uniforme) será designado por *Modelo Membrana*.

5.5.1 O modelo dos *Caminhos Preferenciais*

5.5.1.1 Definição

O pressuposto inicial do modelo dos caminhos preferenciais é o de que o efeito da sucessiva deposição de camadas de polielectrólito é uma progressiva diminuição da área activa do eléctrodo. No contexto do LBLA isto pode ser visto da seguinte forma: inicialmente, enquanto o número de camadas que cobre a superfície do eléctrodo for pequeno, o filme é muito poroso, já que podem existir áreas de eléctrodo descobertas e além destas, aquelas que estiverem cobertas com uma ou duas camadas também podem ser permeáveis, por exemplo, devido a atracção electrostática. Para ter em consideração a possibilidade de áreas cobertas serem permeáveis propõem-se a existência de uma *cobertura efectiva* que pode diferir da verdadeira cobertura. A situação descrita está esquematizada na figura 5.9.

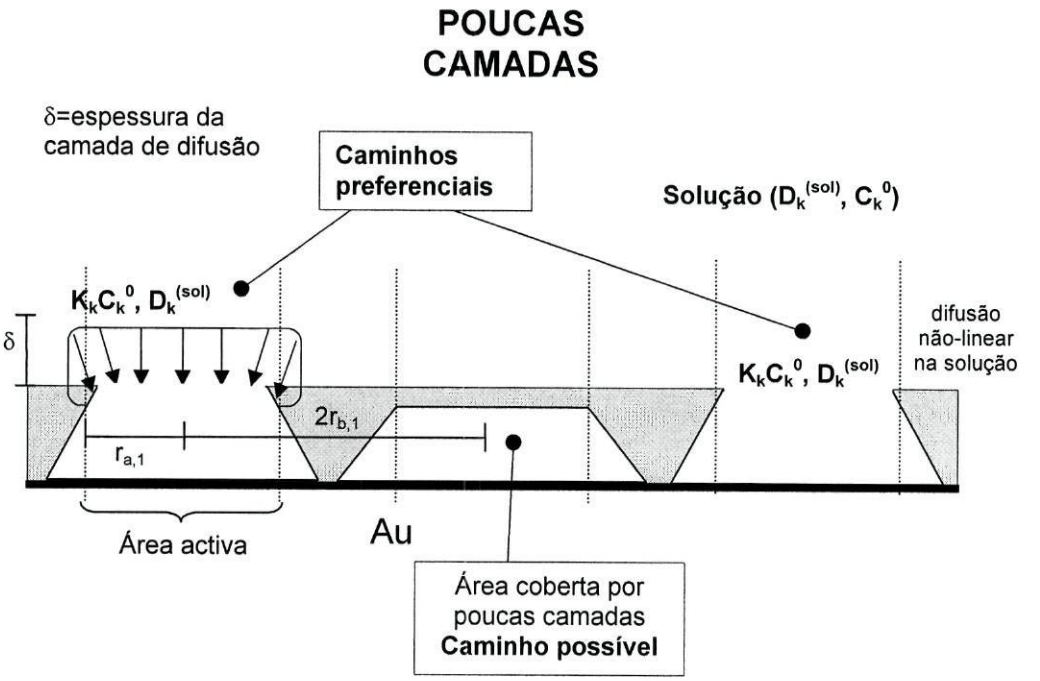


Figura 5.9: Configuração das áreas activas e do perfil de difusão misto a elas associado, para um filme com poucas camadas, de acordo com o modelo dos caminhos preferenciais. O significado dos símbolos é dado no texto.

As áreas descobertas podem corresponder, por exemplo, a áreas onde não ocorreu automontagem do alcanotiol. É sabido que alcanotióis com um número de grupos metileno inferior a 9, como é o caso da cisteamina ($n = 2$) originam SAMs pouco organizados com bastantes defeitos, nomeadamente áreas de eléctrodo descobertas, *pinholes*.[26] Como a montagem das camadas de polielectrólito é, essencialmente, promovida por interacções electrostáticas, ela ocorre preferencialmente sobre as áreas cobertas. Desta forma, é normal que os "buracos" criados durante a automontagem do alcanotiol persistam no eléctrodo modificado com o PEM, apesar do seu diâmetro ser progressivamente reduzido e do espaçamento entre eles aumentar com o número de camadas de polielectrólito.

Eventualmente, após a deposição de um certo número de camadas, a maioria dos caminhos que anteriormente permitiam o contacto directo entre a solução e o eléctrodo passam a estar tapados com camadas de polieletrólito. Nesta situação a electroactividade residual deve ainda estar ligada a esses locais já que continuam a ser aqueles onde o filme é menos denso, mas a espécie electroactiva tem de difundir-se no filme antes de atingir um dos buracos anteriormente descobertos. Esta situação é ilustrada na figura 5.10.

É de notar que, na situação em que há caminhos em que não há filme a separar o eléctrodo da solução, se espera que o transporte ocorra quase exclusivamente por tais caminhos. Na situação esquematizada na figura 5.10, estes já não existem, de forma que a espécie electroactiva não tem outra alternativa senão difundir-se através de filme.

O bloqueio completo do eléctrodo atingir-se-à quando por deposição de mais camadas de polielectrólito os buracos ficarem fora do alcance da espécie que se difunde.

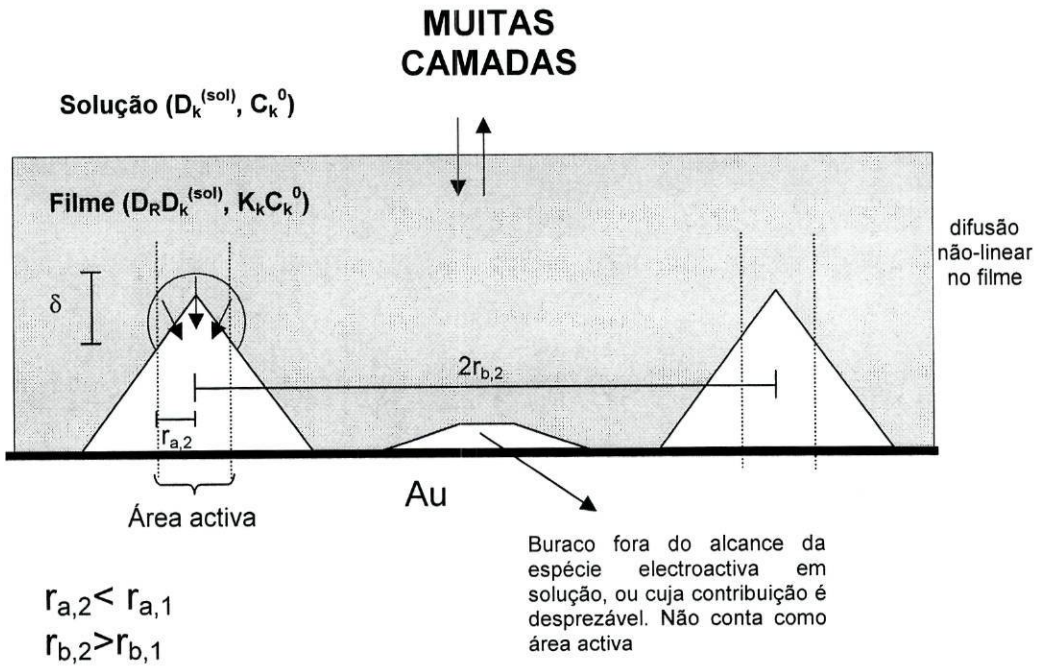


Figura 5.10: Configuração das áreas activas para um filme com muitas camadas e do perfil de difusão do tipo esférico a elas associado, de acordo com o modelo dos caminhos preferenciais.

Nesta situação, em que a electroactividade do eléctrodo modificado com o PEM está restricta a um certo número de sítios activos distribuídos na superfície do filme, esperam-se desvios significativos da difusão linear semi-infinita. De facto, com a diminuição da área da zona activa e com o aumento do espaçamento entre zonas activas a difusão de, e para, as zonas activas torna-se progressivamente do tipo esférico.[11d,e] Na situação ilustrada na figura 5.10, é de esperar que a zona de difusão não-linear se situe no filme.

Saliente-se que a situação descrita é uma de muitas que pode levar à existência de caminhos preferenciais nos filmes obtidos por automontagem electrostática de polielectrólitos. O mesmo se pode dizer quanto à natureza dos sítios activos. A abordagem aqui apresentada é geral na medida em que o único requesito é existirem zonas inactivas no eléctrodo.

5.5.1.2 Impedância de difusão para o modelo dos caminhos preferenciais

Nos modelos teóricos que foram desenvolvidos para ter em conta o efeito do bloqueio parcial de eléctrodos com espécies inactivas na impedância de difusão, a superfície do eléctrodo é normalmente considerada como sendo constituída por um conjunto de sítios activos que se comporta como um *array* de microeléctrodos. Este *array* caracteriza-se por um raio de zona activa (r_a) e espaçamento entre zonas activas ($2r_b$) uniformes,[11c,e] figura 5.11 (ver também figuras 5.9 e 5.10).

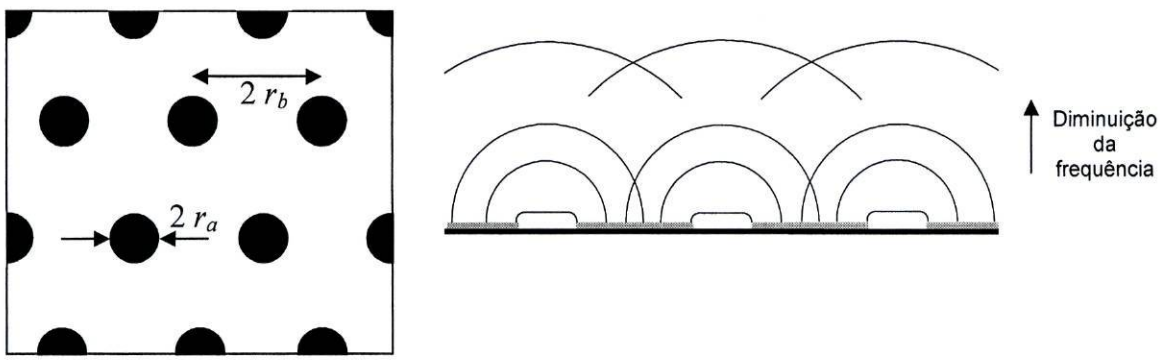


Figura 5.11: Representação dum *array* ideal de microeléctrodos e da evolução dos perfis de difusão com a frequência.

É de esperar que estes modelos possam fornecer uma boa descrição do eléctrodo modificado com o PEM no caso deste originar uma superfície heterogénea no que respeita ao transporte de espécies electroactivas extremamente carregadas, como é o caso dos iões $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$, isto é, com caminhos preferenciais e áreas por onde o transporte é desfavorável. É contudo necessário introduzir algumas modificações nos modelos existentes de forma a serem tidos em conta alguns efeitos associados ao caso particular dos PEMs e ao modelo dos caminhos preferenciais. O efeito Donnan, o efeito Frumkin e efeitos de volume excluído foram todos incluídos num coeficiente de

partição K_k que afecta as concentrações na vizinhança do filme carregado (figuras 5.9 e 5.10). A forma de introduzir estes efeitos no modelo existente, substituíndo directamente nas expressões do modelo, a concentração (C_k^0) pelo termo $K_k C_k^0$, significa que o coeficiente de partição passa a afectar as concentrações em toda a camada de difusão. Esta aproximação é mais correcta para filmes com um número de camadas elevado. Adicionalmente, de forma a ter em conta a possibilidade de para um número de camadas elevado a difusão nos caminhos preferenciais se ir aproximando de difusão no filme, o coeficiente de difusão $D_k^{(sol)}$ passa a ser dado por $D_R D_k^{(sol)}$ (figura 5.10). Mais uma vez a substituição directa nas equações do modelo existente, introduz uma aproximação tanto mais correcta quanto mais espesso for o filme.

De facto um modelo mais rigoroso teria provavelmente de ter em conta a difusão em três meios em série:[27] difusão linear numa região longe do filme caracterizada por um $K_k \approx 1$ e um coeficiente de difusão dado por $D_k^{(sol)}$; uma região de difusão não-linear correspondendo à difusão de, e para, as zonas activas caracterizada por $K_k \neq 1$ e um coeficiente de difusão dado por $D_R D_k^{(sol)}$; e uma região de difusão linear nos canais através do filme em que as condições fronteira teriam de ter em conta $K_k \neq 1$ (desta feita com o coeficiente de partição referido ao interior do filme) e um coeficiente de difusão igual a $D_k^{(filme)}$. Em todo o caso a aplicação do modelo aproximado constitui um bom ponto de partida, porque ele já inclui as especificidades de um modelo de caminhos preferenciais e segundo porque é de tratamento matemático mais simples.

Representando pelos subíndices $k = 1, 2$ as espécies $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$ respectivamente, a expressão para a impedância de concentração de um *array* regular (raio e separação uniformes) de microeléctrodos distribuídos numa superfície impenetrável (figura 5.11) é:[11c,e]

$$Z_d = \sum_k \frac{\sigma_k^{(p)}}{\sqrt{\omega}} \left[1 + \frac{\theta}{(1-\theta)} \left(\frac{\left\{1 + (q_k/\omega)^2\right\}^{1/2} + q_k/\omega}{1 + (q_k/\omega)^2} \right)^{1/2} + i + \frac{i\theta}{(1-\theta)} \left(\frac{\left\{1 + (q_k/\omega)^2\right\}^{1/2} - q_k/\omega}{1 + (q_k/\omega)^2} \right)^{1/2} \right] \tag{5.34}$$

onde

$$\sigma_k^{(p)} = \frac{RT}{\sqrt{2}\, n^2 F^2 A \sqrt{D_R D_k^{(sol)}}\, K_k c_k^0} \tag{5.35}$$

e

$$q_k = \frac{2D_k^{(sol)}}{r_b^2 \theta(1-\theta)\ln(1+0.27/\sqrt{1-\theta})} \qquad 1-\theta > 0.1 \tag{5.36}$$

$$q_k = \frac{D_R D_k^{(sol)}}{0.36 r_a^2} \qquad 1-\theta \leq 0.1 \tag{5.37}$$

É de salientar que as partes real e imaginária desta impedância são a soma de um termo que traduz a difusão linear e de um factor que traduz os desvios à linearidade. Para um dado *array*, o peso de cada um destes termos na impedância global vai depender da frequência da perturbação.

A cobertura θ, o raio da zona activa, r_a, e o raio da zona inactiva que rodeia o microeléctrodo r_b satisfazem a seguinte relação:

$$1-\theta = \frac{r_a^2}{r_b^2} \tag{5.38}$$

A intensidade de corrente de permuta para este modelo é dada por:

$$I^0 = nFA(1-\theta)\, k^0\, K_1 C_O(0)^{(1-\alpha)} K_2 C_R(0)^{\alpha} \tag{5.39}$$

logo a resistência de transferência de carga medida é aparente e é dada por:

$$R_{CT}^{(ap)} = \frac{R_{CT}}{(1-\theta)K_1 K_2}\,. \tag{5.40}$$

Na figura 5.12 representa-se no plano complexo a impedância de difusão para um *array* ideal de microeléctrodos (equação 5.34) para diferentes valores dos parâmetros do modelo.

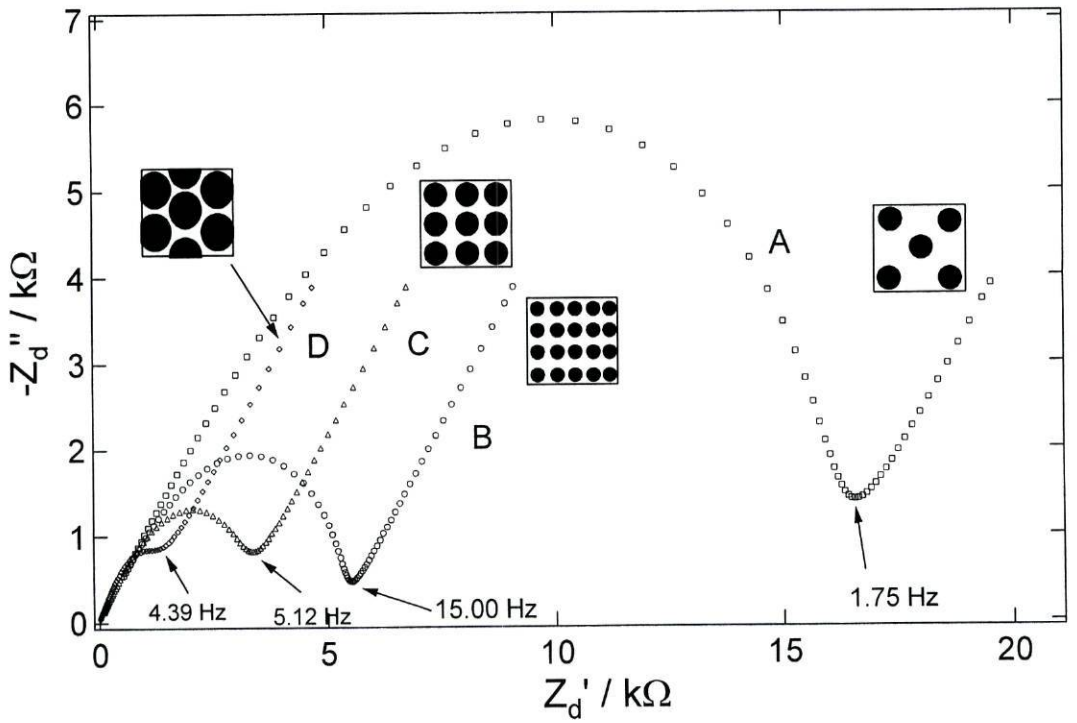


Figura 5.12: Curvas simuladas para a impedância de difusão dum *array* ideal de microeléctrodos (eq. 5.34) no intervalo 15 kHz - 0.1 Hz: $A = 5\,\mathrm{mm}^2$, $C_k^0 = 1\,\mathrm{mol\,m}^{-3}$, $K_k = 1$, $D_k^{(sol)} = 6\times10^{-10}\ \mathrm{m}^2 s^{-1}$; A- $\theta = 0.98$, $r_a = 3\,\mu m$; B- $\theta = 0.98$, $r_a = 1\,\mu\mathrm{m}$; C- $\theta = 0.90$, $r_a = 3\,\mu\mathrm{m}$; D- $\theta = 0.60$, $r_a = 9.48\,\mu\mathrm{m}$.

É possível distinguir três zonas nos diagramas de Nyquist:[11e, 28, 29] a frequências elevadas observa-se uma recta de declive unitário que traduz a difusão linear semi-infinita para cada área activa individual; a frequências intermédias a espessura da camada de difusão passa a ser maior que o tamanho da área activa mas continua a ser menor que o espaçamento entre as zonas activas observando-se difusão não-linear; a partir da frequência assinalada, os perfis individuais fundem-se num só passando a difusão a ser linear semi-infinta mas agora correspondendo à área geométrica do eléctrodo. Esta evolução dos perfis de difusão está representada na figura 5.11. Como é de esperar, a frequência a que os perfis de difusão individuais se fundem é tanto mais

baixa quanto maior o espaçamento entre as áreas activas (curva A-$r_b = 21.2\ \mu m$, curva B-$r_b = 7.1\ \mu m$). No caso representado por C apesar do espaçamento ser semelhante ao da situação representada pela figura B, $r_b = 9.48\ \mu m$, as zonas activas são maiores o que faz com que o intervalo de frequências onde se observa difusão linear semi-infinita para cada zona individual seja maior e consequentemente, a frequência a que os perfis se fundem seja mais baixa. Observa-se que a impedância de difusão aumenta com o grau de cobertura e com a diminuição do tamanho das áreas activas.

5.5.2 O modelo *Membrana*

5.5.2.1 Definição

No caso do PEM se comportar como uma membrana (figura 5.13) cada camada adicional significa um acréscimo na espessura do filme, L, logo um decréscimo na corrente devido a um menor gradiente de concentração. Esta tendência de decréscimo da corrente com o número de camadas pode não se verificar quando o filme for terminado por uma camada de policatião já que o efeito do decréscimo do gradiente de concentrações devido ao aumento de espessura é compensado por um coeficiente de partição, $K_k^{(filme)}$, que favorece a inclusão da espécie no filme.

O PEM é tratado como um meio de difusão homogéneo em série com a solução caracterizado por um coeficiente de difusão para cada espécie, $D_k^{(filme)}$. O filme e a solução estão em equilíbrio caracterizado pelo coeficiente de partição para cada espécie acima referido. O coeficiente de difusão no filme e o coeficiente de partição podem depender do número de camadas (porque as propriedades do filme variam à medida que o número de camadas aumenta) e da carga da última camada.[5]

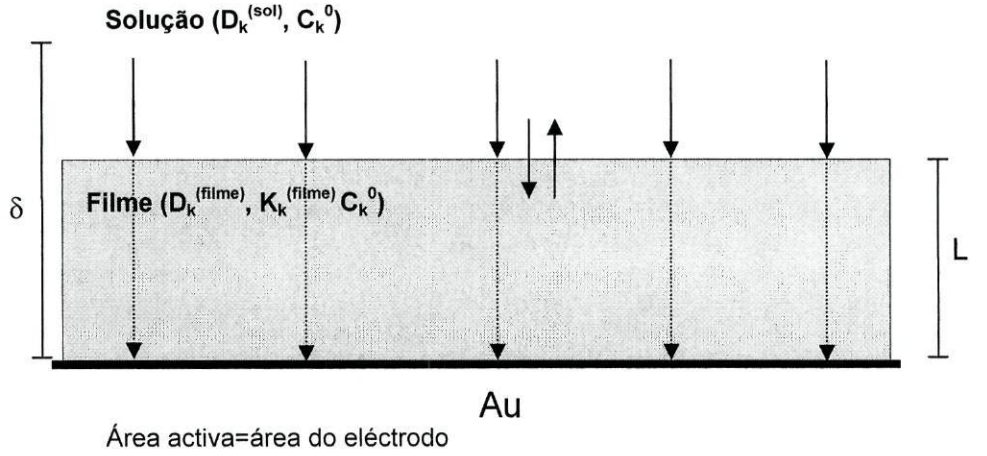


Figura 5.13: Representação do filme visto como uma membrana. L representa a espessura do filme.

5.5.2.2 Impedância de difusão para o modelo membrana

A impedância de difusão adequada à descrição anterior deriva-se seguindo os mesmos passos que levaram à dedução da impedância de Warburg (secção 5.2.2.1):

Lei de Fick,

$$\frac{\partial c_{kj}}{\partial t} = D_k^j \frac{\partial^2 c_{kj}}{\partial t^2} \qquad (k = O, R; \quad j = 1\,(filme), 2\,(solução)) \qquad (5.20, 5.21)$$

Condições fronteira:

$$D_k^{(filme)} \left.\frac{\partial c_{k1}}{\partial t}\right|_{x=L} = D_k^{(sol)} \left.\frac{\partial c_{k2}}{\partial t}\right|_{x=L} \quad \text{(igualdade de fluxos na interface filme/solução)} \quad (5.41)$$

$$\frac{I(t)}{nFA} = D_k^{(filme)} \left.\frac{\partial c_{k1}}{\partial t}\right|_{x=0} \quad \text{(igualdade de fluxos na interface metal/filme)} \quad (5.24)$$

$$c_{k1}\big|_{x=L} = K_k^{(filme)} c_{k2}\big|_{x=L} \text{ (condição de equílibrio na interface filme/solução)} \quad (5.42)$$

$$\lim_{x\to\infty} C_{k,2}(x,t) = C_{k,2}^0 \qquad \text{(a solução é um meio semi-infinito)} \quad (5.43)$$

Condição inicial,

$$c_{k,1}(x,0) = K_k^{(filme)} c_{k,2}^0 \quad (5.44)$$

$$c_{k,2}(x,0) = c_{k,2}^0 \quad (5.45)$$

A relação entre a corrente e as concentrações no domínio de Laplace é

$$\bar{c}_{k1}(s,x) = \frac{K_k^{(filme)} c_{k2}^0}{s} + A_{k1}(s) e^{\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}x} + B_{k1}(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}x} \quad (5.46)$$

$$\bar{c}_{k2}(s,x) = \frac{C_{k,2}^0}{s} + B_{k2}(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_k^{(sol)}}}x} \quad (5.47)$$

onde,

$$A_{k1} = \frac{\bar{I}_k(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L}}{2nFA\sqrt{D_k^{(filme)}s}} \frac{\sqrt{D_k^{(sol)}s} - K_k^{(filme)}\sqrt{D_k^{(filme)}s}}{\sqrt{D_k^{(sol)}s}\cosh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right) + \sqrt{D_k^{(filme)}s}\sinh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right)} \quad (5.48)$$

$$B_{k1} = \frac{\bar{I}_k(s) e^{\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L}}{2nFA\sqrt{D_k^{(filme)}s}} \frac{\sqrt{D_k^{(sol)}s} + K_k^{(filme)}\sqrt{D_k^{(filme)}s}}{\sqrt{D_k^{(sol)}s}\cosh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right) + \sqrt{D_k^{(filme)}s}\sinh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right)} \quad (5.49)$$

$$B_{k2} = -\frac{\bar{I}_k(s)}{nFA} \frac{e^{\sqrt{\frac{s}{D_k^{(sol)}}}L}}{\sqrt{D_k^{(sol)}s}\cosh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right) + \sqrt{D_k^{(filme)}s}\sinh\left(\sqrt{\frac{s}{D_k^{(filme)}}}L\right)} \quad (5.50)$$

A impedância de concentração para cada espécie k é facilmente derivada como sendo

$$Z_k = \frac{\sqrt{2}RT}{K_k c_{k2}^0 n^2 F^2 A \sqrt{D_k^{(filme)} i\omega}} \frac{\sinh\left(\sqrt{\frac{i\omega}{D_k^{(filme)}}} L\right) + K_k^{(filme)} \sqrt{\frac{D_k^{(filme)}}{D_k^{(sol)}}} \cosh\left(\sqrt{\frac{i\omega}{D_k^{(filme)}}} L\right)}{\cosh\left(\sqrt{\frac{i\omega}{D_k^{(filme)}}} L\right) + K_k^{(filme)} \sqrt{\frac{D_k^{(filme)}}{D_k^{(sol)}}} \sinh\left(\sqrt{\frac{i\omega}{D_k^{(filme)}}} L\right)} \tag{5.51}$$

finalmente, introduzindo os seguintes parâmetros

$$a_k = \sqrt{\frac{1}{2D_k^{(filme)}}} L \tag{5.52}$$

$$b_k = K_k^{(filme)} \sqrt{\frac{D_k^{(filme)}}{D_k^{(sol)}}} \tag{5.53}$$

$$\sigma_k^{(m)} = \frac{RT}{\sqrt{2} K_k^{(filme)} c_{k2}^0 n^2 F^2 A \sqrt{D_k^{(filme)}}} \tag{5.54}$$

a impedância de difusão total para o modelo de membrana é dada por:

$$Z_d = \sum_k \frac{\sigma_k^{(m)}}{\sqrt{j\omega}} \frac{\sinh\left(a_k (1+i)\sqrt{\omega}\right) + b_k \cosh\left(a_k (1+i)\sqrt{\omega}\right)}{\cosh\left(a_k (1+i)\sqrt{\omega}\right) + b_k \sinh\left(a_k (1+i)\sqrt{\omega}\right)} \tag{5.55}$$

Note-se que esta impedância só se reduz à impedância de Warburg quando ($D_k^{(filme)} = D_k^{(sol)}$ e $K_k^{(filme)} = 1$) e que, por exemplo, quando $D_k^{(sol)} >> D_k^{(filme)}$ se obtém o comportamento de difusão restrita a uma camada finita.

Mais uma vez, atendendo à definição de R_{CT} (eq. 5.14) e de acordo com este modelo, a resistência de transferência de carga medida experimentalmente é aparente e é dada por:

$$R_{CT}^{(ap)} = \frac{R_{CT}}{K_1^{(filme)} K_2^{(filme)}} \tag{5.56}$$

Na figura 5.14 estão representadas várias curvas simuladas para a equação 5.55 para alguns valores dos parâmetros do modelo.

A altas frequências o filme é um meio semi-infinito daí a recta de declive unitário observada a estas frequências. A frequências intermédias o comportamento é o de um meio finito, o perfil de difusão continua a localizar-se dentro do filme. A partir da frequência assinalada a impedância passa a ser dominada pela difusão linear semi-infinita na solução.

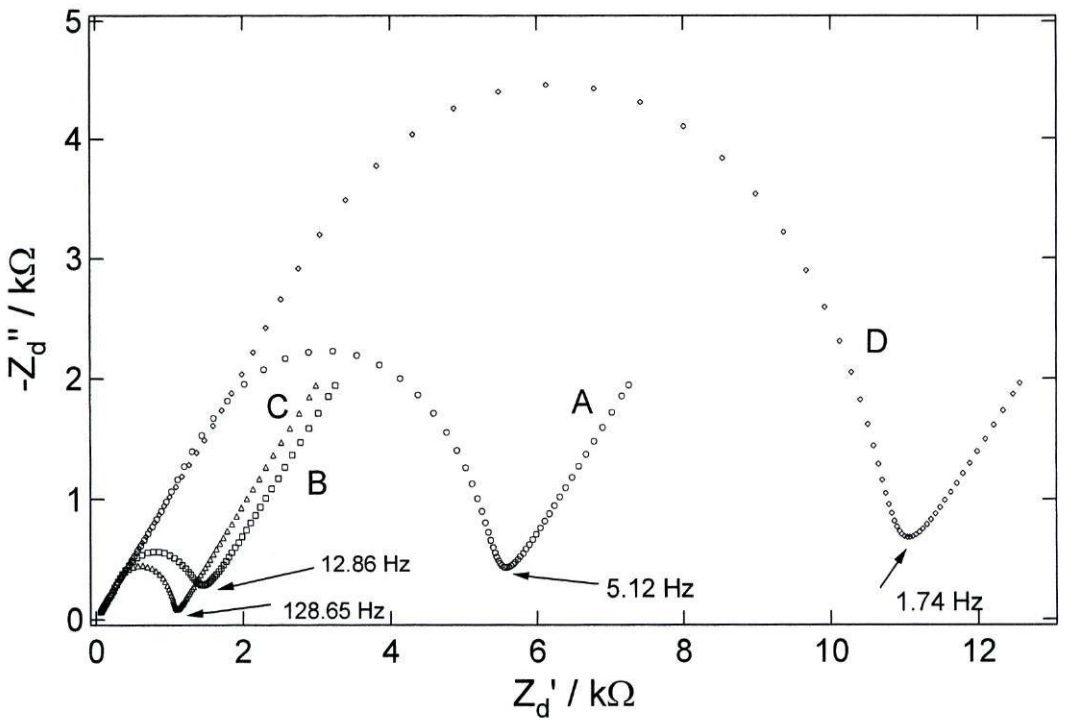


Figura 5.14: Curvas simuladas para a impedância de difusão do modelo de membrana (eq. 5.55) no intervalo 15 kHz - 0.1 Hz: $A = 5\,\mathrm{mm}^2$, $C_k^0 = 1\,\mathrm{mol\,m^{-3}}$, $D_k^{(sol)} = 6\times10^{-10}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$; A- $D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 50\,\mathrm{nm}$; B- $D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$, $K_k^{(filme)} = 2.0$, $L = 50\,\mathrm{nm}$; C-$D_k^{(filme)} = 1\times10^{-12}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 10\,\mathrm{nm}$; D- $D_k^{(filme)} = 5\times10^{-13}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$, $K_k^{(filme)} = 0.5$, $L = 50\,\mathrm{nm}$.

5.5.3 Análise da impedância de eléctrodos de Au modificados com PEMs

A interpretação quantitativa das resultados de impedâncias foi feita com base no circuito equivalente representado na figura 5.15. Este tipo de circuito equivalente é usado para modelar a resposta de frequência para revestimentos poliméricos,[30] e eléctrodos modificados com PEMs[31] e SAMs.[32] A impedância total para este circuito é dada pela equação 5.57.

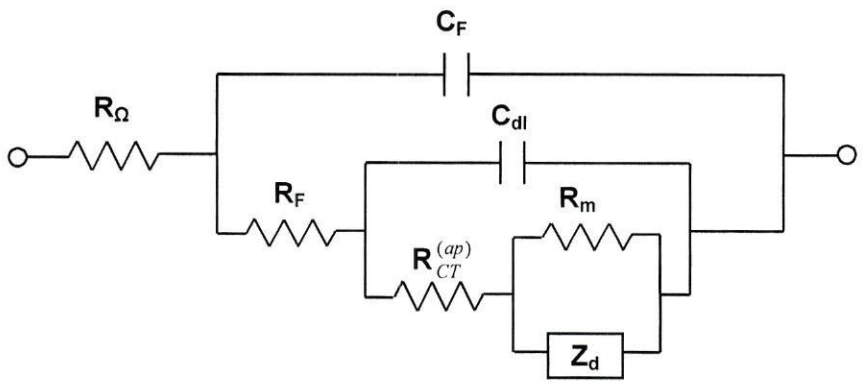


Figura 5.15: Circuito equivalente para um eléctrodo modificado com um PEM. C_F representa a capacidade do filme, R_F representa a resistência do filme, $R_{CT}^{(ap)}$ (eq.5.40 ou 5.56) representa a resistência de transferência de carga aparente, R_m representa a resistência associada ao mecanismo de condução óhmica e Z_d representa a impedância de difusão (eq. 5.34 ou 5.55). Os restantes elementos têm o significado dado na figura 5.3.

$$Z = R_{\Omega} + \cfrac{1}{\omega C_F i + \cfrac{1}{R_F + \cfrac{1}{\omega C_{dl} i + \cfrac{1}{R_{CT}^{(ap)} + \cfrac{1}{\cfrac{1}{R_m} + \cfrac{1}{Z_d}}}}}} \qquad (5.57)$$

A resistência do filme depende da sua espessura, da quantidade de iões pequenos dentro do filme e da sua mobilidade[32, 33] ao passo que a capacidade do filme tem em conta a dupla camada formada devido ao fenómeno de sobrecompensação de carga. Z_d representa a impedância de difusão dada pelas equações 5.34 no caso do modelo dos caminhos preferenciais e 5.55 para o caso do modelo membrana. O restante elemento em paralelo com a impedância de difusão representa a contribuição de um mecanismo de condução óhmica evidenciado pelos CVs, que a partir dum determinado número de camadas passam a ser inclinados.

A impedância teórica foi calculada usando o Matlab®.

5.5.3.1 Análise usando o modelo dos caminhos preferenciais

Os resultados dos cálculos para o modelo dos caminhos preferenciais encontram-se nas tabelas 5.2. Nestas tabelas N refere-se ao número de camadas adsorvidas no eléctrodo modificado com a monocamada de alcanotiol. Em todos os filmes foi medida a resistência da solução, R_Ω, de aproximadamente 140 Ω. A resistência de tranferência de carga para o eléctrodo de Au foi também determinada obtendo-se um valor de aproximadamente 100 Ω. Os valores dos coeficientes de difusão foram considerados iguais para oxidante e redutor, $D_1^{(sol)} = D_2^{(sol)} = D^{(sol)} = 5.1 \times 10^{-10}\ \mathrm{m^2 s^{-1}}$,[11a] bem como os valores dos coeficientes de partição, $K_1^{(filme)} = K_2^{(filme)} = K^{(filme)}$.

Os valores dos parâmetros do modelo são bastante realistas e as curvas teóricas ajustam bastante bem os resultados experimentais como pode ser visto nas figuras 5.7.

Tabela 5.2A: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais obtidos através do ajuste das impedâncias experimentais medidas para os filmes pSS/pHis, usando o circuito equivalente representado na figura 5.15 e a impedância de difusão dada pela equação 5.34. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7A pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0045; N = 8, D_R = 0.0013; N = 9, D_R = 0.0016; N = 10, D_R = 0.0005.

N	C_f(μF)	R_f(kΩ)	C_{dl} (μF)	θ	r_a (μm)	K	R_m(kΩ)
1	0.0294	~ 0	0.820	0.005	8.0	1.00	∞
2	0.0526	0.760	0.750	0.20	7.6	0.85	∞
3	0.120	3.05	0.500	0.30	7.5	0.60	∞
4	0.177	5.45	0.490	0.39	7.3	0.46	110
5	0.220	36.2	0.480	0.50	6.9	0.18	51
6	0.240	29.5	0.470	0.61	6.9	0.11	36
7	0.299	68.8	0.633	0.92	4.4	5.92	360
8	0.280	161	0.800	0.93	3.9	3.08	∞
9	0.313	150	0.720	0.97	3.6	5.11	∞
10	0.319	250	0.750	0.985	2.8	12.86	∞

Tabela 5.2B: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais para os filmes pSS/pLis. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7B pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0037; N = 8, D_R = 0.39; N = 9, D_R = 0.0046; N = 10, D_R = 0.0025.

N	C_f(μF)	R_f(kΩ)	C_{dl} (μF)	θ	r_a(μm)	K	R_m(kΩ)
1	0.035	~ 0	1.20	0.005	9.0	0.93	∞
2	0.100	~ 0	1.20	0.05	5.8	1.10	∞
3	0.140	0.998	0.800	0.18	8.6	1.01	∞
4	0.193	0.450	0.950	0.10	9.5	0.89	∞
5	0.292	6.10	0.750	0.41	11.6	0.80	∞
6	0.200	1.70	0.534	0.30	10.8	0.70	∞
7	0.385	25.0	0.385	0.90	7.9	10.70	41.0
8	0.368	15.5	0.200	0.60	15.8	0.29	45.0
9	0.350	44.5	0.190	0.94	6.8	9.85	78.5
10	0.488	31.0	0.275	0.93	7.6	11.05	53.0

Tabela 5.2C: Parâmetros do modelo dos caminhos preferenciais para os filmes pSS/pArg. Os ajustes teóricos estão representados na figura 5.7C pelas linhas contínuas. N = 7, D_R = 0.0037; N = 8, D_R = 0.0024; N = 9, D_R = 0.0019; N = 10, D_R = 0.0011.

N	C_f(μF)	R_f(kΩ)	C_{dl}(μF)	θ	r_a(μm)	K	R_m(kΩ)
1	0.0450	~ 0	1.2	0.005	9.0	0.94	∞
2	0.0775	~ 0	1.2	0.001	10.0	0.70	∞
3	0.150	0.380	1.1	0.10	9.5	1.00	∞
4	0.160	0.379	1.0	0.12	10.3	0.90	∞
5	0.280	6.6	0.514	0.46	8.8	0.72	∞
6	0.260	5.4	0.310	0.52	9.0	0.55	∞
7	0.400	98	0.370	0.905	5.5	4.42	156
8	0.240	132	0.300	0.93	4.9	4.29	316
9	0.360	205	0.623	0.97	3.7	3.93	∞
10	0.330	165	0.764	0.975	3.5	16.50	∞

Os resultados mostram que para todos os filmes, o parâmetro C_F, aumenta gradualmente com o número de camadas. Isto pode reflectir o aumento da área coberta. Consequentemente o decréscimo na área de eléctrodo exposta pode explicar o porquê da capacidade da dupla camada eléctrica, C_{dl}, diminuir com o número de camadas.[28]

A resistência do filme, R_F, depende da cobertura, da espessura do filme da quantidade e mobilidade de iões pequenos no filme. A resistência do filme, R_F, começa a ser detectada imediatamente após a deposição da 2ª ou 3ª camadas de polielectrólito. O seu valor cresce progressivamente e de uma forma não linear com o número de camadas para o filme de pSS/pHis. No caso do filme pSS/pLis existe uma dependência de R_F da carga da última camada: os filmes terminados por pLis causam um decréscimo em R_F, possivelmente devido ao facto da pLis favorecer a penetração de iões pequenos no filme, como parecem indicar os valores de cobertura efectiva, como discutido mais adiante. Os valores mais elevados para os filme de pSS/pHis e pSS/pArg corroboram as hipóteses feitas com base nas medições de FT-IRRAS de que estes filmes são aqueles em que é depositada mais massa de polielectrólito e onde também se espera uma menor concentração e/ou uma menor mobilidade para os iões pequenos devido à melhor interacção entre polianião e policatião. Esta melhor interacção deve conduzir a uma extensa interpenetração entre camadas adjacentes, ou seja, a uma estrutura bastante

compacta onde a solvatação dos iões pequenos é desfavorável. Os valores medidos, da ordem de 10^5 Ω são da mesma ordem de grandeza aos obtidos por outros investigadores para outros filmes.[31]

Como mencionado na secção 5.5.1, o modelo dos caminhos preferenciais atribui a diminuição da permeabilidade iónica, com o número de camadas, a um decréscimo na área activa do eléctrodo. A superfície do eléctrodo é vista como sendo um plano de isolante polvilhado por sítios activos. O desvio da situação de difusão linear semi-infinita depende do grau de cobertura, θ, e do tamanho das zonas activas, r_a. Apesar de aproximado, já que são de esperar desvios do *array* ideal (raio e separação uniforme), os valores tabelados (tabela 5.2) permitem explicar as observações experimentais.

Para as primeiras camadas ($1 \leq N \leq 6$) a cobertura efectiva é baixa. Isto pode ser explicado atendendo a que, além das áreas descobertas, aquelas cobertas com poucas camadas de polielectrólito, também podem ser permeáveis, como se ilustra na figura 5.9. Este facto pode explicar também o porquê dos valores de r_a observados para estes filmes serem mais elevados.

Os baixos valores de cobertura são consistentes com os diagramas de Nyquist para filmes com poucas camadas, onde é ainda visível a linha recta de declive unitário a baixas frequências indicando difusão linear semi-infinita. Isto ocorre porque os perfis de difusão de regiões activas vizinhas coalescem. Como seria de esperar nesta situação a forma dos CVs bem como a intensidade das correntes de pico não difere da do eléctrodo de Au não modificado. O efeito mais visível que acompanha a deposição destas camadas é o aumento no semicírculo a frequências elevadas que é atribuído, principalmente, ao aumento de R_F. O ligeiro aumento na separação entre picos está associado ao aumento de $R_{CT}^{(ap)}$.

O grau de cobertura efectiva aumenta monotonamente para os filmes de pSS/pHis e pSS/pArg, ao passo que para os filme de pSS/pLis é notada uma dependência relativamente à carga da última camada. A montagem das camadas de pLis causam uma diminuição em θ e um aumento em r_a. Para estes factos deve contribuir, como foi notado na análise dos espectros de FT-IRRAS, uma menor quantidade de polielectrólitos depositada neste filme, resultando em camadas menos espessas e menos densas. Consequentemente a penetração de iões pequenos promovida por atracção electrostática, através de áreas cobertas por poucas camadas, é facilitada quando a pLis é a camada terminal. Para efeito de bloqueio é como se a camada terminal de pLis não

existisse. Na realidade, devido ao efeito de sobrecompensação de carga, o efeito de bloqueio da camada anterior de pSS também é ultrapassado. O resultado é uma cobertura efectiva que difere muito da área coberta quando a camada terminal é uma camada de pLis. Isto explica porque os filmes terminados por pLis apresentam impedâncias mais baixas e são atravessados por correntes mais elevadas que os filmes com menos uma camada, mas terminados com pSS. No caso dos filmes contendo pArg, apesar da esperada elevada densidade de carga positiva superficial (pK_a~12) exibida pelos filmes terminados com o policatião, a penetração através de áreas cobertas, pode ser impedida pela espessura das camadas de polieletrólito. No caso da pHis além deste factor (notar que as medições de FT-IRRAS apontam este filme como sendo aquele para o qual a massa de polielectrólitos depositada é maior) há ainda a ter em conta uma redução no grau de ionização da pHis (pK_a~7) porque as medições electroquímicas foram feitas em meio aproximadamente neutro (como electrólito de suporte usou-se Na_2SO_4 0.1 M), o que significa uma menor densidade de carga positiva para filmes terminados pelo policatião, comparativamente com os outros policatiões. Isto poderá explicar porque os filmes de pSS/pHis são aqueles com uma maior área de cobertura efectiva, logo impedâncias mais elevadas.

É notado nos diagramas de Nyquist, após a deposição da 3ª camada no caso do filme de pSS/pHis, 5ª camada nos outros filmes, um desvio da recta de declive unitário a baixas frequências, sugerindo difusão não linear (figura 5.7). Os CVs também se tornam mais oblíquos e as intensidades de corrente de pico diminuem (figura 5.8). De acordo com os resultados do modelo estas observações podem ser explicadas pelo aumento de θ associado a uma maior separação entre zonas activas com um r_a menor, já que nesta situação se espera um crescente desvio da difusão linear semi-infinta e uma menor coalescência entre os perfis de difusão individuais à escala de tempo a que os CVs são medidos.[28, 29]

Tem vindo a ser referido em vários estudos que as propriedades dos filmes obtidos por LBLA variam com o número de camadas. Alguns autores verificaram usando medições de AFM, que o filme só passa a ser contínuo após a deposição de várias bicamadas e que até aí o substracto está coberto por um número de ilhas isoladas cujo tamanho aumenta com o número de camadas.[34] Estas observações corroboram o modelo de caminhos preferências aqui discutido.

Outros autores, usando outras técnicas, relataram que as primeiras camadas depositadas são menos espessas e mais porosas, contendo maior quantidade de iões pequenos e solvente.[3, 4, 10a, 35] Normalmente as mudanças mais bruscas são observadas na transição para a 3ª bicamada, a espessura por camada aumenta e o filme torna-se mais compacto.[3, 35] O aumento pronunciado nos valores de R_F, C_F e no grau de cobertura efectiva, para todos os tipos de filme, após a montagem da 7ª camada, pode dever-se a este tipo de transição.

O aumento drástico em θ, que passa a ser superior a 0.90 para os três filmes é acompanhado por um decréscimo pronunciado nos valores de r_a e consequentemente um aumento na separação entre zonas activas. Foi notado anteriormente que após este número de camadas há um aumento pronunciado na impedância dos filmes (figura 5.7), que os CVs passam a ser em forma de patamar e que há um decréscimo pronunciado na corrente (figura 5.8). Estas observações são consistentes com o tipo de zona activa sugerido para filmes com muitas camadas, figura 5.10. A espécie electroactiva tem que atravessar o filme antes de atingir uma das zonas "ocas" previamente destapadas. Os coeficientes de difusão para espécies carregadas nestes filmes podem ser várias ordens de grandeza inferiores aos coeficientes de difusão para a mesma espécie em solução, e podem depender do número de camadas, nomedamente se o mecanismo de difusão for o que é proposto por Schlenoff.[5] Para difusão em PEMs já foram publicados valores da ordem do 10^{-14} m^2s^{-1},[36] ao passo que em solução os coeficientes são da ordem do 10^{-10} m^2s^{-1}. Os valores mais baixos obtidos para as espécies $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, para os filmes em estudo são da ordem de 10^{-13} m^2s^{-1}, portanto de acordo com o que vem sendo publicado.

A combinação de um coeficiente de difusão baixo e uma maior separação entre zonas activas faz com que à escala de tempo a que os CVs são medidos os perfis individuais de difusão não coalesçam† de forma que a corrente medida reflecte a verdadeira área activa do eléctrodo, e um coeficiente de difusão baixo.[27] Devido à menor dimensão das áreas activas é também de esperar que a difusão de, e para, estas seja do tipo convergente.

† A espessura da camada de difusão em voltametria cíclica é $\sim\sqrt{\frac{DRT}{Fv}}$ em que v representa a velocidade de varrimento e os restantes termos têm o seu significado usual

Todas as considerações feitas até agora acerca da influência do grau de cobertura e do tamanho das zonas activas na extensão do desvio da situação de difusão linear semi-infinita são facilmente constatáveis na figura 5.16 onde somente é representada a impedância de difusão, Z_d, no plano complexo em função do número de camadas.

Até à 7ª camada os espectros mostram três zonas. A frequências elevadas (zona A) os perfis individuais de difusão não coalescem porque a espessura da camada de difusão é pequena comparada com o tamanho das áreas activas e a distância entre áreas activas adjacentes, figura 5.11. Assim sendo a linha recta, com declive muito próximo do unitário, observada neste domínio traduz a ocorrência de difusão linear semi-infinita para cada área activa. A frequências intermédias a espessura da camada de difusão torna-se maior que o tamanho da área activa mas continua sendo menor que a separação entre áreas activas adjacentes. Nesta situação existe difusão não-linear para cada área activa (zona B). A baixas frequências os perfis de difusão individuais coalescem de forma que a situação de difusão linear semi-infinita volta a ocorrer, desta feita correspondendo à área geométrica do eléctrodo (zona C). O efeito da sucessiva deposição de camadas de polielectrólito, por alterar o grau de cobertura e o espaçamento entre áreas activas, é fazer variar o valor da impedância de difusão, Z_d, bem como a amplitude do intervalo de frequências correspondente a cada um dos domínios referidos. Assim, à medida que o grau de cobertura efectiva aumenta e r_a diminui, a impedância de difusão aumenta e o valor da frequência a que os perfis individuais de difusão de fundem diminui. Esta é a tendência observada para a deposição das primeiras 6 camadas de polieletrólito. Após a deposição da 7ª camada a impedância de difusão aumenta drasticamente e praticamente só se vê a zona A no plano complexo, o que significa que mesmo à frequência mais baixa utilizada experimentalmente (0.1 Hz) não ocorre coalescência dos perfis de difusão individuais. Esta situação já foi relacionada com o facto da natureza das regiões activas ter mudado, implicando que a espécie tenha de se difundir no filme, figura 5.10. Acresce que as áreas activas têm um menor tamanho e estão mais separadas umas das outras.

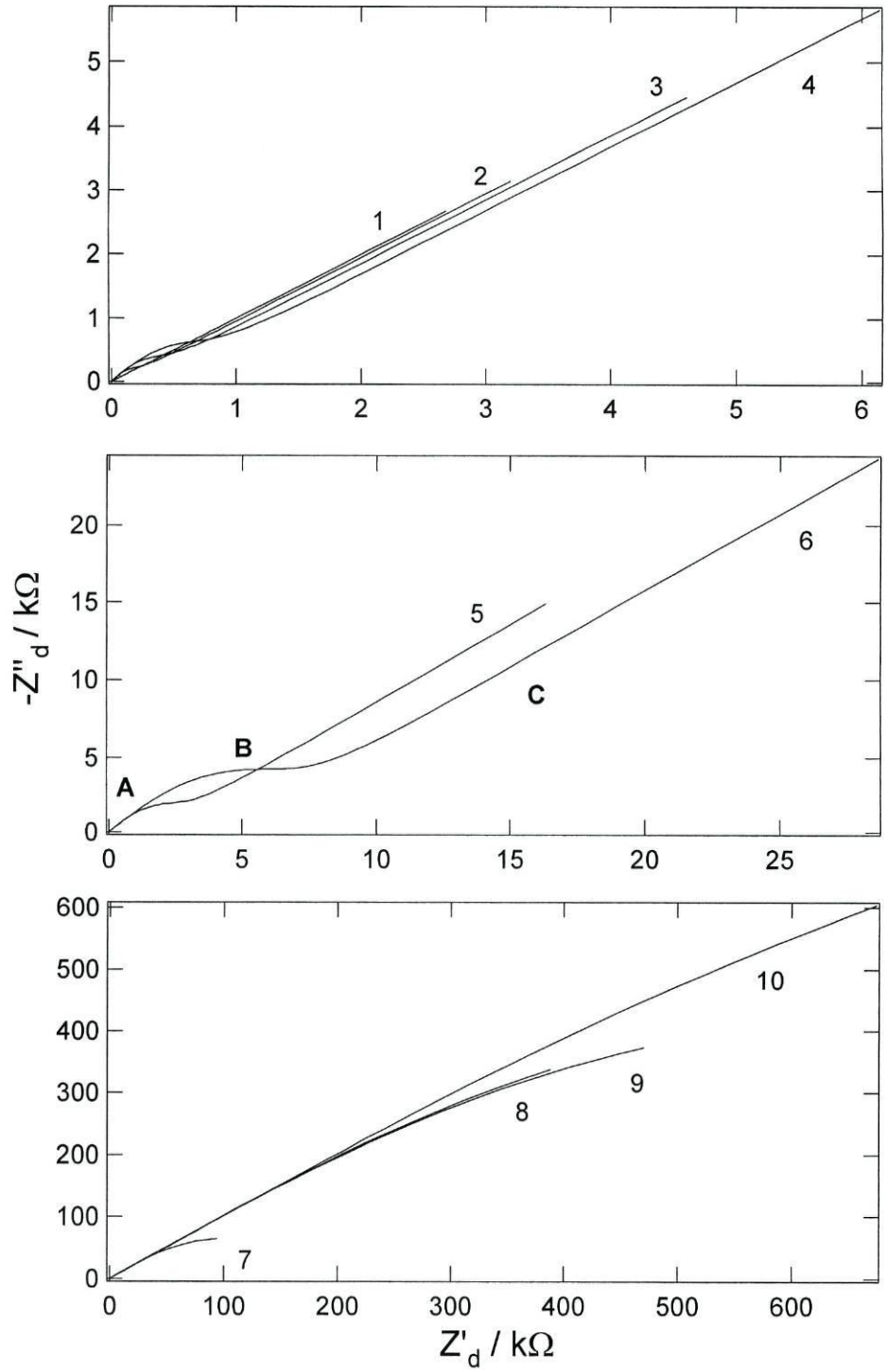


Figura 5.16: Diagramas de Nyquist para as impedâncias de difusão correspondentes à figura 5.7A.

Analisando os restantes parâmetros do modelo observa-se que o valor da constante *K* decresce progressivamente com o número de camadas para todos os filmes. Esse decréscimo é mais pronunciado no caso do filme pSS/pHis o que talvez se deva, como foi anteriormente referido, ao facto deste ser o filme mais denso, em que a

densidade de carga positiva exposta pelos filmes terminados pelo policatião é menor. O salto no valor de K após a 7ª camada pode estar relacionado com o facto de o valor da constante medir agora o conteúdo iónico relativamente a áreas activas de natureza distinta.

Como foi realçado, alguns CVs, correspondentes a filmes com um número de camadas, N, entre 4 e 10, revelam a existência de condução óhmica, isto é, intensidade de corrente directamente proporcional à diferença de potencial. Este fenómeno já foi relatado em outros trabalhos,[5a] tendo sido atribuído a condução por *hopping* de electrões quando o transporte de massa por difusão deixa de ser suficiente devido a um pequeno gradiente de concentração. Outra hipótese a ter em conta é a de corresponder a transporte de massa por migração. No modelo este fenómeno foi considerado através da inclusão de uma resistência, R_m em paralelo com o transporte de massa por difusão, representado por Z_d.

O facto deste fenómeno só surgir para filmes com determinado número de camadas, como se pode ver nas tabelas 5.2, está de acordo com o que foi previamente publicado.[5a] Isto significa que as impedâncias oferecidas pelos dois caminhos têm grandezas comparáveis. Para os restantes filmes o caminho representado por R_m, não contribui para o transporte de carga, ou porque o número de transporte da espécie electroactiva é insignificante (esta deve ser a situação para filmes com poucas camadas bastante permeáveis ao electrólito de suporte), ou porque a impedância deste caminho é demasido elevada comparativamente com a do caminho representado pela difusão devido às pequenas concentração e mobilidade dos iões pequenos no filme (isto é o que se espera para filmes com elevado número de camadas).

Como observação final acerca do resultado da aplicação do modelo dos caminhos preferenciais é de mencionar que, contrariamente ao que outros autores sugeriram com base na análise das respostas em frequência usando o circuito de Randles,[2, 4] a electroactividade nunca chega a ser limitada pela cinética de transferência electrónica. O facto da permeabilidade se ir reduzindo com o número de camadas está relacionado com limitações ao transporte de massa. Estas acentuam-se após a deposição de muitas camadas, resultando em elevados valores para as impedâncias a baixas frequências e em voltamogramas do tipo estado estacionário porque a espécie passa a ter de se difundir no filme com um coeficiente de difusão três ordens de grandeza

inferior ao da solução. Neste aspecto, os resultados aqui apresentados concordam com o que foi sugerido por Schlenoff.[5]

5.5.3.2 Análise usando o modelo membrana

Como foi anteriormente referido, um dos objectivos do trabalho apresentado neste capítulo era o de avaliar a aplicabilidade dos modelos actualmente invocados na interpretação qualitativa da electroactividade de eléctrodos modificados com PEMs. Até agora o modelo que atribui a redução da permeabilidade dos filmes com o aumento do número de camadas, a uma redução na área activa do eléctrodo parece ser adequado para interpretar os resultados experimentais apresentados. Na figura 5.17 comparam-se as impedâncias experimentais para filmes pSS/pHis com diferentes números de camadas e as curvas teóricas obtidas no caso de se admitir um comportamento tipo membrana para o PEM, isto é, usando a expressão 5.55 para a impedância de difusão.

Como se pode verificar o ajuste não é tão bom como o obtido com o modelo do caminhos preferenciais. Este mau ajuste foi também observado com os restantes dois filmes.

5.5.3.3 Comparação dos dois modelos

Pode sugerir-se que a melhor descrição dos resultados experimentais pelo modelo dos caminhos preferenciais quando comparado com o modelo de membrana deve estar associado ao facto do primeiro avaliar, como o próprio nome indica, a existência de caminhos preferenciais para o transporte de espécies electroactivas altamente carregadas através do filme, algo cuja existência não é difícil de conceber, neste caso como um prolongamento dos defeitos da monocamada de cisteamina, mas de uma forma mais geral devido ao facto da superfície do substracto ser irregular, e que é incompatível com o modelo de membrana que vê a superfície do filme como homogénea desde a primeira camada.

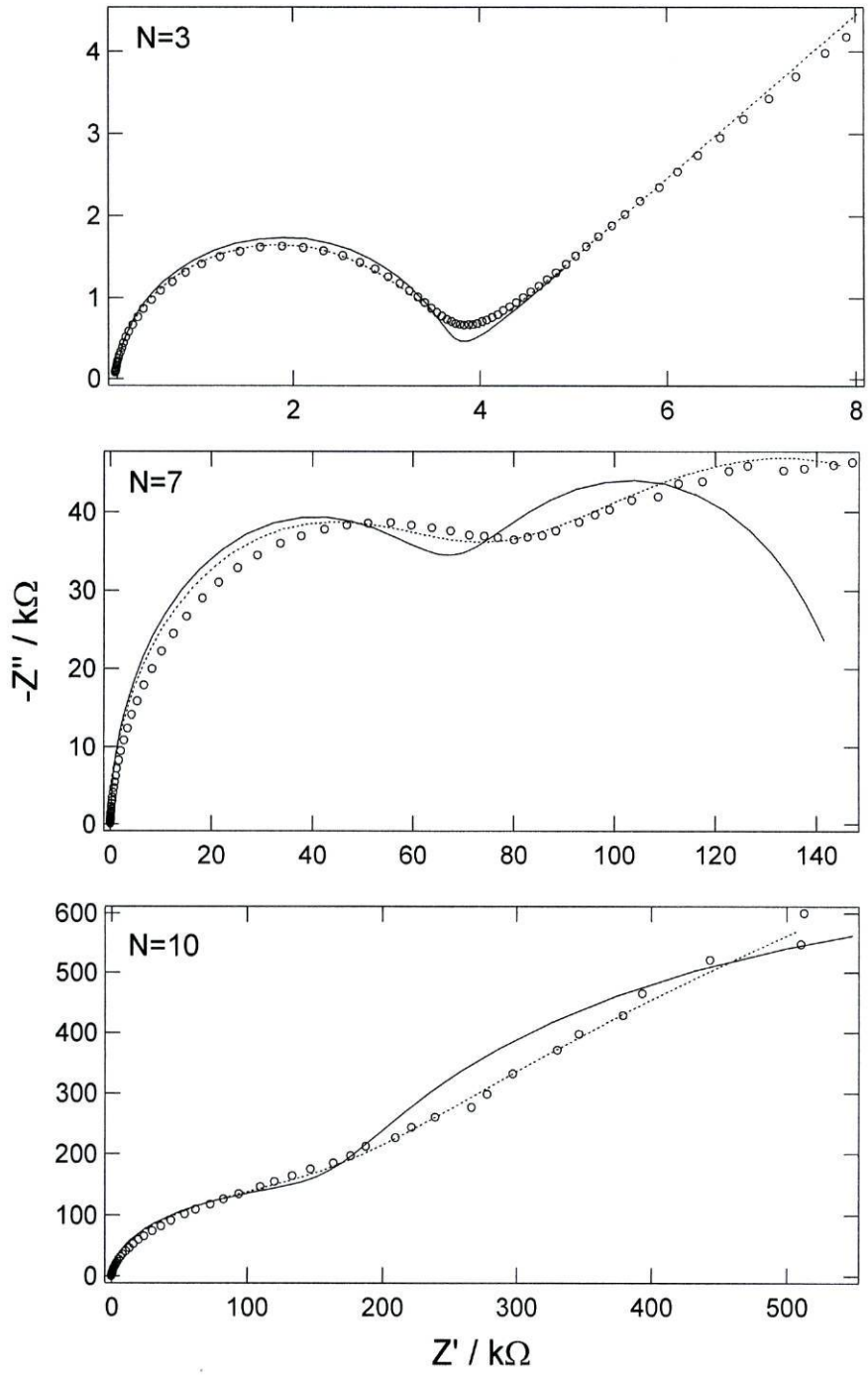


Figura 5.17: Ajustes teóricos (linhas contínuas) obtidos, usando o circuito equivalente representado na fig. 5.15, e a impedância de difusão do modelo de membrana, eq. 5.55, para filmes de pSS/pHis com diferente número de camadas (N). N = 3: C_F = 1.00 μF, C_{dl} = 1.20 μF, R_F = 3.1 kΩ, R_m= inf., $D^{(filme)}$ = 9.1×10^{-12} m^2s^{-1}, $K^{(filme)}$ = 0.4, L = 8 nm; N = 7: C_F = 0.39 μF, C_{dl} = 6.20 μF, R_F = 78.0 kΩ, R_m= 360 kΩ, $D^{(filme)}$ = 5.3×10^{-13} m^2s^{-1}, $K^{(filme)}$ = 0.020, L = 22 nm; N = 10: C_F = 0.41 μF, C_{dl} = 1.70 μF, R_F = 270 kΩ, R_m= inf., $D^{(filme)}$ = 2.5×10^{-14} m^2s^{-1}, $K^{(filme)}$ = 0.039, L = 31 nm. Para comparação também foram representadas as curvas obtidas usando o modelo dos caminhos preferenciais (linha a ponteado).

O efeito destes "defeitos" dilui-se à medida que o número de camadas do filme aumenta e por esta razão pode conjecturar-se que o comportamento se vá aproximar ao de uma membrana para filmes espessos.

O modelo dos caminhos preferenciais é compatível com o que tem sido relatado, com base em outras técnicas, nomedamente AFM, para o modo de crescimento dos PEMs e que sugerem que a superfície do substracto não é totalmente coberta até que sejam depositadas várias camadas.[34]

5.6 Conclusões

O decréscimo na permeabilidade, relativamente aos iões $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$, com o número de camadas (N) para $N < 11$, para os filmes de pSS/pHis, pSS/pLis e pSS/pArg, montados camada-a-camada com base em interacções electrostáticas sobre eléctrodos de Au modificados com cisteamina parece estar relacionado com uma progressiva redução na área activa do filme/eléctrodo em vez de ser uma consequência directa do aumento de espessura do filme como aconteceria se o filme se comportasse como uma membrana. Foi possível chegar a esta conclusão após análise da resposta de frequência usando impedâncias de difusão específicas para cada uma das interpretações acima referidas.

Verificou-se que as impedâncias teóricas calculadas de acordo com o modelo dos caminhos preferenciais ajustam bem os valores experimentais para todos os filmes estudados ao passo que o modelo membrana não ajusta bem em nenhum dos casos. Os valores dos parâmetros de ajuste permitem explicar as observações experimentais. Assim sendo, as variações notadas nos espectros de impedâncias, intensidade de correntes de pico e forma dos voltamogramas é atribuída a variações na área activa e tamanho das zonas activas, com o número de camadas. A natureza das zonas activas também pode variar com o número de camadas, de forma que após um determinado número de camadas a difusão no filme passa a ser determinante.

Convém referir que as zonas activas não necessitam ser áreas descobertas, mas simplesmente locais na superfície do filme através dos quais o transporte é preferencialmente efectuado.

5.7 Procedimento experimental e instrumentação

I. Reagentes e Material

Cisteamina (Fluka), poli(4-estirenossulfonato de sódio) (MM, 70 000) (pSS, Aldrich), hidrocloreto de poli-L-histidina (MM, 15 800) (pHis, Sigma), hidrobrometo de poli-L-lisina (MM, 32 600) (pLis, Sigma), hidrocloreto de poli-L-arginina (MM, 38 300) (pArg, Sigma), hexacianoferrato de potássio (III) (Merck, qualidade pa), hexacianoferrato de potássio (II) (Merck, qualidade pa), ácido acético 100% (Pronalab, qualidade pa), acetato de sódio triidratado (Merck, qualidade pa), Na_2SO_4 anidro (Merck, suprapur®), $HClO_4$ 70% (Merck, suprapur®).

Na preparação de soluções e nos procedimentos de lavagem foi utilizada água Millipore (resistividade > 18 MΩ·cm).

Nas medições de FT-IRRAS foram utilizados slides de Au (18 mm × 18 mm , 5 nm Cr, 100 nm Au) adquiridos à empresa Evaporated Metal Films. Antes de serem utilizados como substracto foram lavados com acetona seguida de imersão numa solução 3:1 de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogénio (30%) (solução "piranha") durante aproximadamente 1 minuto e lavagem com água Millipore.

Atenção! O manuseamento da solução "piranha" requer cuidados especiais visto tratar-se duma solução altamente corrosiva que reage violentamente com matéria orgânica.

Nas medições electroquímicas usou-se uma célula de 3 eléctrodos com um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (3 M KCl) e uma rede de Pt de área elevada como contra-eléctrodo. O eléctrodo de trabalho foi o eléctrodo de Au modificado (disco de Au com uma área de 3.14 mm^2).

II. Modificação das superfícies com os filmes automontados

A monocamada de cisteamina foi automontada a partir de uma solução em etanol 1 mM no alcanotiol. Depois da automontagem a superfície foi minuciosamente lavada com etanol, água e seca com uma corrente de N_2.

O filmes de polielectrólitos, até 10 camadas, foram obtidos mergulhando alternadamente a superfície de Au em soluções (1 mg/mL, em tampão ácido acético/acetato 0.1 M pH 4.5) de pSS e policatião durante 10 min. Depois da automontagem de cada camada, a superfície foi lavada com água e seca numa corrente de N_2.

III. Caracterização da superfície usando FT-IRRAS

Todos os passos de modificação da superfície foram seguidos por FT-IRRAS tendo sido utilizada a montagem experimental e o procedimento descrito no capítulo 2.

IV. Medições electroquímicas

Neste trabalho foi preparado um novo filme desde a monocamada de cisteamina, de cada vez que se pretendia obter um filme com mais uma camada.

A automontagem de cada novo filme no eléctrodo, de acordo com o procedimento acima descrito, foi precedida dos seguintes passos de limpeza do eléctrodo. Primeiro o eléctrodo foi tratado com uma solução "piranha" recém-preparada durante 5 minutos. Através de medições FT-IRRAS foi possível constactar que este passo conduz à remoção total do filme de polieletrólito. O segundo passo consistiu no polimento mecânico do eléctrodo com pasta de diamante num pano de polimento (Buhler, Illinois) até se obter uma superfície espelhada. Procedeu-se de seguida à limpeza através de ultra-sons seguida de intensa lavagem com água. Finalmente o estado de limpeza foi verificado através da obtenção dum voltamograma cíclico do eléctrodo em $HClO_4$ 0.1 M entre -0.4 e 1.5 V (vs. Ag/AgCl).

O electrólito de suporte foi Na_2SO_4 0.1 M. Nas medições foram utilizadas soluções desoxigenadas, tendo-se mantido uma corrente de N_2 sobre a superfície das soluções durante as medições.

As medições de voltametria cíclica foram efectuadas com um potenciostato Solartron 1287. Nas medições de impedância o potenciostato foi ligado a um analisador da resposta de frequência (FRA) também de marca Solartron (modelo 1250).
As medições de espectroscopia de impedância electroquímica foram efectuadas entre 15 kHz e 100 mHz (10 pontos por década) usando uma perturbação sinusoidal com 10 mV de amplitude em torno do potencial formal do sistema, 0.160 mV. Este potencial foi tomado como o valor médio entre os potenciais dos picos catódico e anódico, para a reacção no eléctrodo de Au não modificado.

Foi verificado que para os filmes mais espessos são necessários diversos varrimentos até que se obtenha um CV estável. Este fenómeno já foi referido na literatura[3] e pode ser atribuído ao inchamento dos filmes por penetração do electrólito de suporte, isto é, o filme está evoluindo duma situação em que a compensação de carga é essencialmente intrínsica, para uma em que existe compensação extrínseca (capítulo 1).

Para cada filme as experiências foram conduzidas de forma que a medição da resposta de frequência foi feita imediatamente a seguir à voltametria cíclica.

5.8 Bibliografia

(1) (a) Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B.; Möhwald, H. *Langmuir* **2003**, *19*, 2444-2448. (b) Nicol, E.; Habib-Jiwan, J.-L.; Jonas, A. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 6178-6186.

(2) Han, S.; Lindholm-Sethson, B. *Electrochim. Acta* **1999**, *45*, 845-853.

(3) Harris, J. J.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 2006-2013.

(4) Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *Langmuir* **2001**, *17*, 1110-1118.

(5) (a) Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *Langmuir* **2001**, *17*, 1184-1192. (b) Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4627-4636 (c) Rmaile, H. H.; Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B. *J. Phys. Chem B* **2003**, *107*, 14401-14406.

(6) (a) Jin W.; Toutianoush, A.; Tieke, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 2550-2553. (b) Leväsalmi, J.-M.; McCarthy, T. J. *Macromolecules*, **1997**, *30*, 1752-1757.(c) Rmaile, H. H.; Schlenoff, J. B. *J. Am. Chem. Soc.***2003**, *125*, 6602-6603.

(7) Shi, X.; Caruso, F. *Langmuir* **2001**, *17*, 2036-2042.

(8) Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3427-3433.

(9) (a) Krasemann, L.; Tieke, B. *Langmuir* **2000**, *16*, 287-290. (b) Lebedev, K.; Ramírez, P.; Mafé, S.; Pellicer, J. *Langmuir* **2000**, *16*, 9941-9943.

(10) (a) Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237. (b) Arys, X.; Fischer, P.; Jonas, A. M.; Koetse, M. M.; Laschewsky, A.; Legras, R.; Wischerhoff, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1858-1865.

(11) (a) Geshi, T.; Tokuda, K.; Matsuda, H. *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *89*, 247-260. (b) Geshi, T.; Tokuda, K.; Matsuda, H. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 29-38. (c) Tokuda, K.; Geshi, T.; Matsuda, H. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *102*, 41-48. (d) Amatore, C.; Savéant, J. M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *147*, 39-51. (e) Finklea, H. O.; Snider, D. A.; Fedyk, J.; Sabatani, E.; Gafni, Y.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 3660-3667. (f) Brookes, B. A.; Davies, T. J.; Fisher, A. C.; Evans, R. G.; Wilkins, S. J.; Yunus, K.; Wadhawan, J. D.; Compton, R. G. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1616-1627.

(12) Hubrecht, J.; Embrechts, M.; Bogaerts, W. *Electrochim.Acta* **1993**, *38*, 1867-1875.

(13) (a) Diao, P.; Guo, M.; Tong, R. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *495*, 98-105. (b) Protsailo, L. V.; Fawcett, W. R. *Langmuir* **2002**, *18*, 8933-8941.

(14) Luyben, W. L. *Process Modeling, Simulation and Control for Chemical Engineers* 2ª ed.; McGraw-Hill: Nova Iorque, 1989; Cap. 12.

(15) Coughanowr, D. R. *Process Systems Analysis and Control* 2ª ed.; McGraw-Hill: Nova Iorque, 1991.

(16) Seborg, D. E.; Edgar, T. F.; Mellichamp, D. A. *Process Dynamics and Control*; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1989; Cap. 4.

(17) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods*; John Wiley & Sons: Nova Iorque 1980.

(18) Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A. *Electroquímica, princípios, métodos e aplicações*; Almedina: Coimbra 1996.

(19) Girault, H. H. *Electrochimie physique et analytique*; Presses polytechniques et universitaires romandes: Lausanne, 2001.

(20) Gabrielli, C. *Identification of Electrochemical Processes by Frequency Response Analysis, tecnhical report number 004/83* ; Solartron Instruments: Hampshire, 1980.

(21) Sluyters-Rehbach, M. ; Sluyters, J. H. em *Comprehensive Treatise of Electrochemistry, Vol. 9, Cap. 4* ; editores J. O'M. Bockris, B. E. Conway e Sarangapani ; Plenum Press : Nova Iorque, 1984.

(22) Takehara, K.; Takemura, H.; Ide, Y. *Electrochim. Acta*, **1994**, *39*, 817-822.

(23) (a) Shiratori, S. S.; Rubner, M. F.; *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213-4219. (b) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3736-3740. (c) Voigt, U.; Jaeger, W.; Findenegg, G. H.; Klitzing, R. v. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5273-5280. (d) Kim, B. Y.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 94-99.

(24) Kotov, N. A. *Nanostruc. Mater.* **1999**, *12*, 789-796.

(25) Liu, Y.; Zhao, M.; Bergbreiter, D. E.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8720-8721.

(26) (a) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3568. (b) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.

(27) Che, G.; Li, Z.; Zhang, H.; Cabrera, C. R. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *453*, 9-17.

(28) Sabatani, E.; Cohen-Boulakia, J.; Bruening, M.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 2974-2981.

(29) Sabatani, E.; Rubinstein, I. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6663-6669

(30) Amirudin, A.; Thierry, D. *Prog. Org. Coat.* **1995**, *26*, 1-28.

(31) Harris, J. J.; DeRose, P. M.; Bruening, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1978-1979.

(32) Boubour, E.; Lennox, R. B. *Langmuir* **2000**, *16*, 7464-7470.

(33) Durstock, M. F.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2001**, *17*, 7865-7872

(34) (a) Picart C.; Lavalle, Ph.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414-7424. (b) Lavalle, Ph.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 4458-4465.

(35) Ladam, G.; Schaad, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G.; Cuisinier, F. *Langmuir* **2000**, 1249-1255.

(36) Dai, J.; Balachandra, A. M.; Lee, J. I.; Bruening, M. L. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3164-3170.



Departamento de Química
FCUP