

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

Pedro Henrique Benites Aoki

**FILMES NANOESTRUTURADOS DE FOSFOLIPÍDIOS COMO SISTEMAS
MIMÉTICOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA PARA APLICAÇÃO EM
SENSORES VIA SERS E ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA**

Presidente Prudente

2011

Pedro Henrique Benites Aoki

**FILMES NANOESTRUTURADOS DE FOSFOLIPÍDIOS COMO SISTEMAS
MIMÉTICOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA PARA APLICAÇÃO EM
SENSORES VIA SERS E ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA**

**Dissertação apresentada como
requisito à obtenção do título de
Mestre à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Materiais,
sob a orientação do Prof. Dr. Carlos
José Leopoldo Constantino.**

Presidente Prudente

2011

Aoki, Pedro Henrique Benites.

Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via SERS e espectroscopia de impedância / Pedro Henrique Benites Aoki, 2011.

167 f.: il.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Presidente Prudente, 2011.

1. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. 2. Filmes layer-by-layer. 3. Fosfolipídios. 4. Azul de metileno. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 15 dias do mês de fevereiro do ano de 2011, às 10:00 horas, no(a) Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIS VICENTE DE ANDRADE SCALVI do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA do(a) Departamento de Física / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Profa. Dra. PAOLA CORIO do(a) Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI, intitulado "FILMES NANOESTRUTURADOS DE FOSFOLIPÍDIOS COMO SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA PARA APLICAÇÃO EM SENSORES VIA SERS E ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: A P R O V A D O . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIS VICENTE DE ANDRADE SCALVI

Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA

Profa. Dra. PAOLA CORIO

Dedico esse trabalho a você minha Mãe, meu Pai e minha Irmã. Estou certo de que sem o apoio incondicional de vocês não conseguiria.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Pedro e Marinês, e minha irmã Natália, pela base sólida que me deram, por todo incentivo, paciência, carinho e compreensão.

À meu orientador Casé com quem pude construir uma grande amizade ao longo destes quase cinco anos de iniciação científica e mestrado, além de todos os ensinamentos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao prof. Wilker com quem tive a oportunidade de aprender muito dentro do lab, quando eu ainda nem sabia direito o que era uma “cuba”. Ao Totó que me trouxe para o grupo, pelos ensinamentos e exemplo de humildade/simplicidade. Ao prof. Eloi, meu co-orientador.

Aos professores do DFQB e POSMAT.

Aos amigos do grupo “NOIX”, Diogão, Priscila, Leonardo, João, Gabriel entre outros igualmente importantes pelos cafés, churrascos, discussões e convivência diária.

À “família” balão mágico: Caito, Da Pontinha e Deuber que me receberam de braços abertos quando precisei, mesmo sem me conhecerem muito bem. Julião que está voltando agora e já virou parceiro. Diogão: amigo/companheiro de trabalho....irmão! foi quem me deu a oportunidade de conhecer todos esses caras sensacionais e feito amizades que carregarei para sempre.

À você Bina.....amiga, companheira, colega.... a pessoa que me apóia e me faz mudar de idéia quando me canso de tudo e quero chutar o balde. Enfim, a pessoa que está sempre trazendo alegria a minha vida!

À FAPESP pelo suporte financeiro.

*"Sabedoria é saber o que fazer;
habilidade é saber como fazer;
virtude é fazer."*

David Starr Jordan

AOKI, P. H. B. **Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via sers e espectroscopia de impedância.** 2011. 167f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2011.

RESUMO

A presente dissertação de mestrado trata da fabricação de filmes ultrafinos (nanômetros de espessura) de fosfolipídios aniônicos (DPPG e CLP) e zwitteriônicos (DPPC e DOPC) utilizando as técnicas *layer-by-layer* (LbL) e Langmuir-Blodgett (LB), possibilitando assim a obtenção de filmes com diferentes arquiteturas moleculares. O objetivo principal foi explorar a aplicação destas diferentes arquiteturas moleculares na detecção do fármaco fenotiazínico azul de metileno (AM) em soluções diluídas. O crescimento linear, camada por camada, desses filmes foi verificado e monitorado por espectroscopia de absorção no UV-Vis. Verificou-se por FTIR que o crescimento dos filmes LbL e LB é determinado por interações eletrostáticas entre os fosfolipídios e o polieletrólito catiônico PAH utilizado como camada de suporte, favorecendo o crescimento dos filmes com fosfolipídios aniônicos. A morfologia foi analisada através de microscopias ópticas, AFM e MEV, revelando que os fosfolipídios estruturam-se como vesículas nos filmes LbL e monocamadas nos filmes LB. Filmes LbL e LB de fosfolipídios com diferentes espessuras foram então depositados sobre eletrodos interdigitados de Pt formando unidades sensoriais que foram aplicadas na detecção de AM via espectroscopia de impedância. Os resultados mostraram que as diferentes arquiteturas moleculares dos filmes LbL e LB levam a respostas elétricas distintas e permitem a detecção de AM em concentrações de nanomolar. A técnica SERS foi utilizada para obter informações estruturais do sistema AM/fosfolipídios nos níveis de diluição alcançados via espectroscopia de impedância. Para tanto, monocamadas LB foram depositadas sobre filmes evaporados com 6 nm de Ag e nanopartículas de Ag foram dispersas no interior dos filmes LbL. A presença da Ag na forma de nanopartículas em ambos os casos permitiu a obtenção de espectros SERRS do AM, possibilitando sua detecção em níveis elevados de diluição, inclusive se aproximando

do regime de uma única molécula, e a distinção do arranjo molecular assumido pelo AM (monômeros ou agregados) quando disperso na matriz de fosfolípido.

Palavras-chave: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett, filmes *layer-by-layer*, fosfolípidos, azul de metileno, espectroscopia de impedância, SERS.

AOKI, P. H. B. **Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via sers e espectroscopia de impedância.** 2011. 167f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2011.

ABSTRACT

Thin films of anionic (DPPG and CLP) and zwitterionic (DPPC and DOPC) phospholipids with different molecular architectures were fabricated using the layer-by-layer (LbL) and Langmuir-Blodgett (LB) techniques. The main goal of this work was to explore the application of these distinct molecular architectures in the detection of high diluted solutions of methylene blue (MB), a phenothiazine derivative drug. The linear growth, layer by layer, of these films was verified and monitored by UV-Vis absorption spectroscopy. It was found by FTIR that electrostatic interactions among the phospholipids and the supporting layer of PAH (cationic electrolyte) are the main driving force allowing the growth of the LbL and LB films, which favors the growth of the cationic phospholipids. The morphology was analyzed through optical microscopy, AFM and SEM, revealing that the phospholipids are structured as vesicles in the LbL films and as monolayers in the LB films. Different thickness of LbL and LB films containing phospholipids were deposited onto Pt interdigitated electrodes forming sensing units applied in the detection of MB using impedance spectroscopy. The results showed that the different molecular architectures of the LbL and LB films take to different electrical responses and allow the MB detection in concentrations of nanomolar. The SERS technique was applied to obtain structural information of the system MB/phospholipids at the dilution levels reached via impedance spectroscopy. Then, LB monolayers were deposited onto 6 nm of Ag evaporated films with and Ag nanoparticles were dispersed within the LbL films. The presence of Ag forming nanoparticles in both cases played a key role in achieving the MB SERRS signal allowing obtaining the detection in high dilution levels, approaching to single molecule, and distinguishing the MB molecular arrangements (monomers or aggregates) in the phospholipid matrix.

Keywords: Langmuir and Langmuir-Blodgett films, layer-by-layer films, phospholipids, methylene blue, impedance spectroscopy, SERS.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.....	15
Capítulo I-Introdução e conceitos teóricos	19
1.1. Sistemas miméticos de membrana biológica.....	20
1.2. Filmes de Langmuir.....	22
1.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	28
1.4. Filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL).....	32
1.5. Espectroscopias vibracionais: absorção no infravermelho e espalhamento Raman ...	33
1.6. Fenômenos de amplificação em superfície (<i>surface-enhanced phenomena</i>)	39
1.7. Espectroscopia de absorção eletrônica	44
1.8. Microscopia de força atômica (AFM)	45
1.9. Espectroscopia de impedância.....	47
Capítulo II-Procedimentos experimentais	50
2.1. Materiais	51
2.2. Filmes de Langmuir.....	52
2.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	53
2.3.1. <i>Mono e multicamadas LB</i>	53
2.3.2. <i>Filmes LB para detecção de uma única molécula</i>	54
2.4. Soluções e filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL).....	55
2.5. Caracterização dos filmes finos.....	57
Capítulo III-Crescimento e caracterização dos filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL) e Langmuir-Blodgett (LB) de fosfolipídios	59
3.1. Filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL).....	60
3.1.1. <i>Crescimento dos filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/DPPC e PAH/CLP</i>	60
3.1.2. <i>Análise morfológica dos filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/DPPC e PAH/CLP</i>	65
3.1.3. <i>Incorporação de AgNP aos filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/CLP</i>	69
3.2. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)	73
3.2.1. <i>Filmes de Langmuir de DPPG</i>	73
3.2.2. <i>Crescimento dos Filmes LB de (DPPG+PAH)</i>	75
Capítulo IV-Aplicação dos filmes Langmuir-Blodgett (LB) e <i>layer-by-layer</i> (LbL) como unidades sensoriais na detecção do fármaco azul de metileno (AM).....	79
4.1. Espectroscopia de impedância.....	80
4.1.1. <i>Unidades sensoriais formadas por filmes LB e LbL de DPPG e DPPC</i>	81

4.1.2. Unidades sensoriais formadas por filmes LB e LbL de (DPPG+PAH) com diferentes espessuras.....	86
4.1.2. Unidades sensoriais formadas por filmes LbL de DPPG e CLP com e sem AgNP	90
4.2. SERRS aplicado a análise das unidades sensoriais	93
4.3. Detecção de uma única molécula (SMD)	101
4.3.1. Detecção de uma única molécula de AM em solução	101
4.3.2. Detecção de uma única molécula de AM em filmes LB	104
Capítulo V-Estudo da interação entre fosfolipídios e o fármaco azul de metileno (AM)	110
5.1. Filmes de Langmuir fabricados com e sem a presença de AM	111
5.2. Estudo da interação entre os fosfolipídios e o fármaco AM em filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL).....	114
5.2.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	114
5.2.2. Morfologia.....	116
5.2.3. Cálculos teóricos Raman e FTIR para o AM.....	122
5.2.4. Análise de interação via FTIR	126
5.2.5. Micro-Raman e SERRS	129
5.3. Estudo da interação entre fosfolipídios e azul de metileno (AM) em filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	134
Capítulo VI-Conclusões	137
Capítulo VII-Considerações finais e perspectivas	142
Referências	150

Lista de figuras

- Figura 1:** ilustração de uma membrana celular (modelo de mosaico fluído). 21
- Figura 2:** ilustração de uma isoterma π -A mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até o seu colapso. O *detalhe* mostra um modelo de uma molécula anfifílica. 23
- Figura 3:** ilustração da placa do sensor de Wilhelmy..... 25
- Figura 4:** forças atuando sobre a placa do sensor de Wilhelmy. 26
- Figura 5:** curvas da transferência acumulada, *transfer* e pressão de superfície, que são parâmetros envolvidos na fabricação de um filme LB. 29
- Figura 6:** ilustração dos tipos de deposição dos filmes Langmuir-Blodgett (LB). 32
- Figura 7:** ilustração do espectro eletromagnético..... 34
- Figura 8:** diagrama de energia mostrando diferentes transições de uma molécula para um modelo considerando dois estados eletrônicos de energia. 36
- Figura 9:** espalhamentos Raman Stokes, Raman anti-Stokes e Rayleigh quando incidisse radiação eletromagnética sobre uma molécula alvo..... 38
- Figura 10:** (a) imagem de MEV do filme evaporado de Ag com 6 nm de espessura. (b) Espectro de absorção UV-Vis para solução de AM a 0,01 mM e para o filme evaporado de Ag. Os vetores indicam as linhas de laser utilizadas na escala do visível para ativar o efeito SERS. 41
- Figura 11:** ilustração mostrando (a) o momento de dipolo da molécula (p_1) induzido pelo laser incidente no espalhamento Raman; (b) E_{Local} ao redor das nanopartículas metálicas composto pelo campo elétrico do laser incidente (E_{Laser}) e das nanopartículas (E_p); (c) efeito SERS - a molécula colocada sobre a superfície metálica é polarizada por E_{Local} induzindo o dipolo molecular (p_1), cuja radiação do campo elétrico também pode polarizar o metal, induzindo um dipolo nas nanopartículas metálicas (p_2) que oscila com a mesma frequência de (p_1). 42
- Figura 12:** ilustração de uma partícula esférica de metal com o campo elétrico local (E_{Local}) estabelecido no seu entorno e que está na origem do efeito SERS. 43
- Figura 13:** ilustração de um microscópio de força atômica (AFM). 46
- Figura 14:** (a) circuito equivalente de um eletrodo metálico coberto com material fracamente condutor imerso em um eletrólito. (b) Curvas teóricas de capacitância ($^{\circ}$) e perda dielétrica ($*$) para o circuito equivalente ilustrado em (a). 48
- Figura 15:** estrutura molecular dos fosfolipídios aniônicos (CLP e DPPG) e zwitteriônicos (DOPC e DPPC), do azul de metileno (AM) e do polieletrólito PAH.... 52
- Figura 16:** espectros de absorção UV-Vis para os filmes LbL de (a) PAH/DPPG e (b) PAH/DPPC. *Detalhe A:* cinética de crescimento para ambos os filmes. *Detalhe B:*

dependência linear da absorbância em 200 nm em função do número de bicamadas depositadas para ambos os filmes..... 60

Figura 17: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme LbL de PAH/CLP. *Detalhe:* dependência linear da absorbância em 230 nm em função do número de bicamadas depositadas. (b) Ilustração dos filmes LbL contendo PAH/fosfolipídios onde o DPPG, DPPC ou CLP se encontram na forma de vesículas multilamelares (MLV)..... 61

Figura 18: espectros FTIR para os filmes *cast* de CLP e PAH e para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP. Os detalhes mostram os espectros FTIR a baixos e elevados números de onda..... 63

Figura 19: (a) imagem óptica em 2 e 3 dimensões para 21 bicamadas LbL de PAH/DPPG. (b) Imagem topográfica de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas LbL de PAH/DPPG. O *detalhe* exibe um histograma com a distribuição de alturas para uma área de 2 μm x 2 μm 65

Figura 20: (a) imagem óptica em 2 e 3 dimensões para 13 bicamadas LbL de PAH/DPPC. (b) Imagem topográfica de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas LbL de PAH/DPPC. O *detalhe* exibe um histograma com a distribuição de alturas coletadas para uma área de 2 μm x 2 μm 66

Figura 21: imagem óptica em 2 e 3 dimensões para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP..... 68

Figura 22: (a) espectros de absorção UV-Vis para solução aquosa de colóide de Ag e colóide de Ag contendo DPPG ou CLP. (b) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/AgNP, PAH/(DPPG+AgNP) e PAH/(CLP+AgNP). . 70

Figura 23: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/AgNP. Os *detalhes* mostram a dependência linear da absorbância em 397 nm em função do número de bicamadas depositadas e a imagem óptica para o filme LbL com 10 bicamadas de PAH/AgNP. (b) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/(DPPG+AgNP). Os *detalhes* mostram a dependência linear da absorbância em 424 nm em função do número de bicamadas depositadas, a imagem óptica para o filme LbL com 10 bicamadas de PAH/(DPPG+AgNP) e uma ilustração das vesículas multilamelares de DPPG (MLV). (c) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/(CLP+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 424 nm em função do número de bicamadas depositadas. (d) Imagem de MEV para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/(CLP+AgNP). O *detalhe* mostra as AgNP..... 71

Figura 24: isotermas π -A de DPPG obtidas para subfase de água contendo diferentes concentrações de PAH. *Detalhe:* ilustração do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água contendo PAH dissolvido na subfase. 74

Figura 25: espectros de absorção UV-Vis para filmes LB com diferentes números de camadas de DPPG transferidos sobre um substrato de quartzo com subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH. *Detalhe:* absorbância em 200 nm em função do número de camadas depositadas. 76

Figura 26: espectro FTIR do filme LB contendo 17 camadas de DPPG transferidas para um substrato de ZnSe com o subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH. <i>Detalhe:</i> ilustração do filme LB contendo DPPG e PAH. Os espectros FTIR dos filmes <i>cast</i> de PAH e DPPG são dados como referências.	77
Figura 27: (a) espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para seis sensores de Pt imersos em água ultrapura. (b) Estabilidade temporal para um dos seis eletrodos de Pt quando imerso em água ultrapura.	81
Figura 28: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais formadas por monocamadas LB de DPPG e DPPC e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG imersas em água ultrapura antes e depois da imersão em soluções de AM a 0,01 nM; 0,1 nM; 1,0 nM e 10,0 nM.	82
Figura 29: matriz utilizada na geração de um PCA a partir dos resultados de impedância da Figura 28.	84
Figura 30: PCA gerado para valores de capacitância em 1 kHz para as cinco unidades sensoriais da Figura 28 imersas em água ultrapura e soluções de AM.	84
Figura 31: PCAs gerados como o apresentado na Figura 30, porém desconsiderando os resultados da unidade sensorial formada pelo filme LbL de (a) PAH/DPPC e (b) PAH/DPPG.	85
Figura 32: (a–f) espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais eletrodo de Pt, 1 e 5 camadas LB de (DPPG+PAH), 1 camada LB de DPPG e 1 e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG imersas em água antes e depois da imersão em soluções de AM a 0,01 nM; 1,0 nM e 100 nM.	87
Figura 33: PCAs gerados para valores de capacitância a 10 kHz para as unidades sensoriais da Figura 32 - (a) todas as unidades sensoriais; (b) o mesmo de (a), mas excluindo uma das unidades sensoriais como destacado na própria figura.	89
Figura 34: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais eletrodo de Pt e 5 bicamadas LbL de PAH/CLP, PAH/DPPG, PAH/(CLP+AgNP) e PAH/(DPPG+AgNP) imersas em água ultrapura antes e depois da imersão em soluções de AM a 100 nM; 1 nM e 0,01 nM.	91
Figura 35: (a) PCA gerado para valores de capacitância a 1 kHz para as unidades sensoriais da Figura 34. (b) <i>Loadings</i> para PC1 vs PC2.	92
Figura 36: espectros RRS obtidos com laser em 633 nm para o filme LB contendo 5 camadas de (DPPG+PAH) depositadas sobre eletrodo interdigitado de Pt (a) antes e (b) depois da imersão nas soluções de AM utilizadas nas medidas sensoriais da Figura 32. <i>Detalhes</i> (a) e (b): imagens ópticas coletadas para a unidade sensorial antes e depois da imersão em soluções de AM, respectivamente.	93
Figura 37: ilustração do procedimento experimental utilizado para coletar espectros SERRS de AM diretamente das unidades sensoriais.	95
Figura 38: (a) imagem óptica e mapeamento Raman (superposto) coletados em uma área contendo um domínio micrométrico de AM para a unidade sensorial formada por 5	

bicamadas LbL de PAH/(CLP+AgNP). (b) Espectros SERRS de AM coletados na área exibida em (a). Laser em 633nm. 96

Figura 39: (a) imagem óptica e mapeamento Raman (superposto) em uma área que não contém domínios micrométricos de AM para a unidade sensorial formada por 5 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AgNP). (b) Espectros SERRS de AM coletados na área exibida em (a). Laser em 633 nm. 97

Figura 40: espectros SERRS e RRS coletados para as unidades sensoriais formadas por 5 bicamadas LbL de PAH/CLP e PAH/(CLP+AgNP) após a imersão em soluções de AM. Laser em 633 nm. 100

Figura 41: (a) espectro de absorção UV-Vis para solução de AM a 10^{-6} M e colóides de Ag. Também é exibido o espectro de fluorescência coletado para a mesma solução de AM utilizando laser em 633nm. 101

Figura 42: espectros SERS coletados para soluções de AM, diluídos diretamente em colóide de Ag, a concentrações de (a) 10^{-5} e 10^{-6} M; (b) $1,6 \times 10^{-10}$; $1,6 \times 10^{-11}$ e $1,6 \times 10^{-12}$ M (100, 10 e 1 molécula por pL). (c) Sequência de 100 espectros SERS, plotados em 3D, para a solução de AM a 10^{-5} M. (d) Sequência de 20 espectros (3D) coletados para a solução de AM a $1,6 \times 10^{-10}$ M. Laser em 514,5 nm. 103

Figura 43: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme PVD contendo 9 nm de Ag, além de espectros obtidos para monocamadas LB depositadas sobre quartzo para diferentes proporções moleculares de AM (AM:DPPG = 4:1, 1:1, 1:2, 1:5 moléculas). (b) Imagem de AFM para o filme PVD de 9 nm de Ag. 105

Figura 44: mapeamento Raman, área de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ e passo $3 \mu\text{m}$, obtido para a monocamada LB contendo AM disperso em matriz de DPPG a uma proporção molecular de 1:2 (AM:DPPG). Laser em 514,5 nm. 106

Figura 45: mapeamentos Raman para as monocamadas LB contendo 100, 10 e 1 molécula de AM/ μm^2 dispersa em matriz de DPPG. Foram analisadas áreas de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, com um passo de $3 \mu\text{m}$ levando a um total de 1.156 espectros. Laser em 514,5 nm. 108

Figura 46: (a) isotermas π -A de DOPC co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DOPC:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. (b) Isotermas π -A de DPPC co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DPPC:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. 111

Figura 47: (a) isotermas π -A de DPPG co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DPPG:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. (b) Isotermas π -A de CLP co-espalhado com AM (CLP:AM = 50:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. 113

Figura 48: espectros de absorção UV-Vis para diferentes números de bicamadas LbL contendo: (a) PAH/(DPPG+AM). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 580 nm em função das bicamadas depositadas; (b) PAH/(DPPG+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 431 nm em função das bicamadas depositadas; (c) PAH/(CLP+AM). O *detalhe* mostra a dependência linear da

absorbância em 610 nm em função das bicamadas depositadas e o *zoom* exibe a região de absorção do AM; (d) PAH/(CLP+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 425 nm em função das bicamadas depositadas e o *zoom* exibe a região de absorção do AM. 115

Figura 49: imagens de MEV com diferentes ampliações para os filmes LbL contendo 10 bicamadas de (a) PAH/DPPG, (b) PAH/(DPPG+AM) e (c) PAH/(DPPG+AM+AgNP). 117

Figura 50: imagens topográficas de AFM exibidas em 2 e 3 dimensões e seus histogramas com a distribuição das alturas registradas para (a) substrato de vidro tratado termicamente (2 horas a 600 °C) e 10 bicamadas LbL dos filmes de (b) PAH/DPPG, (c) PAH/(DPPG+AM) e (d) PAH/(DPPG+AgNP+AM). 119

Figura 51: imagem óptica para os filmes LbL com 14 bicamadas de (a) PAH/(CLP+AM) e (b) PAH/(CLP+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a imagem óptica do filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP. 121

Figura 52: estrutura molecular do AM e espectros Raman e FTIR de AM obtidos experimentalmente e por meio de cálculos teóricos (programa Gaussian, base DFT/6-31G). 123

Figura 53: espectros FTIR para filmes LbL com 14 bicamadas de (a) PAH/CLP e (b) PAH/(CLP+AM). O espectro FTIR para o filme *cast* de AM é dado como referência. 126

Figura 54: espectros FTIR para filmes LbL com 21 bicamadas de (a) PAH/DPPG e (b) PAH/(DPPG+AM). O espectro FTIR para o filme *cast* de AM é dado como referência. 128

Figura 55: espectro RRS coletado para as regiões de domínios moleculares do filme LbL com 10 bicamadas de PAH/(DPPG+AM). Também são exibidos mapeamentos Raman apresentando a distribuição espacial da banda em 1622 cm⁻¹ para os filmes LbL com 14 bicamadas de (b) PAH/(CLP+AM), (c) PAH/(CLP+AM+AgNP) e 21 bicamadas de (d) PAH/(DPPG+AM+AgNP). Laser em 633nm. 130

Figura 56: espectros Raman para dois filmes LbL contendo 1 tetracamada de PAH/AgNP/DPPG/AM e PAH/DPPG/AM/AgNP. Os *detalhes* mostram as arquiteturas moleculares de cada filme. Laser em 633nm. 132

Figura 57: (a) espectro RRS para 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) com 100% da potência nominal do laser em 633nm, além de espectros SERRS coletados para 1 e 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM+AgNP) com 1% da potência nominal. (b) Dois espectros SERRS distintos que se referem a diferentes arranjos moleculares do AM (monômeros e agregados). 133

Figura 58: (a) isotermas π -A de DPPG coletadas para subfase de água contendo PAH (0,01 mg/mL) ou AM (64x10⁻⁶ mg/mL). (b) Ilustração do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água com PAH e AM dissolvidos na subfase. (c) Espectros SERRS para o filme LB contendo 1 camada de DPPG transferida da subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH e 64x10⁻⁶ mg/mL de AM para um filme de Ag com 6 nm de espessura

(laser em 633nm). (d) Imagem óptica desta monocamada LB de onde espectros SERRS foram coletados ponto a ponto ao longo de uma linha de 100 μm . *Detalhe*: imagem de MEV mostrando as AgNP formadas pela evaporação de 6 nm de Ag sobre um substrato de vidro..... 135

Lista de tabelas

Tabela 1. Atribuições das principais bandas FTIR para os filmes <i>cast</i> de CLP e PAH.	63
Tabela 2. Rugosidade (RMS, do inglês <i>root mean square</i>) e altura média para os filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/DPPC e PAH/DPPG.....	67
Tabela 3. Rugosidade (RMS, do inglês <i>root mean square</i>) e altura média para o substrato de vidro e filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/DPPG, PAH/(DPPG+AM) e PAH/(DPPG+AgNP+AM).	120
Tabela 4. Atribuições e intensidades relativas (entre parênteses) para as bandas Raman do AM.....	124
Tabela 5. Atribuições e intensidades relativas (entre parênteses) para as bandas FTIR do AM.....	125

Lista de siglas

AM	azul de metileno
AFM	microscopia de força atômica
Ag	prata
AgNP	nanopartículas de prata
Au	ouro
AuNP	nanopartículas de ouro
BAM	microscópio de ângulo de Brewster
CLP	cardiolipina [1,3-Di (3- <i>sn</i> -Fosfatidil)- <i>sn</i> -glicerol]
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfocolina
DPPC	L- α -1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -3-Glicero-Fosfatidilcolina
DPPG	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -3-Glicero-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]
E	campo elétrico
EM	eletromagnético
FTIR	espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
GUVs	vesículas unilamelares gigantes
IV	infravermelho
LB	filmes Langmuir – Blodgett
LbL	filmes <i>layer-by-layer</i>
LSPR	ressonâncias localizadas de plasma de superfície
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MLV	vesículas multilamelares
PAH	poli(hidrocloreto de alilamina)
PCA	análise de componentes principais
PDT	terapia fotodinâmica
Pt	platina
PM-IRRAS	polarização modulada - espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho
PVD	deposição física a vácuo
RRS	espalhamento Raman ressonante
SERS	espalhamento Raman amplificado em superfície
SERRS	espalhamento Raman ressonante amplificado em superfície
SMD	detecção de uma única molécula
TR	taxa de transferência
ZnSe	seleneto de zinco

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O desenvolvimento e exploração de dispositivos analíticos para fins de detecção, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas têm proporcionado um crescimento significativo da área dos sensores e biossensores. Em nosso grupo de pesquisa temos obtido resultados em que unidades sensoriais contendo filmes Langmuir-Blodgett (LB) de diferentes materiais como polímeros condutores, corantes orgânicos e ligninas demonstraram um ótimo desempenho via espectroscopia de impedância na detecção de traços de analitos. Entre estes se destacam substâncias que simulam os paladares distinguidos pelos seres humanos (doce, salgado, azedo e amargo), inclusive abaixo do limite de detecção humana, a identificação de diferentes tipos de água (ultrapura, destilada, mineral, torneira), a detecção de pesticida e íons metálicos em água com concentrações da ordem de ppb, bem como na presença de substâncias fluoradas e cloradas.

Nesta dissertação de mestrado foram fabricados filmes *layer-by-layer* (LbL) e LB contendo fosfolipídios biológicos aplicados no sensoriamento de derivados fenotiazínicos. O desafio deste trabalho foi obter filmes finos de fosfolipídios, que vão além de mono ou bicamadas, fator limitante imposto pela técnica LB no caso dos fosfolipídios. A possibilidade de se fabricar filmes mais espessos é importante porque permite a caracterização destes filmes por uma gama maior de técnicas, o que é difícil no caso dos filmes LB pela concentração extremamente baixa de material nas mono ou bicamadas. Vencido o desafio inicial de se fabricar multicamadas LB e LbL de fosfolipídios, o objetivo seguinte foi investigar se as diferentes arquiteturas moleculares dos fosfolipídios nos filmes LB (monocamadas) e LbL (vesículas) influenciam no

desempenho de unidades sensoriais caracterizadas via espectroscopia de impedância quando tais filmes são os elementos transdutores de sinal. Os sistemas contendo droga e fosfolipídios, os quais são aplicados como sistemas miméticos de membranas biológicas e responsáveis pela alta sensibilidade das medidas elétricas, foram investigados via microscopia e espectroscopia (SERS em particular). O azul de metileno (AM), um derivado fenotiazínico, foi a substância alvo (analito) escolhida para o desenvolvimento deste projeto de mestrado. É conhecido que os fármacos fenotiazínicos têm grande afinidade pela membrana^{1,2,3}, porém, apesar do grande número de trabalhos nesta área, os estudos direcionados para o sensoriamento nestes sistemas ainda não são explorados utilizando a combinação das técnicas e materiais supracitados (filmes LbL e LB de fosfolipídios, espectroscopia de impedância e SERS). Além disso, o AM possui propriedades farmacológicas importantes e ótima seção de choque para os fenômenos Raman e SERS, conforme será discutido ao longo desta dissertação. Os resultados obtidos nesta dissertação têm permitido estender nossas linhas de pesquisa na busca por sensores mais específicos, simulando características interfaciais da membrana celular a ser incorporada com a droga.

Derivados fenotiazínicos são comumente utilizados na medicina como antipsicóticos e tranquilizantes, além de possuir propriedades antieméticas, sedativas e analgésicas^{4,5}. Recentemente, relatou-se a eficiência dos fármacos fenotiazínicos na inibição seletiva do mal de Alzheimer, assim como no tratamento do mal de Parkinson^{6,7}. Estas moléculas apresentam características físico-químicas importantes associadas a sua alta agregação e alteração das propriedades das biomembranas naturais e artificiais^{3,8,9}. Além disso, esses compostos também são aplicados na terapia fotodinâmica (PDT) para o tratamento de células tumorais, vírus e bactérias¹⁰. A PDT é baseada na foto-oxidação de biomoléculas promovida por uma droga sensibilizadora (no

caso os fenotiazínicos) ativada por irradiação luminosa em comprimentos de onda compatíveis com sua absorção, sendo a morte das células tumorais relacionada com a destruição de suas biomoléculas constituintes devido à geração *in situ* de espécies fotorreativas (fotoatividade).

Do ponto de vista analítico, a detecção e quantificação de compostos orgânicos, como os fenotiazínicos e os neurotransmissores, através de métodos de detecção seletivos voltado para o monitoramento clínico vem despertando grande interesse nas últimas décadas^{11,12,13}. Nesse sentido, a obtenção de concentrações terapêuticas ideais de droga presente no corpo humano e o controle de qualidade industrial mostram a importância do monitoramento da droga para a garantia de qualidade em preparações farmacêuticas. Apesar do desenvolvimento de diferentes métodos para a fabricação de sensores, incluindo o uso de eletrodos interdigitados recobertos com filmes finos de polímeros, enzimas e biomoléculas (DNA etc.), seu melhoramento e a busca de novos métodos de fabricação ainda representam um tópico importante de pesquisa.

Esta dissertação de mestrado está estruturada em sete capítulos. O capítulo I apresenta uma introdução mostrando a motivação para o trabalho usando sistemas miméticos de membrana biológica e os conceitos teóricos das técnicas de fabricação e de caracterização destes filmes ultrafinos. O capítulo II apresenta os procedimentos experimentais. A discussão dos resultados é realizada nos capítulos III, IV e V. O capítulo III aborda o estudo do crescimento dos filmes LB e LbL contendo multicamadas de fosfolipídios. No capítulo IV os filmes LB e LbL de fosfolipídios foram aplicados na forma de unidades sensoriais para a detecção do AM através de medidas de espectroscopia de impedância. Nesse capítulo ainda foi realizado uma análise específica via SERS do AM adsorvido nas unidades sensoriais chegando a níveis de detecção de uma única molécula. O capítulo V apresenta um estudo de

interação entre AM e fosfolípido, realizado através de filmes de Langmuir fabricados pelo co-espalhamento de ambos materiais. Essa análise também foi realizada a partir da caracterização de filmes LbL contendo AM inserido nas camadas de fosfolípidos. As conclusões são exibidas no capítulo VI. O capítulo VII traz algumas considerações finais e as perspectivas de trabalhos futuros.

Capítulo I

Introdução e conceitos teóricos

1.1. Sistemas miméticos de membrana biológica

Muitos processos fisiológicos nos sistemas celulares dependem das membranas biológicas, as quais são constituídas principalmente pelos lipídios (fosfolipídios ou diacilfosfoglicerídeos, glicolipídios, esfingolipídios e esteróis, como o colesterol, por exemplo), nas quais as proteínas, responsáveis pela sua funcionalização, estão associadas segundo o modelo do mosaico fluido¹⁴ exibido na Figura 1¹⁵. Em particular, as moléculas de fosfolipídios, auto-associadas na forma de bicamadas constituem o “citoesqueleto” das células e organelas subcelulares que definem suas fronteiras interna e externa, nas quais são mantidos os gradientes químicos importantes para o seu metabolismo e atividade. É também a primeira barreira *in vivo* na ligação e mediação da ação de diversos tipos de moléculas de atividade biológico-farmacológica^{5,16,17}. Dentre os tipos de lipídios que constituem as membranas biológicas, os fosfolipídios são encontrados em maior abundância nas membranas celulares dos mamíferos, sendo que as fosfatidilcolinas representam cerca de 50% da massa total dos fosfolipídios^{18,19}. Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas, possuindo em sua estrutura mais geral duas cadeias de hidrocarbonetos e uma terminação ou grupo cabeça-polar que inclui também um grupo fosfato²⁰.

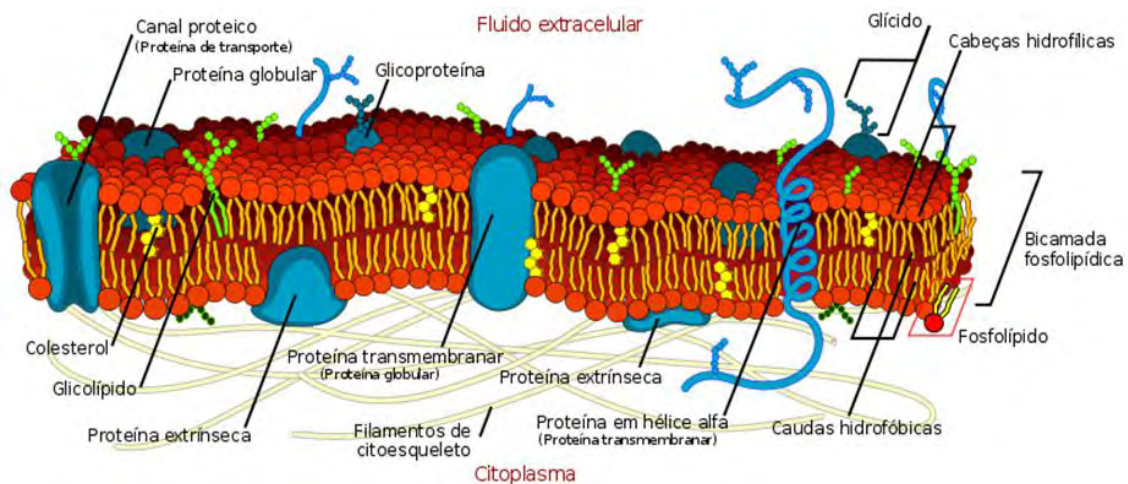


Figura 1: ilustração de uma membrana celular (modelo de mosaico fluído)¹⁵.

Estes sistemas biofísicos, os quais *in vivo* constituem as membranas de células e organelas, são extensivamente utilizados como modelos nos estudos do comportamento celular e processos associados às propriedades da membrana biológica, como reconhecimento molecular, catálise enzimática, transporte, adesão celular, fusão de membranas, e em estudos da interação com biomoléculas (proteínas, DNA, enzimas) ou moléculas de atividade biológica (fármacos)²¹⁻²⁴. Portanto, a dificuldade evidente em utilizar as membranas *in vivo* para investigações no nível molecular tem despertado um grande interesse nos modelos biomiméticos de membranas, como é o caso das monocamadas de Langmuir, filmes LB e vesículas unilamelares²⁵⁻³¹. Monocamadas de fosfolípidos formadas pela técnica de filmes de Langmuir, por ser considerado um modelo simplificado de biomembranas, vêm sendo bastante utilizadas para entender processos biológicos em nível molecular a partir de interações com determinadas classes de drogas, polissacarídeos, entre outros³²⁻³⁴. Desta forma, podem-se incorporar aos filmes finos substâncias de interesse (drogas), cuja interação com a membrana celular se faz necessário conhecer, simulando de maneira aproximada os sistemas simples de membrana biológica. O campo médico-farmacológico tem usufruído bastante desta técnica³⁵⁻³⁸, cuja combinação com técnicas de espectroscopia,

microscopia, análise térmica e/ou difração de raios-X pode levar a conclusões ainda mais aprofundadas da interação droga/membrana³⁹⁻⁴⁴.

1.2. Filmes de Langmuir

Uma película ultrafina e resistente (filme) pode se formar pelo espalhamento de uma gota de óleo na superfície da água. A primeira aplicação deste fenômeno, conhecido antes mesmo da era cristã, foi em uma antiga técnica de impressão japonesa chamada *suminagashi*⁴⁵. *Irving Langmuir*, trabalhando nos laboratórios da empresa *General Electric* (Estados Unidos) no início do século 20 reuniu dados experimentais e teóricos descrevendo importantes características e propriedades dos filmes monomoleculares. Tais estudos deram início à área de filmes de Langmuir^{46,47}. A fabricação de filmes ultrafinos monomoleculares e insolúveis em água exige a utilização de moléculas que apresentam um equilíbrio entre os grupos hidrofílico e hidrofóbico, para que assim estes filmes sejam formados na interface ar/água⁴⁸. Os grupos hidrofílicos permitem o espalhamento das moléculas na superfície da água, enquanto os grupos hidrofóbicos não permitem que as moléculas sejam imersas na água. Basicamente, uma solução contendo o material dissolvido em um solvente orgânico altamente volátil é espalhada sobre a subfase de água ultrapura (18,2 MΩ.cm) e, após a evaporação do solvente, as moléculas do material são comprimidas por barreiras móveis formando uma monocamada denominada filme de Langmuir. A caracterização básica dos filmes de Langmuir é realizada na forma de isotermas de pressão de superfície – área molecular média (π -A)⁴⁹. A pressão de superfície (π) é calculada pela diferença entre a tensão superficial da água pura (γ_0) e a tensão superficial da água pura + monocamada (γ), conforme exibido em (1).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

Três fases distintas caracterizam a compressão do filme: fase gasosa, na qual as moléculas não interagem entre si; fase líquida, em que as moléculas já apresentam uma interação, e a fase condensada, com as moléculas dispostas de forma condensada formando um filme de espessura monomolecular. Se o filme for comprimido além deste ponto, as moléculas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras provocando o colapso do filme, como ocorre para as moléculas tipicamente anfifílicas (Figura 2), ou fazê-la de modo mais organizado estruturando-se em multicamadas, como ocorre para moléculas mais complexas como ligninas⁵⁰⁻⁵² e polímeros⁵³. O arranjo regular das moléculas orientadas sobre a subfase é característica de compostos simples, como no caso dos ácidos graxos. Nos materiais com moléculas maiores e mais complexas, nem sempre as três fases podem ser identificadas de maneira bem distinta.

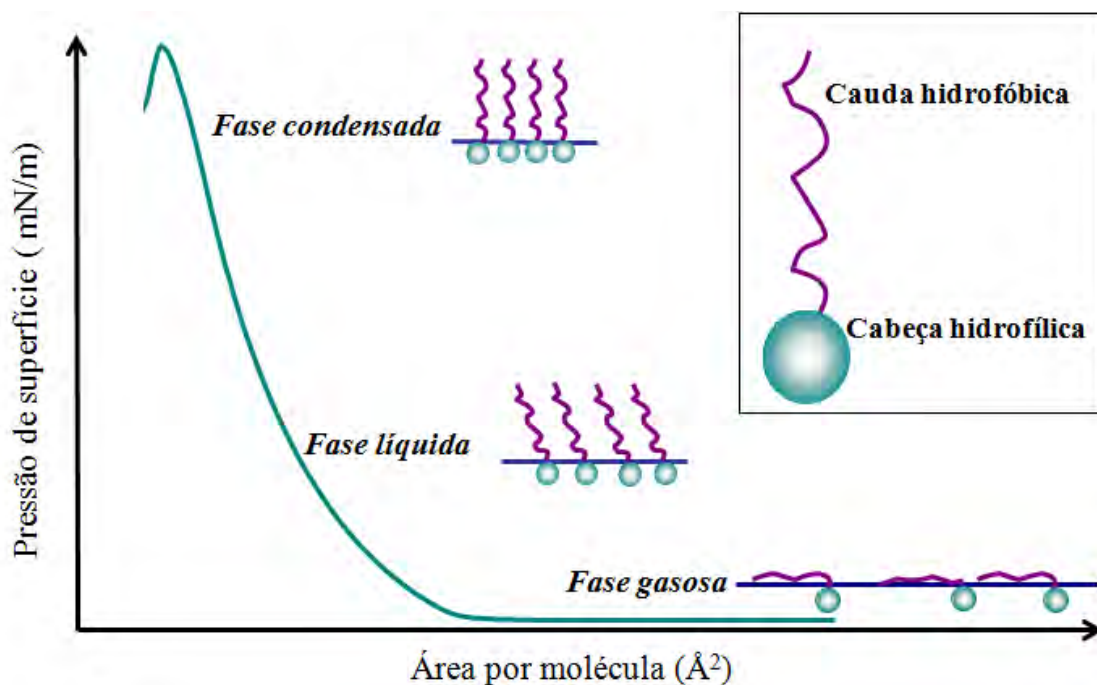


Figura 2: ilustração de uma isoterma π -A mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até o seu colapso. O *detalhe* mostra um modelo de uma molécula anfifílica.

Na fabricação destes filmes ultrafinos utiliza-se um sistema experimental conhecido como cuba de Langmuir, formada basicamente por uma cuba de teflon onde é vertida a subfase líquida, duas barreiras móveis para a compressão do filme com velocidade controlada, um sensor para determinar a pressão de superfície, uma prova de potencial para medida do potencial de superfície (opcional) e um braço mecânico empregado na transferência do filme para um substrato sólido (*dipper*). Atualmente outros equipamentos de medida como microscópio de ângulo de Brewster (BAM), elipsômetro e polarização modulada - espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho (PM-IRRAS) vem sendo acoplado a cuba, permitindo uma caracterização mais abrangente dos filmes de Langmuir. Estes filmes devem ser fabricados em um ambiente limpo e com temperatura controlada. As isotermas podem ser utilizadas para obter informações quanto à estruturação da monocamada. Durante a compressão, transições de fase também podem ser identificadas e relacionadas às reorientações moleculares. No caso da pressão de superfície, a medida apresenta variação na tensão superficial da água ultrapura pela presença da monocamada. Esse comportamento é descrito detalhadamente pelo método de Wilhelmy.

O método de Wilhelmy utilizado para medir a pressão superficial fornece um valor absoluto e possui uma sensibilidade de 5×10^{-3} mN/m. Devido a influência de flutuações da subfase ou deslocamentos de ar próximos ao sensor, variações da ordem de 0,5 mN/m são desprezadas. O sensor de Wilhelmy fica parcialmente imerso na subfase, suspenso por um fio muito fino e preso a uma eletrobalança. A Figura 3 mostra um desenho esquemático da placa de platina (ou papel de filtro) que compõe o sensor de Wilhelmy. Durante a compressão das moléculas na interface água/ar a pressão de superfície e a área molecular média são monitoradas continuamente. No método de Wilhelmy para a medida da pressão de superfície mede-se a variação na tensão

superficial da água em virtude da presença da monocamada. Em última análise mede-se a variação na força de tração que sustenta a placa de platina (ou papel de filtro) que está parcialmente imersa na subfase. À medida que a monocamada é formada, muda-se a tensão superficial da subfase (antes água pura, depois água pura + monocamada) e, conseqüentemente, muda-se a tração do fio. Esta variação na força de tração relaciona-se com a variação na tensão superficial da subfase e com a geometria da placa. O tratamento físico deste problema é apresentado abaixo.

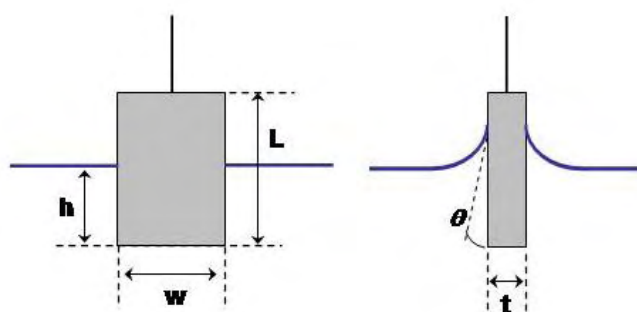


Figura 3: ilustração da placa do sensor de Wilhelmy.

O sensor de Wilhelmy normalmente contém uma placa de espessura muito pequena (décimos de milímetros) que é mantida parcialmente imersa na subfase e ligada ao sensor propriamente dito por um fio bem fino e este sensor registra a tração no fio. As forças que agem sobre a placa são destacadas na Figura 4 e referem-se à gravidade (P) e à tensão superficial (T_s), forças descendentes, e ao empuxo (E) relacionado com o volume de água deslocado pela placa e a tração (T) sofrida pelo fio, forças ascendentes.



Figura 4: forças atuando sobre a placa do sensor de Wilhelmy.

Para uma placa retangular como a utilizada na cuba KSV 2000 determina-se a tração sofrida pelo fio com as equações descritas a seguir, sendo:

P_{placa} : peso da placa;

w : largura da placa;

L : altura da placa;

t : espessura da placa;

g : aceleração da gravidade;

ρ_{placa} : densidade da placa;

ρ_{liq} : densidade do líquido;

D : perímetro da placa;

θ : o ângulo de contato água/placa;

$V_{\text{liq,desl.}}$: volume do líquido deslocado;

V_{placa} : volume da placa;

h : altura da porção da placa que se encontra submersa;

γ_{liq} : tensão superficial do líquido.

Sabendo que:

$$E = \rho_{liq} \cdot g \cdot V_{liq.desl.} \quad \text{sendo } V_{liq.desl.} = w \cdot h \cdot t$$

$$P_{placa} = m_{placa} \cdot g \quad \text{sendo } m_{placa} = \rho_{placa} \cdot V_{placa} \quad \text{e } V_{placa} = w \cdot L \cdot t$$

$$T_s = \gamma_{liq} \cdot D \cdot \cos \theta$$

O ângulo θ é assumido como zero, pois quando o menisco da água toca a placa na Figura 3 forma-se uma curva bem acentuada, sendo que sua parte final (parte que está em contato direto com a placa) encontra-se tangenciando a placa. Diz-se que a subfase “molha” a placa do sensor. Sendo assim, tem-se:

$$T = P + T_s - E$$

$$T = g \cdot \rho_{placa} \cdot (w \cdot L \cdot t) + \gamma_{liq} \cdot 2(w + t) - \rho_{liq} \cdot g \cdot (w \cdot t \cdot h)$$

Como o peso da placa (P) e o empuxo (E) são forças constantes, pois são dependentes da massa da placa, aceleração da gravidade, densidade do líquido (água) e volume de água deslocado pela placa, então a variação da força de tração no filme com e sem a monocamada na subfase aquosa é dada por:

T_a : tração no fio para a placa parcialmente imersa na água pura

T_{a+m} : tração no fio para a placa parcialmente imersa na água pura + monocamada.

$$\Delta T = T_a - T_{a+m}$$

$$\Delta T = \gamma_0 2(w + t) - \gamma 2(w + t)$$

$$\Delta T = 2(w + t) \cdot (\gamma_a - \gamma)$$

$$\Delta \gamma = \frac{\Delta T}{2(w + t)}$$

Considerando a equação (1) obtemos: $\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma = \pi = \frac{\Delta T}{2(t+w)}$, ou seja, a

medida da pressão de superfície via sensor de Wilhelmy envolve a variação na tração do fio devido a presença da monocamada e da geometria da placa (basicamente a largura, uma vez que $w \gg t$).

1.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

A técnica de fabricação de filmes de Langmuir foi aperfeiçoada por sua assistente, Katharine Blodgett, na década de 30⁵⁴, permitindo dessa forma a deposição sucessiva de monocamadas sobre um mesmo substrato sólido. Em homenagem aos dois cientistas, tais filmes receberam o nome de filmes Langmuir-Blodgett (LB). As principais características dos filmes são a alta precisão de espessura, que pode ser controlada até a ordem de angstroms, o elevado ordenamento molecular e a uniformidade da superfície^{45,48}.

O aparato experimental utilizado na fabricação de filmes LB é o mesmo que para os filmes de Langmuir. Uma boa deposição depende da natureza das moléculas empregadas, da estabilidade do filme de Langmuir e dos parâmetros envolvidos no processo de deposição, tais como as velocidades do braço mecânico de imersão e retirada do substrato da subfase, a pressão para manter a monocamada no estado condensado e a própria rigidez da monocamada. O caráter hidrofóbico ou hidrofílico do substrato também é importante, pois a presença de um menisco orientado no mesmo sentido de movimento do substrato facilita a deposição. A garantia desta deposição de filmes é determinada a partir de quatro parâmetros que vão sendo registrados instantaneamente durante o experimento na tela do computador acoplado a cuba (Figura 5):

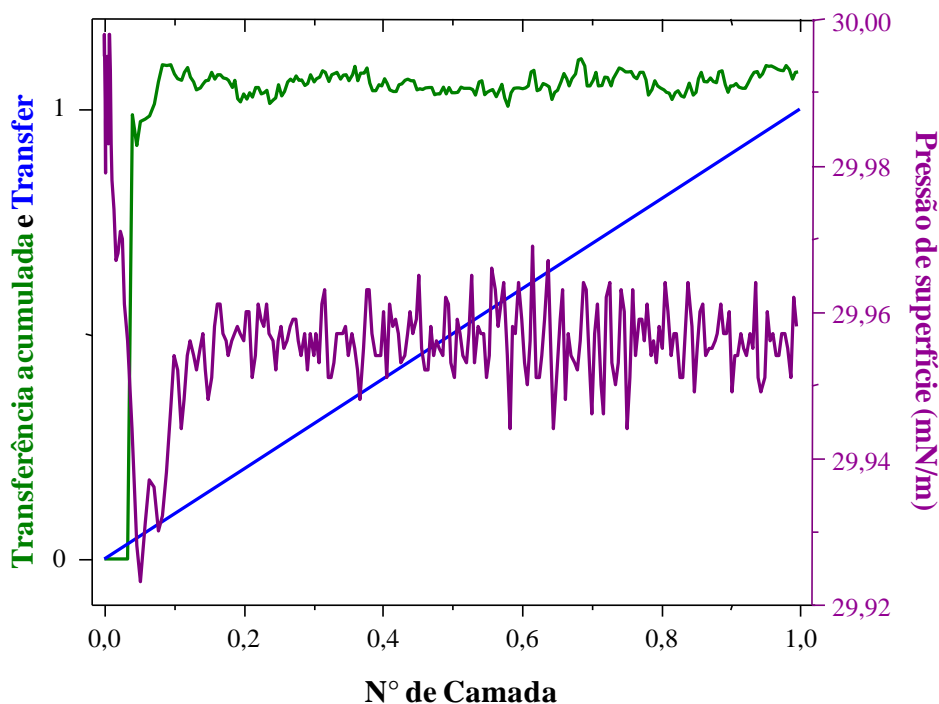


Figura 5: curvas da transferência acumulada, *transfer* e pressão de superfície, que são parâmetros envolvidos na fabricação de um filme LB.

- Pressão de superfície (π): deve manter-se constante durante a deposição (refere-se a um valor de pressão da fase condensada do filme de Langmuir). Isto faz com que as barreiras que comprimem o filme de Langmuir tenham que se mover ao longo da deposição para mantê-lo sempre na fase condensada com as moléculas empacotadas.

- Razão de transferência ou TR (do *inglês transfer ratio*): razão entre a área varrida pelas barreiras e a área de substrato utilizada na deposição. É esperado que o valor da TR seja próximo de 1 para uma boa deposição, ou seja, que todo filme retirado da superfície da água tenha sido transferido para o substrato. O movimento do braço mecânico responsável pela imersão e retirada do substrato da subfase é dividido em iguais intervalos de tempo determinados pelo pesquisador. A TR é dada pelo valor médio da transferência em cada intervalo e é calculada por um programa computacional durante a fabricação do filme LB. Apesar do gráfico ser apresentado na tela do computador ao longo da deposição, o valor médio só pode ser registrado ao final de

cada camada depositada, o que não permite ao pesquisador atuar durante a deposição para mantê-lo próximo do valor desejado. Porém, só o valor da TR não é suficiente para garantir uma transferência homogênea, pois pode-se depositar mais filme em uma determinada região do substrato e menos em outra, mas na média tem-se um valor de $TR \sim 1$. Portanto, outros parâmetros são acompanhados, como os descritos abaixo.

- Transferência acumulada (do inglês, *cumulative transfer*): também se dá pela razão entre área varrida pelas barreiras e a área de substrato utilizada na deposição. Porém, neste caso o cálculo é executado e apresentado na tela do computador em tempo real, permitindo ao pesquisador a possibilidade de mantê-lo próximo do valor unitário variando alguns parâmetros. A velocidade do braço mecânico é o parâmetro principal a ser otimizado: valores maiores tendem a induzir uma menor taxa de transferência e vice-versa. Porém, estas variações devem ser feitas de forma adequada, principalmente o aumento de velocidade, pois pode levar a uma queda irreversível da taxa de transferência e aí se perde a deposição e o experimento todo. Tão importante como saber quando e de quanto variar a velocidade do braço mecânico é iniciar a deposição com um valor de velocidade próximo do adequado, pois isto implicará em uma necessidade menor de se ajustar a velocidade do braço mecânico ao longo da deposição. Encontrado este valor, a tendência é diminuí-lo ao início de cada nova camada a ser depositada, principalmente para as 5 primeiras camadas. De modo geral, aqueles que iniciam na técnica LB elegem um valor de velocidade para imersão e retirada do substrato, o mantêm ao longo de toda deposição e atentam apenas para o valor de TR ao final de cada camada depositada. Isto pode até ser suficiente para as moléculas anfifílicas do tipo cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica tradicionalmente utilizadas, mas não o é para moléculas mais complexas.

- *Transfer*: está relacionado com a uniformidade do movimento das barreiras para manter a pressão constante e, por consequência, com a uniformidade da deposição, variando linearmente em uma escala arbitrária de 0 a 1 no caso ideal.

Uma variação de 0,5 mN/m na pressão de compressão do filme e de cerca de 10% para os demais parâmetros são indicativos de uma ótima deposição, ou seja, as monocamadas depositaram-se de forma homogênea sobre o substrato. Existem dois métodos para a deposição dos filmes LB, o horizontal e o vertical. O método horizontal, conhecido como Langmuir Schaefer^{55,56}, o substrato é abaixado até tocar a monocamada e em seguida suspenso, sendo mais utilizado na deposição de filmes muito rígidos. Na vertical o substrato é imerso na subfase e depois retirado, ou vice-versa, podendo-se modificar as formas de deposição dos filmes. Estas variações dependem do caráter hidrofóbico/hidrofílico do substrato em relação à sua imersão ou emersão.

É energeticamente favorável à deposição que o sentido do movimento do substrato seja o mesmo do menisco formado pela água no próprio substrato. Se o substrato for hidrofóbico o menisco será dirigido para baixo, favorecendo a deposição durante a imersão; caso o substrato seja hidrofílico o menisco será para cima, favorecendo a deposição durante a emersão. Podem-se obter, de acordo com a forma de deposição, três tipos de filmes LB, denominados filmes tipo X, Y ou Z (Figura 6). O tipo Y implica na deposição de uma camada a cada imersão e retirada do substrato. No tipo Z as camadas são depositadas somente nas retiradas do substrato, enquanto que no tipo X as camadas são depositadas somente nas imersões.

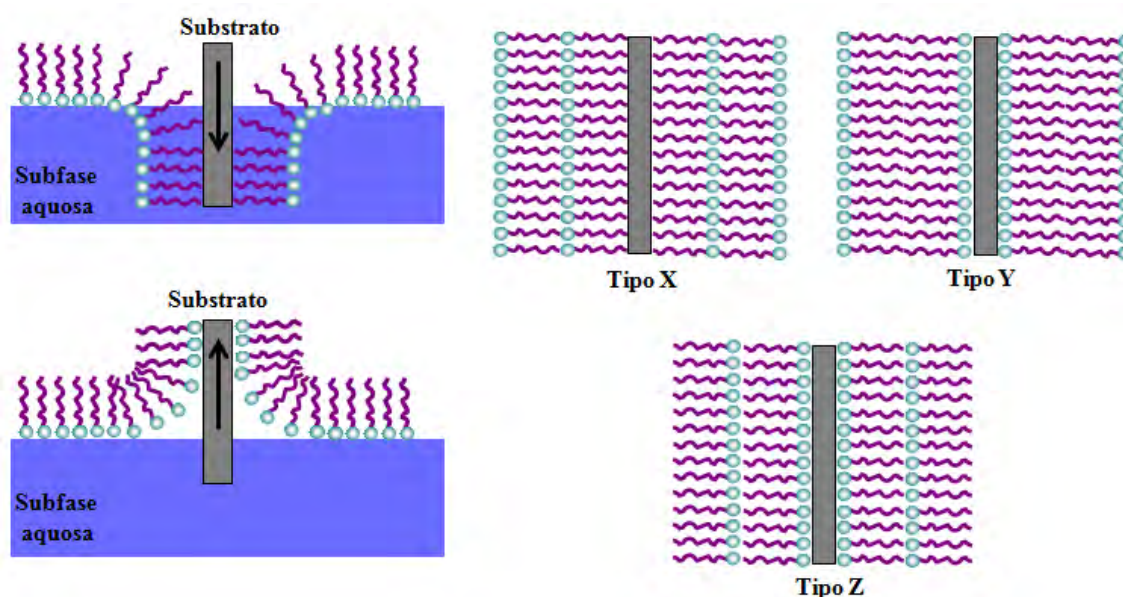


Figura 6: ilustração dos tipos de deposição dos filmes Langmuir-Blodgett (LB).

É na pesquisa básica que esta técnica de fabricação de filmes possui seu maior espectro de aplicações. Esse tema ficou claro na última conferência LB13, realizada em Quebec/CA (julho de 2010), onde a grande maioria dos trabalhos apresentava os filmes de Langmuir e LB para pesquisa básica e muito poucos para aplicações industriais. O crescente número de publicações abordando estudos de interações entre biomoléculas⁵⁷⁻⁶² visando a compreensão de processos biológicos em nível molecular também é exemplo disso. É evidente a sua contribuição no estudo e desenvolvimento de novos materiais orgânicos. Várias técnicas de caracterização, como espectroscopia (ultravioleta ou infravermelho, fluorescência, Raman, impedância), microscopia óptica, eletrônica ou de força atômica, entre outras, podem ser usadas nos estudos de filmes finos LB^{45,48}.

1.4. Filmes *layer-by-layer* (LbL)

Inicialmente proposto por Iler em 1966⁶³, o método de preparação de filmes LbL deve-se a interações eletrostáticas com adsorção alternada de partículas coloidais com cargas opostas. Duas décadas mais tarde, Sagiv e colaboradores propuseram um sistema

de multicamadas baseado em interações químicas, geralmente ligações covalentes, entre as camadas depositadas, utilizando o termo *self-assembly*⁶⁴. Já na década de 90, Decher e colaboradores⁶⁵ basearam-se na técnica de Iler, porém empregando moléculas contendo grupos iônicos como compostos anfífilos e polieletrólitos, sendo bem mais simples e geralmente denominada pelo termo LbL (*layer-by-layer*). A técnica LbL consiste na imersão de um substrato sólido numa solução aquosa contendo o material a ser adsorvido. Posteriormente, o conjunto é lavado a fim de eliminar o excesso de material, seco com ar comprimido ou nitrogênio e então imerso numa solução contendo um outro material, agora de carga contrária a do material inicialmente adsorvido. Dessa forma, formam-se os filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas⁶⁶. A grande maioria dos filmes LbL são fabricados desta forma, ou seja, utilizando materiais com cargas opostas em soluções aquosas para o crescimento de bicamadas por interações eletrostáticas. Porém, também existe a possibilidade de crescimento de filmes em meio não aquoso⁶⁷ por meio de interações químicas entre grupos específicos dos materiais a serem depositados, conforme reportado por Alessio *et al.*⁶⁸. A deposição de multicamadas dos filmes LbL pode ser realizada manual ou mecanicamente. Uma nova tendência na fabricação de filmes LbL vem sendo reportada, onde a deposição de camadas alternadas de materiais é feita por meio de *spray* (*spray-LbL*), possibilitando a obtenção de filmes com as mesmas propriedades de crescimento e morfologia em um tempo muito menor^{69,70}.

1.5. Espectroscopias vibracionais: absorção no infravermelho e espalhamento Raman

A partir do espectro da radiação eletromagnética pode-se denominar o mecanismo envolvido em cada técnica espectroscópica através da energia (que é proporcional à frequência) da radiação eletromagnética que irá interagir (absorvida,

espalhada ou emitida) com as moléculas⁷¹. A energia cinética das moléculas envolve mecanismos de translação da molécula em si, movimentação de seus elétrons, vibração de seus átomos e sua rotação⁷². Conseqüentemente, além das transições entre níveis eletrônicos, deve-se levar em consideração também às transições oriundas de vibrações e rotações, cujas energias envolvidas decrescem nesta seqüência. Geralmente energias de transições eletrônicas são da ordem de 10^0 eV, de vibrações moleculares da ordem de 10^{-2} eV e de rotação algo em torno de 10^{-5} eV⁷³. A Figura 7⁷⁴ ilustra todo o espectro eletromagnético e a região onde estão localizadas as radiações ultravioleta, visível e infravermelho.

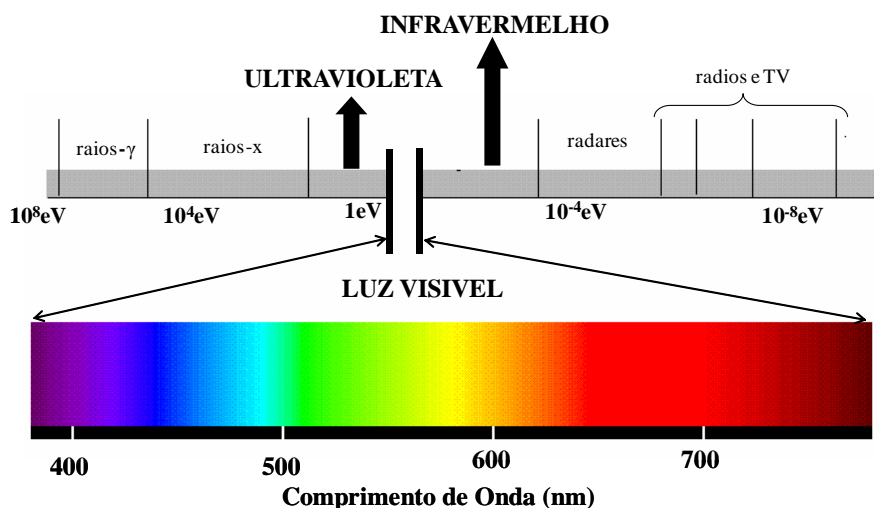


Figura 7: ilustração do espectro eletromagnético.

Quando as vibrações moleculares resultam em variações do momento de dipolo da molécula em consequência da alteração da distribuição eletrônica ao redor das ligações, podem-se induzir transições entre os níveis vibracionais⁷⁵. Isto é feito com a incidência de radiação eletromagnética com energia adequada, ou seja, energia da ordem daquela das vibrações moleculares. Neste caso, as energias associadas aos níveis vibracionais se encontram na região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético. Levando a discussão a uma descrição mais clássica, a equação (2)⁷⁶ apresenta as

diferentes contribuições à variação do momento de dipolo da molécula quando irradiada por uma onda eletromagnética com energia da região do IV⁷⁶. O primeiro termo (μ_0) refere-se ao momento de dipolo permanente, o segundo termo (primeira derivada em relação às coordenadas normais = μ') é o responsável pela absorção da radiação IV e o terceiro termo (segunda derivada em relação às coordenadas normais = μ'') é o responsável pela presença de frequências dobradas e combinações (*overtones* e *combinations*) no espectros de IV.

$$\mu = \mu_0 + \left. \frac{\partial \mu}{\partial Q} \right)_0 \delta Q + \left. \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mu}{\partial Q^2} \right)_0 \delta Q^2 + \dots \quad (2)$$

Complementarmente, a absorção da radiação IV pode ser também compreendida considerando as relações de ressonância entre as energias da radiação incidente e aquela necessitada pela molécula nos processos de absorção. A Figura 8⁷⁴ traz um diagrama de energia simplificado para dois estados eletrônicos (fundamental e excitado) de uma molécula com seus respectivos níveis vibracionais. Neste diagrama são apresentadas também as transições eletrônicas via absorção UV-Vis e relaxação via emissão de luz, cujos mecanismos são discutidos na seção 1.6, e transições vibracionais tanto via absorção IV como espalhamento Raman. Basicamente, na espectroscopia IV ocorre a absorção da radiação incidente quando a energia desta radiação corresponde à diferença de energia entre dois níveis vibracionais da molécula, ou seja, o efeito é ressonante sendo o modo vibracional acionado desde que ocorra uma variação do momento de dipolo na molécula pela radiação incidente.

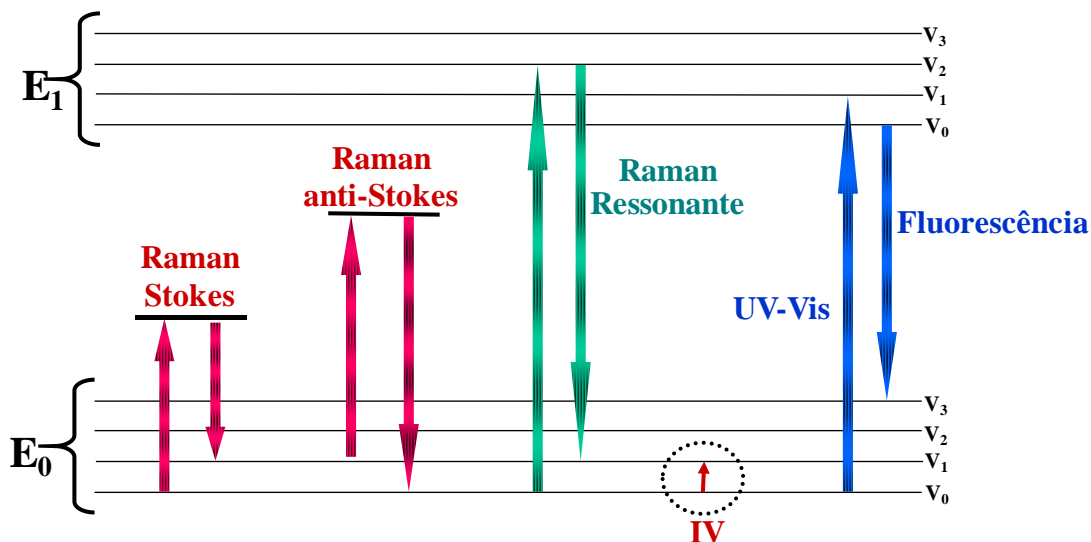


Figura 8: diagrama de energia mostrando diferentes transições de uma molécula para um modelo considerando dois estados eletrônicos de energia⁷⁴.

Basicamente, as vibrações moleculares são classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (estiramento) e de deformação angular (*bending*)⁷¹. As deformações de estiramento são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos enquanto as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre as ligações ou, como no modo de deformação assimétrica fora do plano, alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência. As deformações angulares podem ser divididas ainda em *scissoring*, *rocking*, *wagging* e *twisting*, cujas traduções são geralmente omitidas^{71,73}.

O espalhamento Raman é uma técnica complementar à espectroscopia de absorção IV na medida em que também se refere aos modos de vibração molecular, de forma que modos vibracionais que podem ser observados via absorção IV podem não ser via espalhamento Raman e vice-versa, o que é determinado pelas regras de seleção⁷⁷. Embora as técnicas de absorção IV e espalhamento Raman sejam complementares, ambas as técnicas espectroscópicas envolvem mecanismos físicos diferentes. No espalhamento Raman, a radiação incidente, geralmente no visível ou no

ultravioleta, é espalhada pela molécula com uma energia ligeiramente diferente da energia da radiação incidente, daí o espalhamento Raman ser conhecido também como espalhamento inelástico da luz⁷⁸. A diferença entre a radiação incidente e a radiação espalhada pela molécula está na região do IV e esta diferença é registrada pelo equipamento. Seguindo um modelo clássico e equacionado como utilizado anteriormente na descrição da absorção IV, o espalhamento Raman está intimamente relacionado com o momento de dipolo (p) induzido pela radiação incidente segundo o produto escalar⁷⁵:

$$p = \alpha \bullet E \quad (3)$$

sendo E o campo elétrico da radiação incidente e α a polarizabilidade molecular (as notações vetoriais e tensoriais são omitidas para simplificação). A polarizabilidade α é dada pela equação 4, em que o primeiro termo (α_0) refere-se à polarizabilidade permanente, o segundo termo (primeira derivada em relação às coordenadas normais = α') é o responsável pelo espalhamento Raman e o terceiro termo (segunda derivada em relação às coordenadas normais = α'') é o responsável pela presença de frequências dobradas e combinações (*overtones e combinations*) no espectros Raman^{75,79}.

$$\alpha = \alpha_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 \delta Q + \left. \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q^2} \right)_0 \delta Q^2 + \dots \quad (4)$$

Ainda no caso Raman, outra abordagem é que a incidência da radiação eletromagnética produz uma perturbação dependente do tempo, a qual se manifesta por um estado virtual de energia. Quando os estados estacionários final e inicial são os mesmos, diz-se que o efeito da perturbação é o espalhamento Rayleigh, para o qual as frequências das radiações incidente e espalhada são as mesmas. Quando a frequência da

radiação espalhada é maior que a da radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman anti-Stokes como resultado da transição da molécula para um estado de menor energia. No caso contrário, ou seja, quando a frequência da radiação espalhada é menor que a da radiação incidente tem-se o espalhamento Raman Stokes⁷⁸, como ilustrado na Figura 9⁷⁴.

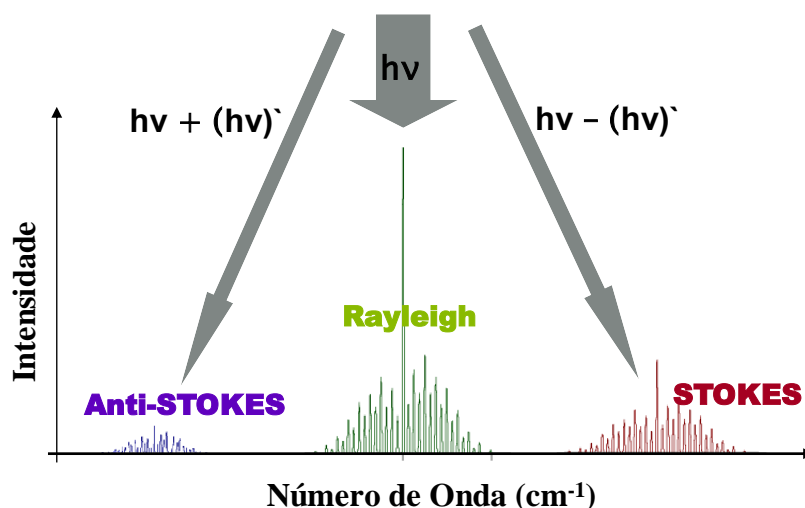


Figura 9: espalhamentos Raman Stokes, Raman anti-Stokes e Rayleigh quando incidir radiação eletromagnética sobre uma molécula alvo⁷⁴.

O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o Raman anti-Stokes à temperatura ambiente, pois sua probabilidade de ocorrer é maior, uma vez que ele se dá para as moléculas situadas no estado fundamental de energia (Figura 8). No caso Raman anti-Stokes, o espalhamento ocorre para moléculas situadas em um estado vibracional excitado (Figura 8), cuja população é menor que no estado fundamental à temperatura ambiente, daí sua probabilidade de ocorrer ser menor. Quando a energia da radiação incidente coincide com a necessária para uma transição eletrônica da molécula que espalha a luz (Figura 8), tem-se o espalhamento Raman ressonante (*resonance Raman scattering* - RRS), o qual aumenta fortemente a probabilidade de uma transição que resultará em um espalhamento Raman (aumenta a seção de choque do espalhamento Raman por um fator em torno de 10^6)⁷⁹. Já a intensidade do espalhamento Raman

depende da intensidade do laser (I_{laser}), da frequência do laser incidente (ν) e da polarizabilidade da molécula segundo a equação (5)^{75,77}:

$$I_{Raman} = I_{laser} \cdot \nu_{laser}^4 \cdot \alpha^2. \quad (5)$$

1.6. Fenômenos de amplificação em superfície (*surface-enhanced phenomena*)

As nanopartículas⁸⁰⁻⁸² metálicas vêm sendo extensivamente investigadas por suas propriedades catalíticas⁸³, biológicas⁸⁴ e sensoriais⁸⁵. Em particular, nanoestruturas de Ag e Au podem sustentar na região visível do espectro eletromagnético as chamadas ressonâncias localizadas de plasma de superfície (*localized surface plasmon resonances* - *LSPR*) que é a base para a espectroscopia amplificada por plasma de superfície⁸⁶. A amplificação do campo local é mais eficiente para a intensificação dos sinais ópticos a partir de agregados de nanopartículas (ou estruturas similares), que podem aumentar a seção de choque do espalhamento Raman em até varias ordens de magnitude⁸⁷. A amplificação do sinal Raman foi reportado pela primeira vez em 1974 por Fleischmann *et al.*⁸⁸ quando utilizava a espectroscopia Raman para entender as reações eletroquímicas da piridina em eletrodos rugosos de Ag e observou que por este processo podia se ter uma amplificação no sinal espalhado em até 10^6 ordens de grandeza pela modificação apropriada de superfícies metálicas. Este efeito, nomeado de *surface enhanced (resonance) Raman scattering (SE(R)RS)*, foi interpretado em 1977 como sendo um novo fenômeno físico por Van Duyne⁸⁹ e Creighton⁹⁰ em estudos independentes. O efeito SERS é atribuído a amplificação do sinal óptico quando a radiação incidente excita o LSPR nas nanopartículas metálicas⁸⁶. Basicamente, o mecanismo de amplificação eletromagnético (EM), a uma dada frequência de excitação, depende da função dielétrica das nanopartículas metálicas, do seu formato, tamanho e empacotamento⁹¹

O sinal SERS é obtido em função da amplificação no campo próximo a superfície das nanopartículas metálicas sobre excitação plasmônica, levando a um fator de amplificação proporcional a E^4 ^{92,93}. A intensificação do campo elétrico na superfície das nanopartículas em que as moléculas são adsorvidas é tratada com a teoria clássica do eletromagnetismo pela resolução das equações de Maxwell. Sob excitação adequada, as nanoestruturas metálicas podem apresentar LSPR. Dessa forma o campo induzido, particularmente quando a excitação está próxima da ressonância desses LSPR, é responsável pela amplificação em SERS^{94,95}. Como já mencionado, esta amplificação depende essencialmente da função dielétrica do metal na frequência de excitação, da constante dielétrica do meio que envolve a superfície assim como a forma, tamanho e empacotamento dessas nanopartículas^{96,97}. O controle destes parâmetros é intimamente relacionado com o sucesso ou o fracasso de produção de substratos SERS reprodutíveis. Experimentalmente, uma condição necessária para se obter SERS é a excitação do LSPR. Assim, para as linhas de laser na faixa visível do espectro eletromagnético, os metais nobres Au, Ag e Cu são os mais eficientes. Na Figura 10 são exibidos o espectro de absorção de uma solução de AM a 0,01 mM, a absorção por plasma de superfície do filme evaporado de Ag com 6 nm de espessura, assim como uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Também são exibidas as linhas de laser 514,5 633 e 785 nm. Nesse caso específico, a linha de laser em 514,5 nm está em ressonância apenas com o LSPR do filme de Ag permitindo coletar espectros SERS. Já a linha de laser em 633 nm está em ressonância com o LSPR, o que permite obter espectros SERS, e também com a absorção eletrônica do AM, o que permite coletar espectros RRS, permitindo assim a obtenção de espectros SERRS. No caso da linha de laser em 785 nm, mesmo sendo absorvido para baixos valores de absorbância, podem-se obter espectros SERS.

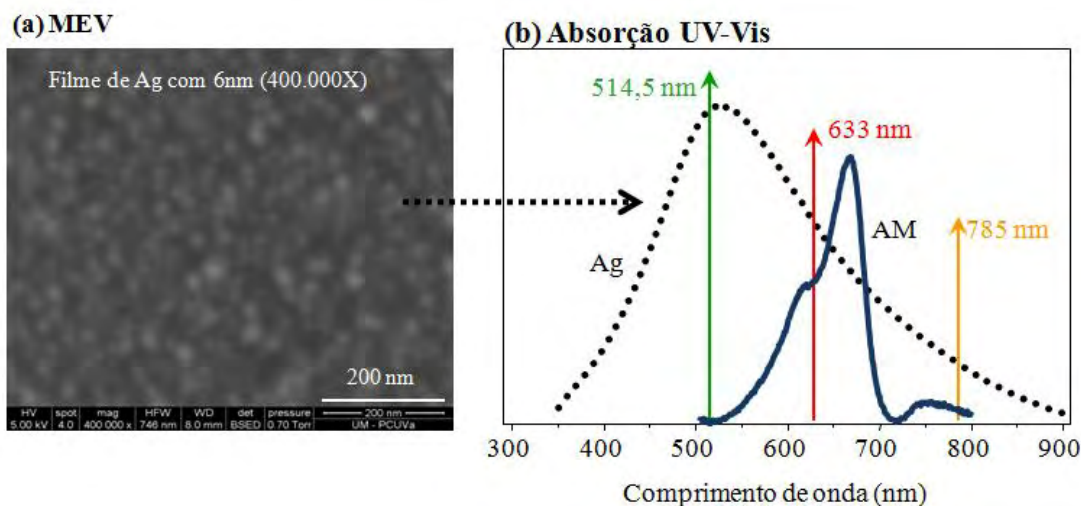


Figura 10: (a) imagem de MEV do filme evaporado de Ag com 6 nm de espessura. (b) Espectro de absorção UV-Vis para solução de AM a 0,01 mM e para o filme evaporado de Ag. Os vetores indicam as linhas de laser utilizadas na escala do visível para ativar o efeito SERS.

A interação entre o laser incidente, as nanopartículas metálicas e a molécula adsorvida e sua relação com o espalhamento Raman e SERS são apresentadas como uma ilustração na Figura 11 Basicamente, a combinação do campo elétrico do laser incidente (E_{laser} – Figura 11a) e o campo elétrico das nanopartículas metálicas (E_p – Figura 11b) compõem o E_{Local} ao redor das nanopartículas. Essas duas componentes do E_{Local} afetam diretamente a magnitude do momento de dipolo induzido da molécula (p_1) que está adsorvida sobre a superfície das nanopartículas (Figura 11c). Em outras palavras, a molécula é polarizada pelo E_{local} quando é colocada sobre a superfície do metal e, como resultado, o dipolo (p_1) é induzido. O campo elétrico irradiado por este dipolo molecular induzido (p_1) também pode polarizar o metal, induzindo um dipolo nas nanopartículas (p_2) que oscila com a mesma frequência do dipolo molecular induzido (p_1).

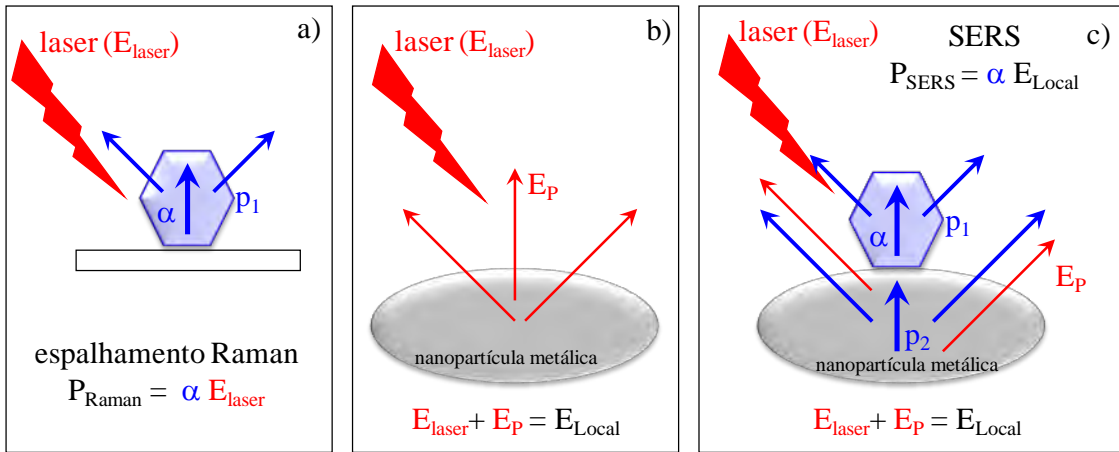


Figura 11: ilustração mostrando (a) o momento de dipolo da molécula (p_1) induzido pelo laser incidente no espalhamento Raman; (b) E_{Local} ao redor das nanopartículas metálicas composto pelo campo elétrico do laser incidente (E_{Laser}) e das nanopartículas (E_p); (c) efeito SERS - a molécula colocada sobre a superfície metálica é polarizada por E_{Local} induzindo o dipolo molecular (p_1), cuja radiação do campo elétrico também pode polarizar o metal, induzindo um dipolo nas nanopartículas metálicas (p_2) que oscila com a mesma frequência de (p_1).

Um modelo simples, assumindo uma esfera metálica como exibido na Figura 12, é útil para entender esse processo de amplificação do campo elétrico em torno da nanopartícula metálica, ou seja, $E(p_{metal})$. Para um raio (r) menor que o comprimento de onda da radiação (λ), o campo elétrico pode ser considerado uniforme através da nanopartícula e o plasma de superfície como um dipolo oscilante no centro da esfera (p_{metal}). Assim, a aproximação eletrostática de Rayleigh (efeitos magnéticos são desconsiderados) é satisfeita. Neste caso, a intensidade do p_{metal} é dada pela relação (6)^{75,86}, onde ϵ_{metal} , que é função da frequência (ω), corresponde à função dielétrica do metal, ϵ_{meio} é a constante dielétrica do meio que envolve a superfície do metal e E_{laser} é o campo elétrico da radiação incidente que oscila com uma frequência ω_{laser} .

$$p_{metal} = \epsilon_{meio} \frac{\epsilon_{metal} - \epsilon_{meio}}{\epsilon_{metal} + 2\epsilon_{meio}} 4\pi r^3 E_{laser} \quad (6)$$

O dipolo p_{metal} é máximo para uma frequência $\omega = \omega_{\text{laser}}$ na condição de ressonância, o que significa $\text{Re} [\epsilon_{\text{metal}} = -2 \epsilon_{\text{meio}}]$ (7). No caso dos metais nobres (Au, Ag e Cu), seus valores de função dielétrica satisfazem tal condição para frequências na região do visível.

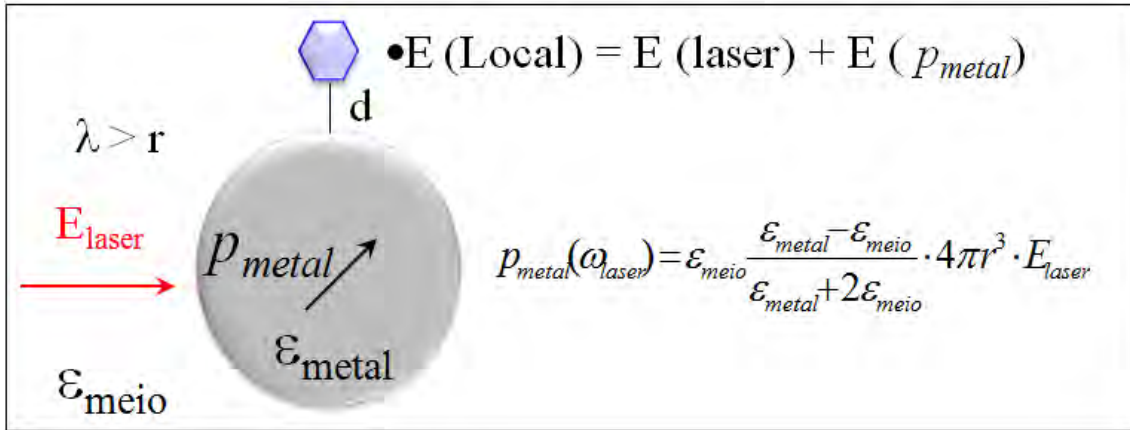


Figura 12: ilustração de uma partícula esférica de metal com o campo elétrico local (E_{Local}) estabelecido no seu entorno e que está na origem do efeito SERS.

No caso da amplificação do espalhamento Raman (SERS), uma interpretação pode ser estabelecida utilizando a mesma equação (6), porém substituindo p_{metal} por p_2 . O dipolo p_2 , induzido na nanopartícula metálica e que oscila com a mesma frequência do dipolo molecular induzido p_1 , também pode ser maximizado, assim como p_{metal} . Isto se dá porque a frequência de vibração de p_2 , que corresponde ao espalhamento Raman (ω_{Raman}), está perto da frequência do laser, ou seja, $\omega_{\text{laser}} \sim \omega_{\text{Raman}}$, de forma que a condição de ressonância [relação (7)] também é obedecida. Este p_2 dá origem a principal contribuição para amplificação do sinal Raman. No caso do espalhamento Raman convencional somente p_1 contribui para o sinal. Em geral, não somente a amplificação do sinal Raman é beneficiada por este efeito eletromagnético, mas também outros processos como emissão, absorção e efeitos não lineares^{98,99}. Porém, o efeito SERS é altamente dependente da distância, podendo assim ser eliminado quando a distância d na Figura 12 atinge cerca de 150 \AA^{100} .

Embora uma única nanopartícula seja usada para dar uma explicação simples do mecanismo de amplificação EM, na prática, os efeitos SERS ou SERRS são observados devido a um intenso campo eletromagnético gerado por “dímeros” e agregados de nanopartículas metálicas. Nesses agregados de nanopartículas são encontrados sítios intersticiais, denominados *hot spots*, os quais apresentam uma densidade de campo eletromagnético ainda muito mais elevada. Dessa forma, para as moléculas posicionadas nesses *hot spots* serão observados uma máxima amplificação do sinal Raman, possibilitando a detecção de analitos em sistemas altamente diluídos chegando a atingir um limite máximo de detecção de uma única molécula (*single molecule detection – SMD*)^{101,102}.

1.7. Espectroscopia de absorção eletrônica

Esta espectroscopia envolve transições eletrônicas relacionadas à absorção de radiação eletromagnética cuja energia está na região do visível, podendo alcançar ainda o ultravioleta ou o infravermelho próximos^{71,73}. A frequência da radiação absorvida é uma medida da energia necessária para a transição eletrônica, enquanto a intensidade é dependente da probabilidade de ocorrer esta transição. Geralmente, quando as moléculas absorvem radiação eletromagnética, naturalmente esta radiação (energia) acaba sendo dissipada na forma de calor e a molécula volta ao seu estado fundamental. Porém, algumas moléculas quando absorvem energias mais intensas podem dissipar apenas parte desta energia na forma de calor e voltar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia menor que aquela da radiação absorvida¹⁰³.

O mecanismo de absorção de fótons ou espectroscopia de absorção molecular é baseado em medidas de absorbância (A) ou transmitância (T), sendo a absorbância

usada nesta dissertação, que apresenta uma dependência para a concentração molecular (c) de moléculas envolvidas na medida através da equação (8)⁷¹.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (8)$$

onde P_0 é a intensidade da radiação incidente e P é a intensidade da radiação após passar pela amostra de espessura b (caminho óptico) e coeficiente de extinção ϵ . A equação acima é conhecida como Lei de Beer-Lambert¹⁰⁴. Esta lei relata a dependência linear entre a concentração c de moléculas e a absorvância A medida. Esta lei apresenta algumas limitações, dentre elas, sendo usada com sucesso somente para baixas concentrações moleculares, usualmente menores que 0,01 M.

1.8. Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia AFM é uma técnica que utiliza as interações entre uma ponta de contato e a superfície da amostra para formar imagens e análises morfológicas da amostra a ser estudada^{105,106}. Tais interações ocorrem a partir de forças de *Van der Waals*, forças eletrostáticas, magnéticas e de atrito, dependendo do tipo de material e da distância entre a ponta e a amostra¹⁰⁷.

A técnica de AFM fornece, entre outras informações, a topografia da superfície do filme com seus defeitos e ordenamentos moleculares, possibilitando a medida direta de suas alturas e profundidades, bem como a rugosidade do filme. As aplicações desta técnica no estudo de materiais orgânicos e análises estruturais de filmes finos têm evoluído bastante desde sua invenção em 1986¹⁰⁸. As medidas de AFM são feitas localmente, porém a técnica não requer que a superfície estudada seja condutora eletricamente, ampliando ainda mais suas possíveis aplicações se comparada com a técnica de microscopia de tunelamento.

O microscópio de força atômica é um sistema constituído basicamente por uma alavanca e uma agulha, um sistema de varredura piezoeletrico, um sistema de detecção a laser do deslocamento da alavanca e um sistema de controle e realimentação, como ilustra a Figura 13⁷⁴.

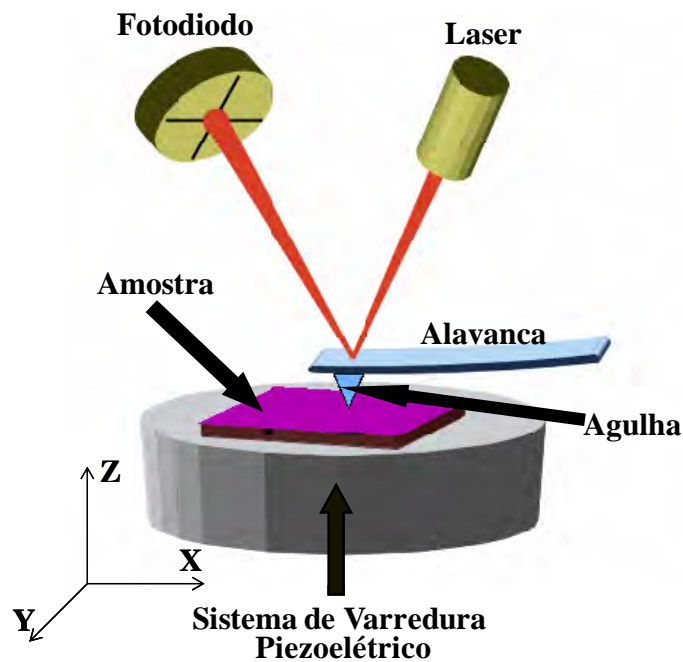


Figura 13: ilustração de um microscópio de força atômica (AFM)⁷⁴.

A alavanca e a agulha são os elementos sensoriais responsáveis pela interação com o filme, sendo que a agulha faz o mapeamento da superfície e a alavanca mede a força de interação da agulha com a amostra. O sistema de varredura piezoeletrico desloca-se em escala micro e nanométrica nas direções x, y e z quando uma diferença de potencial é aplicada em suas extremidades proporcionando imagens em 3 dimensões. O deslocamento da alavanca é detectado pelas alterações no ângulo de reflexão de um feixe de laser que incide na ponta livre e espelhada da própria alavanca. Os raios refletidos são captados por um fotodiodo e enviados ao sistema de controle e realimentação (um microcomputador), o qual procura manter a distância entre a amostra e a agulha constante através da variação da tensão aplicada no piezoeletrico. Os

principais modos de operação de um microscópio de força atômica são os modos contato, não contato e contato intermitente (*tapping mode*).

1.9. Espectroscopia de impedância

As medidas de espectroscopia de impedância são uma ferramenta poderosa para investigar interações entre analitos e os materiais que constituem as unidades sensoriais¹⁰⁹. A técnica de espectroscopia de impedância consiste basicamente em se fazer medidas utilizando uma tensão alternada *ac* na entrada do circuito em estudo (unidades sensoriais no nosso caso) para se obter valores de capacitância e condutância como resposta¹⁰⁹. A varredura de impedância ocorre para uma faixa de frequência relativamente ampla (geralmente entre 1 Hz e 1 MHz), em que a condutância pode ser facilmente convertida em perda dielétrica (G/ω), permitindo a detecção de dispersões características dos materiais que recobrem os eletrodos interdigitados (filmes LB ou evaporados), consequência de variações provocadas pelas substâncias adsorvidas nestes materiais¹¹⁰. Taylor e MacDonald¹¹¹ apresentam um circuito elétrico equivalente, adaptado na Figura 14a, que descreve as características elétricas de um sistema muito similar ao que estamos estudando, ou seja, um eletrodo metálico coberto com um material fracamente condutor imerso em um eletrólito. Uma simulação da dependência global da capacitância (C) e perda dielétrica (G/ω) em uma ampla faixa de frequência do circuito equivalente apresentado em 14a foi adaptada na Figura 14b¹¹¹.

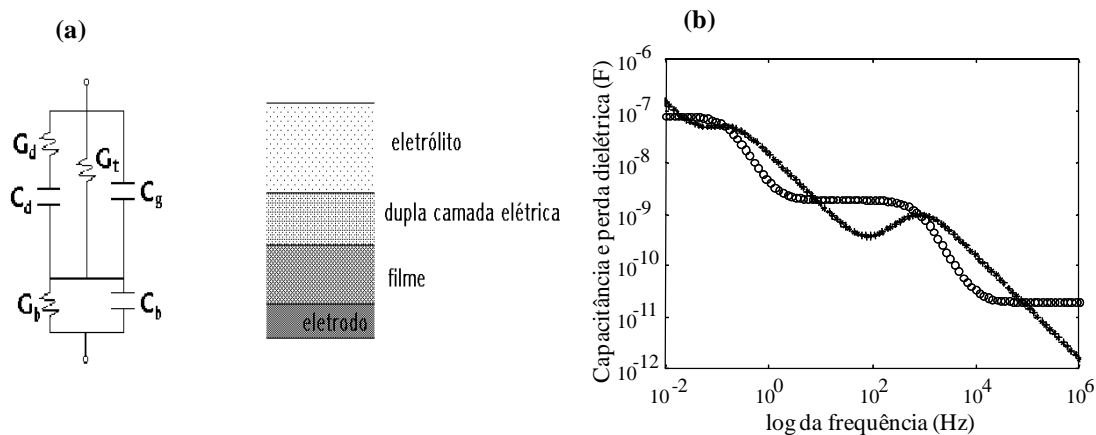


Figura 14: (a) circuito equivalente de um eletrodo metálico coberto com material fracamente condutor imerso em um eletrólito. (b) Curvas teóricas de capacitância (°) e perda dielétrica (*) para o circuito equivalente ilustrado em (a).

Neste circuito equivalente, a presença do filme que recobre os eletrodos é feita através da combinação em paralelo de C_b e G_b . Estes dois componentes estão em série com a impedância do eletrólito, composta por três componentes: a capacitância geométrica do arranjo de eletrodos utilizados imersos em um eletrólito (C_g); da dupla camada elétrica (C_d) que surge devido à adsorção espontânea de íons sobre a interface eletrodos/eletrólito, que é carregada através da condutância da solução (G_d); e da condutância total do eletrólito representada por $(G_d + G_t)$. G_t neste caso permite a transferência de carga através da interface filme/eletrólito¹¹¹ (Figura 14a). Nas curvas ilustradas na Figura 14b a região de baixas frequências (< 50 Hz) é dominada pelos efeitos de dupla camada elétrica, enquanto que os efeitos do filme cobrindo os eletrodos aparecem na região entre 10^2 Hz e 10^5 Hz. Em frequências acima de 10^5 Hz a impedância do sistema é dominada pela capacitância geométrica da configuração de eletrodos adotada. As medidas *ac* evitam ainda o deslocamento unilateral de espécies químicas ionizadas no interior do filme, o que poderia alterar irreversivelmente suas propriedades elétricas, sendo, portanto um processo de análise repetitivo e não destrutivo. Outra vantagem oferecida pelas medidas *ac* é o pouco tempo necessário para a variação de parâmetros experimentais¹¹²:

Os dados de impedância ainda podem ser tratados pelo método estatístico de análises de componentes principais (PCA). Essa é uma técnica estatística que transforma um grupo de variáveis correlacionadas em um grupo de variáveis não correlacionadas. Estabelece, com base em uma matriz de semelhança (correlações, variâncias-covariâncias, ou até mesmo de similaridades), um conjunto de eixos (componentes ou fatores) perpendiculares. Cada componente corresponde a um autovetor dessa matriz. Assim, com base em uma matriz de correlação entre m variáveis, serão calculados m autovetores (= eixos fatoriais) de comprimento $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m$ decrescente em razão da sua contribuição à variância total dos dados. Esses comprimentos correspondem aos m autovalores (= raízes latentes) da matriz. Um exemplo das matrizes utilizadas na geração de uma PCA é exibido no capítulo IV. Desse modo, o primeiro eixo da PCA, sobre o qual serão ordenadas as amostras, representará a maior parte da variação dos dados. O resultado disso é um sistema reduzido de coordenadas, proporcionando informações sobre as semelhanças das amostras¹¹³. Deve ser enfatizado que a PCA nem sempre reduz um grande número de variáveis originais a um pequeno número de variáveis transformadas. De fato, se as variáveis originais não são correlacionadas, a PCA não produz efeito algum. Os melhores resultados são obtidos quando as variáveis originais são altamente correlacionadas, positivamente ou negativamente. Nesse caso, por exemplo, 20 ou 30 variáveis originais podem perfeitamente ser representadas por duas ou três componentes principais, deixando clara a existência de grande redundância nas variáveis originais, sendo que muitas destas medem características similares.

Capítulo II

Procedimentos experimentais

2.1. Materiais

Os fosfolipídios aniônicos DPPG [1,2-Dipalmitoil-*sn*-3-Glicero-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] e CLP [1,3-Di (3-*sn*-Fosfatidil)-*sn*-glicerol] assim como os zwitteriônicos DOPC [1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina] e DPPC [L- α -1,2-Dipalmitoil-*sn*-3-Glicero-Fosfatidilcolina] foram comprados da Avanti Polar Lipids Inc. O AM e o poli(hidrocloro de alilamina) (PAH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich co. As massas molares do DPPG, CLP, DOPC, DPPC, AM e PAH são 745, 1493, 786, 745, 319 e 56×10^3 g/mol, respectivamente. As estruturas moleculares desses compostos são exibidas na Figura 15. Para o pH de 5,6 as soluções dos fosfolipídios aniônicos estão altamente ionizadas^{114,115} e, segundo o trabalho de Sainz *et al.*¹¹⁶, o caráter zwitteriônico dos fosfolipídios DPPC e DOPC é de aproximadamente 97,6% em pH 10, 99,9% em pH 7 e 86,3% em pH 4,5. Estas características são importantes porque, como será visto nos capítulos de resultados e discussão, as interações eletrostáticas desempenham um papel relevante no crescimento dos filmes e na própria interação destes com o AM. Todos os produtos químicos foram usados sem purificação adicional. Os solventes orgânicos clorofórmio e metanol (Merck) são da qualidade HPLC. A água ultrapura (M Ω cm 18,2 e pH 5,6) adquirida a partir de um sistema de Milli-Q, modelo *Simplicity*.

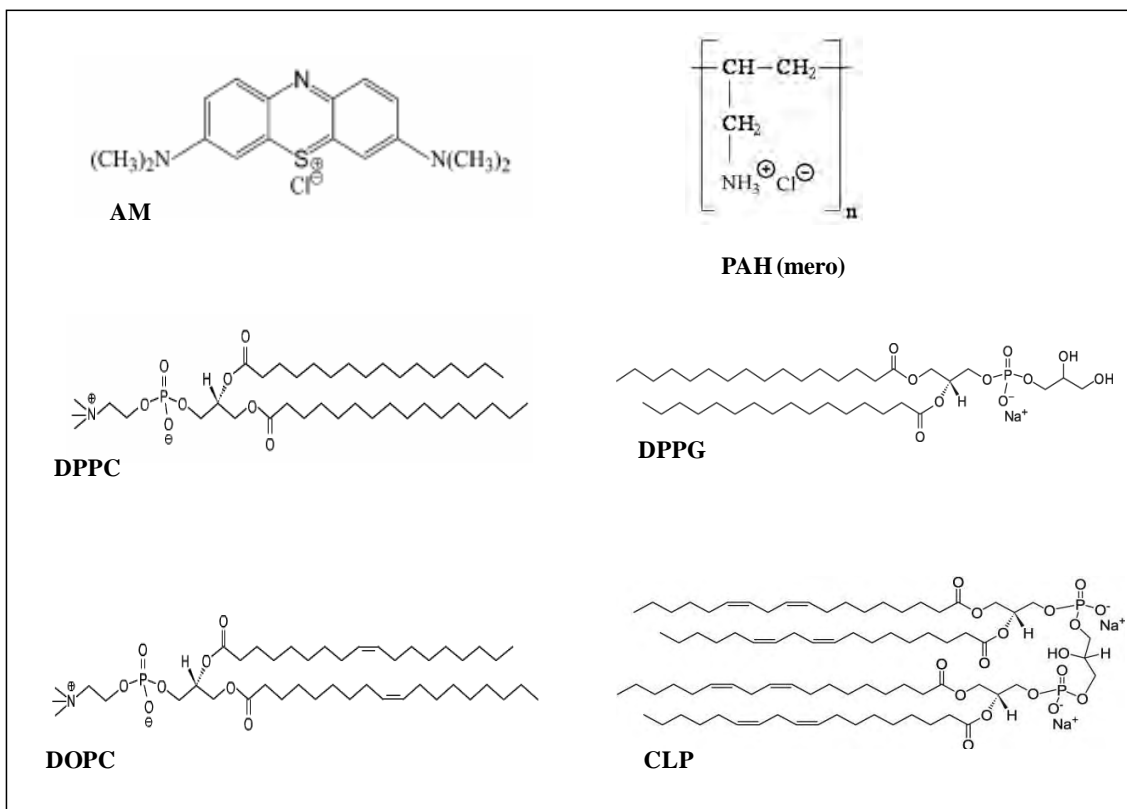


Figura 15: estrutura molecular dos fosfolipídios aniônicos (CLP e DPPG) e zwitteriônicos (DOPC e DPPC), do azul de metileno (AM) e do polieletrólito PAH.

2.2. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir e LB foram fabricados utilizando uma cuba de Langmuir KSV 2000 modelo *Simplicity*. Os filmes de Langmuir foram produzidos em uma subfase de água, espalhando 100 μ L da solução de DPPG, CLP, DPPC e DOPC todas a mesma concentração de 1 mM dissolvidas em clorofórmio, com exceção do DPPG que teve de ser dissolvido em metanol/clorofórmio (1/9 em volume). As monocamadas de Langmuir foram caracterizadas por isotermas π -A a 23°C usando o método Wilhelmy, com a superfície da placa posicionada perpendicularmente às barreiras. A monocamada foi comprimida simetricamente a uma velocidade constante de 10 mm/min.

Duas metodologias distintas foram utilizadas para os estudos de interações com as monocamadas de fosfolipídios. Uma delas foi o método de co-espalhamento de soluções, apresentado na seção 5.1. Nesse caso, uma solução foi formada a partir da

mistura de soluções de AM e fosfolipídios em diferentes razões moleculares (de 50:1 a 1:4 moléculas de fosfolipídio:AM), e utilizadas na fabricação dos filmes de Langmuir. A segunda metodologia, aplicada ao estudo de interação entre DPPG-PAH, consiste na simples solubilização de PAH na subfase aquosa em diferentes concentrações (0,1; 0,01 e 0,001 mg/mL), sobre a qual foi espalhada a solução de DPPG. De maneira complementar, isotermas π -A de DPPG também foram realizadas para a subfase contendo 64×10^{-6} mg/mL de AM com e sem 0,01 mg/mL de PAH.

2.3. Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

2.3.1. Mono e multicamadas LB

Os filmes LB contendo multicamadas foram obtidos transferindo as monocamadas de Langmuir de DPPG da interface ar/água contendo 0,01 mg/mL de PAH na subfase para diferentes substratos sólidos dependendo da técnica de caracterização a ser aplicada. Estes filmes serão designados como filmes LB de (DPPG+PAH). A pressão de superfície foi mantida constante em 25 mN/m, a velocidade das barreiras a 10 mm/min (compressão simétrica) e as velocidades de emersão do substrato foram de 0,5 a 3,0 mm/min. Vale ressaltar que para a deposição de monocamadas de fosfolipídios puros (sem PAH em subfase) os mesmos parâmetros foram adotados exceto pela velocidade de emersão, que nesse caso foi de 8 a 10 mm/min. Durante a deposição, tal velocidade foi variada dentro destes intervalos para manter a taxa de transferência (TR) perto de 1,0. Sob estas condições filmes LB do tipo Z foram obtidos.

Filmes LB contendo até 30 camadas de (DPPG+PAH) foram depositados sobre substratos de quartzo para espectroscopia de absorção UV-Vis e 17 camadas LB sobre ZnSe para medidas de FTIR. Filmes LB contendo 1 e 5 camadas de (DPPG+PAH)

foram depositadas em eletrodos interdigitados de Pt (50 pares de dígitos com 10 μm de largura e 100 nm espessura, 0,5 mm de comprimento e 10 μm distantes uns aos outros) para espectroscopia de impedância. Além disso, um filme LB contendo 1 camada de (DPPG+PAH+AM), com PAH e AM dissolvidos na subfase aquosa, foi depositado em um filme de Ag com 6 nm de espessura produzido por evaporação térmica a vácuo (10^{-6} Torr) para medidas de SERRS.

2.3.2. Filmes LB para detecção de uma única molécula

A concentração de solução espalhada para a fabricação dos filmes de Langmuir foi calculada para atingir, em média, 1, 10 e 100 moléculas de AM e $2,5 \times 10^6$ moléculas de DPPG por micrometro quadrado, que é a área superficial atingida pelo laser utilizado. O número de moléculas de DPPG está relacionado com as isotermas π -A, cuja área por molécula está em torno de 40 \AA^2 o que significa $2,5 \times 10^6$ moléculas de DPPG/ μm^2 (10^8 \AA^2). Durante a fabricação dos filmes de Langmuir, normalmente são espalhadas sobre a subfase $3,07 \times 10^{16}$ moléculas de DPPG, para o qual $1,23 \times 10^{10}$, $1,23 \times 10^{11}$ ou $1,23 \times 10^{12}$ moléculas de AM devem ser espalhadas para manter a proporção de área superficial em 1, 10 e 100 moléculas/ μm^2 , respectivamente. O volume total de solução escolhido para espalhar $3,07 \times 10^{16}$ moléculas de DPPG sobre a subfase, a uma concentração de 1 mM, foi de 50 μL . Dessa forma, 205 μL de soluções de AM a 10^{-10} , 10^{-9} e 10^{-8} M foram co-espalhadas, juntamente com os 50 μL de DPPG, para que a proporção de 1, 10 e 100 moléculas de AM/ μm^2 seja mantida. Os filmes LB, para os diferentes números de moléculas por μm^2 , foram depositados sobre filmes de Ag com 9 nm de espessura produzido por evaporação térmica a vácuo (10^{-6} Torr) para medidas de SERS.

2.4. Soluções e filmes *layer-by-layer* (LbL)

Os filmes LbL foram fabricados usando soluções aquosas de CLP, DPPG, DPPC e PAH a um pH de 5,6 com concentrações de 1,4; 0,74; 0,73 mg/mL (todas a 1,0 mM) e 0,80 mg/mL, respectivamente. Todas as soluções aquosas foram preparadas sem nenhum procedimento especial: o pó simplesmente foi adicionado à água ultrapura e a solução foi cuidadosamente agitada. Esse mesmo procedimento foi utilizado para o preparo de uma solução de AM a uma concentração de 0,32 mg/mL (1,0 mM). O colóide de Ag foi obtido pela redução de AgNO₃ pelo citrato de sódio, seguindo o método proposto por Lee e Meisel¹¹⁷. A concentração final de colóide de Ag está em torno de 1 mM. A partir desta metodologia espera-se que as nanopartículas de Ag (AgNP) estejam negativamente carregadas a um pH 5,6¹¹⁸, apresentando preferencialmente um formato com uma distribuição de diâmetro variando de 25 a 130 nm¹¹⁹⁻¹²².

Os filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/CLP, PAH/DPPC e PAH/AgNP foram fabricados pela imersão do substrato em soluções estoques distintas conforme a seguinte sequência: solução de PAH por 3 minutos → água ultrapura para remover o excesso de PAH adsorvido por 1 minuto → solução de fosfolípido (ou colóide de Ag) por 3 minutos → água ultrapura para remover o excesso de fosfolípido (ou colóide de Ag) adsorvido por 1 minuto. Após isso, a primeira bicamada LbL de PAH/fosfolípido (ou PAH/AgNP) é formada e com a repetição dessa sequência, multicamadas do filme LbL são obtidas. A imersão dos substratos nas diferentes soluções por um tempo específico, foi determinado previamente por um estudo de cinética de crescimento. Resumidamente, essa cinética foi realizada pelo acompanhamento do crescimento de uma bicamada LbL de PAH/fosfolípido, através da espectroscopia de absorção UV-Vis, monitorando o aumento da absorbância do fosfolípido de acordo com os tempos

de imersão do substrato (1, 3, 5 e 7 min). O tempo de imersão apropriado do substrato é determinado por uma saturação (platô) na curva de absorvância, indicando que uma máxima adsorção de material foi alcançada e, conseqüentemente, uma camada foi formada.

Para o crescimento de filmes LbL de PAH/(DPPG+AgNP), PAH/(CLP+AgNP), PAH/(DPPG+AgNP+AM), PAH/(CLP+AgNP+AM), PAH/(DPPG+AM) e PAH/(CLP+AM) a mesma seqüência foi seguida. Nestes casos, 2 mL de AM e/ou colóide de Ag provenientes das soluções estoques foram adicionadas a um balão volumétrico de 10 mL, que em seguida foi preenchido com solução de DPPG. As concentrações finais de DPPG e CLP nas soluções aquosas foram 0,8 mM para a adição de colóide de Ag; 0,6 mM para a adição de colóide de Ag e AM; 0,8 mM para adição de AM. Todos os filmes LbL foram fabricados utilizando um braço mecânico disponível no sistema de Langmuir KSV 2000, com imersão e emersão dos substratos perpendicularmente às soluções (e água ultrapura de lavagem) a uma velocidade de 17 mm/minuto. Vale ressaltar que os primeiros filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPC foram fabricados manualmente. Porém os resultados foram consistentes com aqueles fabricados utilizando o braço mecânico. Todos os substratos foram limpos previamente com detergente neutro, sendo extensivamente lavados com água ultrapura seguida de acetona (5 minutos de sonicação) e clorofórmio (5 minutos de sonicação). Este procedimento é suficiente para ativar a superfície do substrato e assim permitir a adsorção da primeira camada de PAH evitando o uso de qualquer outro tratamento mais drástico como a solução piranha (uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio).

O número de bicamadas LbL depositadas e o tipo de substrato foram escolhidos de acordo com a técnica de caracterização. Nesse sentido, os filmes foram crescidos em

quartzo para espectroscopia de absorção no UV-Vis, enquanto para as medidas de MEV e AFM os filmes foram crescidos em laminas de vidro para microscopia da marca *Precision Glass Line* (borosilicato) tratado termicamente (600°C por 2 horas) para minimizar sua rugosidade. Para as medidas de espectroscopia de impedância os filmes foram depositados sobre eletrodos interdigitados de Pt e para as análises de FTIR sobre ZnSe.

2.5. Caracterização dos filmes finos

As soluções, filmes LbL e filmes LB foram caracterizados pela técnica de absorção UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 que opera na região de 190 a 1100 nm. O monitoramento por UV-Vis foi realizado usando uma taxa de varredura de 600 nm/min. As medidas de FTIR foram realizadas utilizando-se um espectrômetro Bruker modelo Vector 22 que opera de 2,5 a 25 μm (400 a 4000 cm^{-1}). As medidas de FTIR foram obtidas com 128 *scans* e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Os espectros Raman, RRS e SERRS foram obtidos utilizando um espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via equipado com um microscópio Leica série DMLM para focar as amostras, detector CCD Peltier e plataforma móvel (XYZ), cujo passo mínimo é de 0,1 μm , onde são colocadas as amostras. Foram utilizados lasers de Argônio marca Laserphysics e Hélio-Neônio marca Renishaw com comprimentos de onda em 514,5 e 633 nm, respectivamente. O espectrógrafo é equipado com redes de difração com 1800 e 1200 grades/mm permitindo que os espectros sejam coletados com uma resolução de cerca de 4 cm^{-1} (obtenção de espectros ponto-a-ponto com resolução espacial de cerca de 1 μm^2). Várias porcentagens da máxima potência do laser foram utilizadas para se chegar ao espectro com a relação sinal/ruído mais adequada. Para as medidas de detecção de uma única molécula, baixas potências de laser foram utilizadas

(~ 20 μ W) para evitar processos de fotodegradação. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente utilizando uma lente objetiva de 50x (NA de 0,75), que gera áreas de espalhamentos de 1 μm^2 . A aquisição e tratamento dos dados foram feitos no programa *WIRE* e *Galactic Industries GRAMS/386*, respectivamente.

As imagens de AFM, exibidas nas seções 3.1.2 e 4.3.2, foram obtidas através de um microscópio Digital Instrument modelo Nanoscope IV, e as imagens exibidas na seção 5.2.2 foram adquiridas em um microscópio Nanosurf, modelo easyScan 2. Para todas as medidas foram utilizadas uma ponta de nitreto de silício no modo *tapping*. As imagens foram caracterizadas usando o programa WsXM 4.0 *develope* 12.1 para analisar a rugosidade RMS e altura média das imagens topográficas. As imagens de MEV foram obtidas usando um microscópio FEI, modelo quanta 200F, sob baixo vácuo (1,0 Torr) e sem metalização da superfície dos filmes LbL.

As medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas em um analisador de impedância Solartron 1260A. As curvas foram adquiridas para uma faixa de frequências de 1 Hz a 1 MHz, usando 50 mV de amplitude, com os eletrodos mergulhados em água ultrapura, usada como referência, e em soluções aquosas de AM variando de 0,01; a 100,0 nM. Os eletrodos ficaram imersos 20 minutos para permitir uma leitura estável do sinal, seguida de 5 medidas consecutivas para cada unidade sensorial visando verificar as variações antes da aquisição dos dados. As medidas foram realizadas da menor para maior concentração e a referência dos espectros foi obtida em água ultrapura. Entre cada conjunto de medidas, as unidades sensoriais foram imersas por 10 minutos em água ultrapura sob agitação moderada. É importante mencionar que antes da imersão das unidades sensoriais em uma solução específica de AM, um processo de lavagem com a solução de AM foi efetuado para evitar interferências pela presença de água nos filmes.

Capítulo III

Crescimento e caracterização dos filmes layer-by-layer (LbL) e Langmuir-Blodgett (LB) de fosfolipídios

3.1. Filmes *layer-by-layer* (LbL)

3.1.1. Crescimento dos filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/DPPC e PAH/CLP

Inicialmente, um estudo da cinética de crescimento dos filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPC foi realizado utilizando a espectroscopia de absorção UV-Vis. As Figuras 16a e 16b exibem, respectivamente, os espectros UV-Vis para os filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPC.

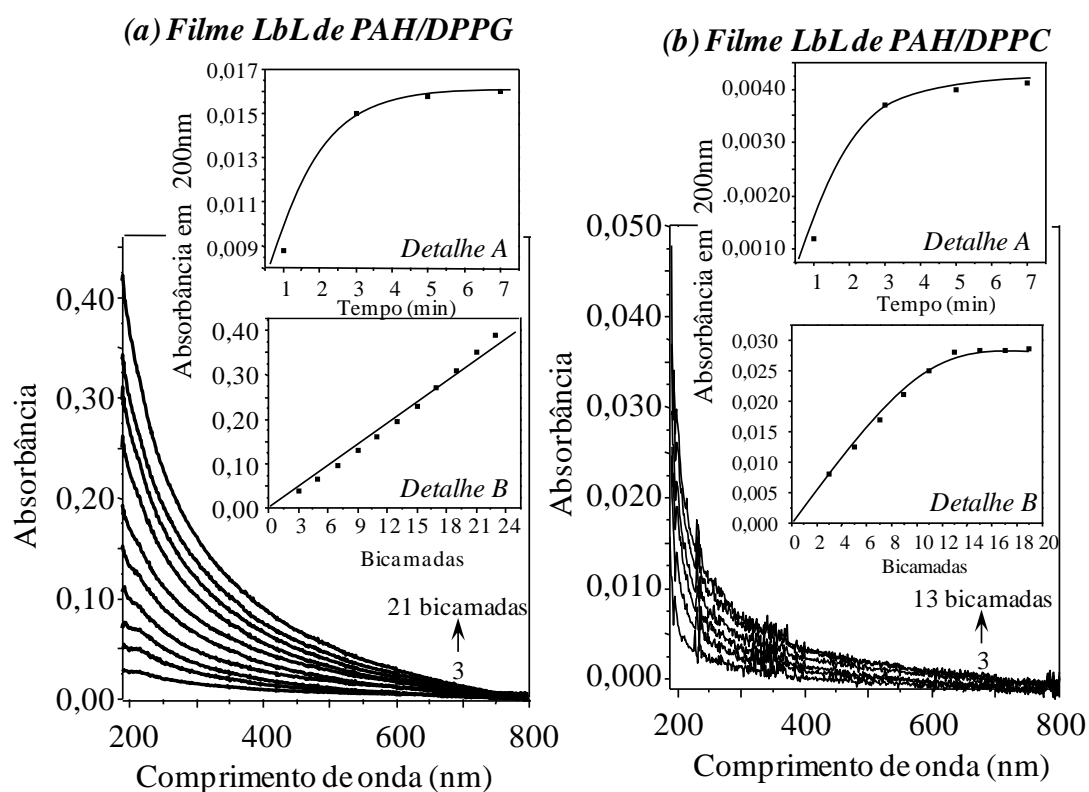


Figura 16: espectros de absorção UV-Vis para os filmes LbL de (a) PAH/DPPG e (b) PAH/DPPC. *Detalhe A:* cinética de crescimento para ambos os filmes. *Detalhe B:* dependência linear da absorbância em 200 nm em função do número de bicamadas depositadas para ambos os filmes.

De acordo com a cinética de crescimento exibida no *detalhe A* das Figuras 16a e 16b, observa-se que 3 minutos é um intervalo de tempo de imersão dos substratos adequado para a fabricação destes filmes LbL, uma vez que acima desse tempo a absorbância tende a um platô indicando que a adsorção de material está atingindo um

limite. Um aumento linear na absorção foi medido em função do número de bicamadas LbL depositadas, como exibido no *detalhe* B da Figura 16a , sugerindo que quantidades semelhantes de material foram adsorvidas por bicamada. O mesmo comportamento é observado para o fosfolipídio aniônico CLP, como se pode observar no *detalhe* da Figura 17a. Um esquema representando uma possível estrutura dos fosfolipídios no filme LbL é exibido na Figura 17b.

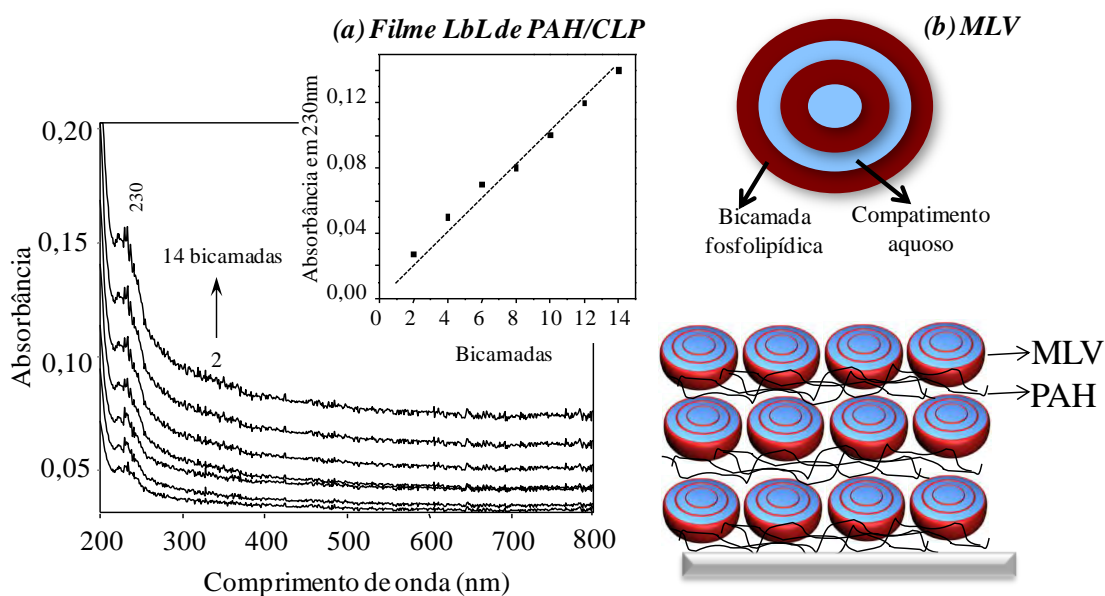


Figura 17: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme LbL de PAH/CLP. *Detalhe:* dependência linear da absorbância em 230 nm em função do número de bicamadas depositadas. (b) Ilustração dos filmes LbL contendo PAH/fosfolipídios onde o DPPG, DPPC ou CLP se encontram na forma de vesículas multilamelares (MLV).

Por outro lado, o filme LbL de PAH/DPPC, quando comparado aos filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/CLP, possui menores valores de absorção para o mesmo número de bicamadas depositadas, além da máxima deposição de 13 bicamadas. Acima de 13 bicamadas o filme LbL de PAH/DPPC para de crescer e, conseqüentemente, os espectros UV-Vis tendem a se sobreporem, originando o platô exibido no *detalhe* B da Figura 16b. As diferenças nos valores de absorbância para ambos os filmes estão relacionadas com as diferenças de carga apresentada pelos fosfolipídios em questão:

DPPG e CLP aniônicos e DPPC zwitteriônico. Uma vez que o PAH é um polieletrólito catiônico, a deposição de PAH/DPPG e PAH/CLP é facilitada por interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ do PAH e PO_4^- do DPPG e CLP, levando a filmes LbL com valores mais elevados de absorção.

A presença dos fosfolipídios e PAH nos filmes LbL foi confirmada pelos espectros de FTIR coletados no modo de transmissão. A Figura 18 mostra os espectros FTIR para um filme de 14 bicamadas LbL de PAH/CLP depositado sobre ZnSe, além dos filmes *cast* de CLP e PAH (ambos provenientes de soluções aquosas). As regiões abaixo de 1900 cm^{-1} e acima de 2750 cm^{-1} são exibidas na forma de *zooms*, enfatizando as bandas de absorção da CLP e PAH nos filmes LbL. A Tabela 1 trás as atribuições das principais bandas FTIR para os filmes *cast* de CLP^{123,124} e PAH^{125,126}.

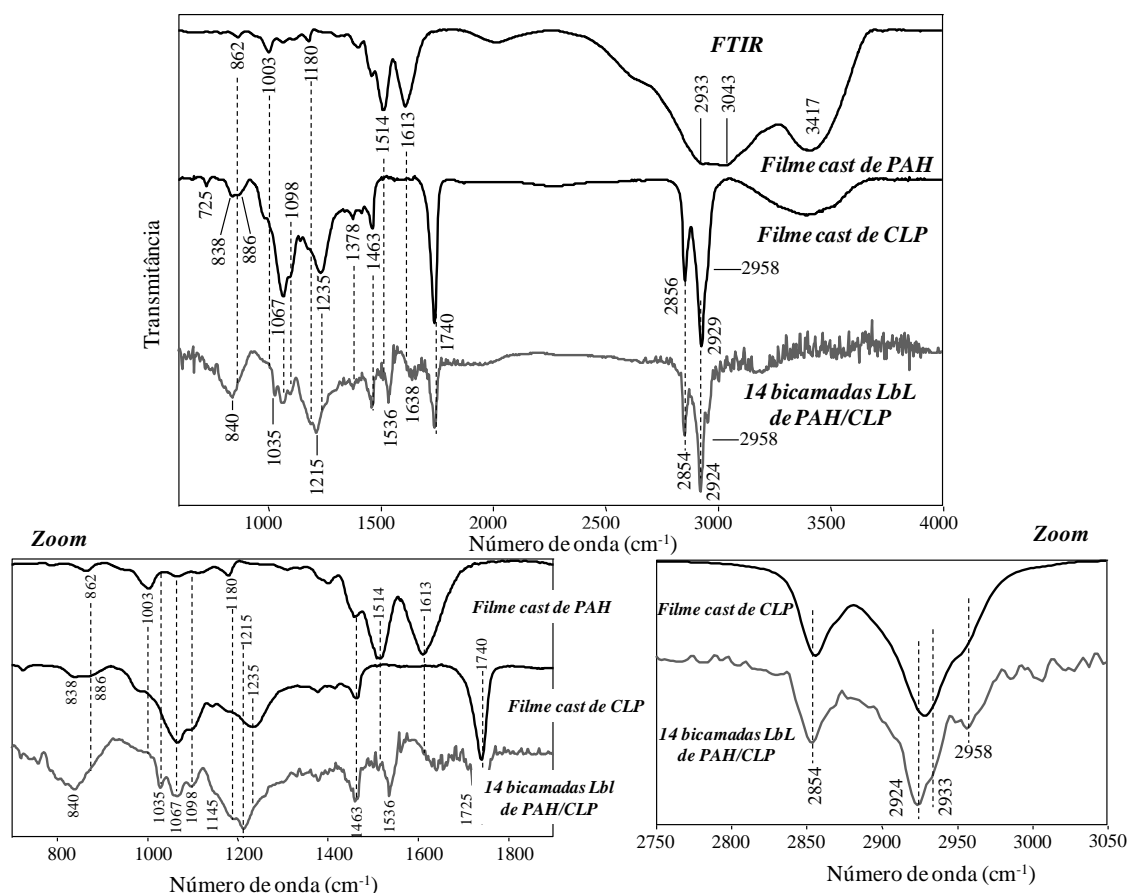


Figura 18: espectros FTIR para os filmes *cast* de CLP e PAH e para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP. Os detalhes mostram os espectros FTIR a baixos e elevados números de onda.

Tabela 1. Atribuições das principais bandas FTIR para os filmes *cast* de CLP e PAH.

CLP (cm ⁻¹)	PAH (cm ⁻¹)	Atribuições ^{125,126}
	3417	Estiramento N-H
	2958	Estiramento C-H
2958 ombro		Estiramento antissimétrico CH ₃
2929		Estiramento antissimétrico CH ₂
2856		Estiramento simétrico CH ₂
1740		Estiramento do grupo carbonil
	1613	NH ₃ ⁺ <i>bending</i> antissimétrico
	1514	NH ₃ ⁺ <i>bending</i> simétrico
1463		CH ₂ <i>scissoring</i> ou deformação anti-simétrica do grupo metil.
1378		Deformação simétrica do grupo metil
1235		Estiramento antissimétrico P=O (grupo PO ₂ ⁻)
1098		Estiramento simétrico P=O (grupo PO ₂ ⁻)
1067		Vibração C-O-P-O-C ou estiramento C-O (grupo ester) acoplado ao estiramento C-C
886		Estiramento P-O
838		Estiramento P-O
725		CH ₂ <i>rocking</i>

Considerando que as principais bandas da CLP e PAH estão presentes nos filmes *cast*, as interações entre CLP e PAH são deduzidas a partir de deslocamentos das bandas do filme LbL de PAH/CLP. Dessa forma, a banda em 1235 cm^{-1} (PO_2^- antissimétrico) para o filme *cast* de CLP é deslocada para 1215 cm^{-1} no filme LbL e a banda em 1098 cm^{-1} (PO_2^- simétrico) tem sua intensidade relativa alterada em relação as bandas adjacentes em 1067 e em 1035 cm^{-1} . Além disso, as bandas em 838 e 886 cm^{-1} (estiramento P-O) para o filme *cast* da CLP coalesce em uma larga banda com máximo em 849 cm^{-1} para o filme LbL. No caso do PAH, as bandas em 1514 e 1613 cm^{-1} (NH_3^+ *bending*) para o filme *cast* são deslocadas para 1536 e 1638 cm^{-1} no filme LbL de PAH/CLP. Essas alterações mostram as interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ do PAH e PO_4^- da CLP como responsáveis pelo crescimento dos filmes LbL. Resultados similares foram encontrados para os filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPC¹²⁷. Hubner *et al.*¹²³ reporta ligações intramoleculares de hidrogênio entre os grupos fosfatos e o contra íon NH_4^+ (sal de amônio da CLP). Isso é consistente com o papel desempenhado pelos grupos polares no crescimento dos filmes LbL de fosfolipídios e PAH.

No caso do DPPG, os estiramentos simétrico e antissimétrico do CH_2 foram observados em 2917 e 2850 cm^{-1} respectivamente, isto é, a baixos números de onda quando comparados a CLP (filmes *cast* e LbL – Figura 18). Considerando que os modos CH_2 são muito sensíveis a organização, os resultados indicam que as cadeias alquílicas do DPPG são encontradas na forma de bicamadas com elevado grau de organização (fase sólida) enquanto no caso da CLP as cadeias alquílicas estão menos ordenadas (fase líquida cristalina)¹²⁸. Especificamente para a CLP, é possível afirmar que o grau de organização das cadeias alquílicas tende a aumentar do filme *cast* para o LbL, possivelmente como consequência da interação CLP-PAH.

3.1.2. Análise morfológica dos filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/DPPC e PAH/CLP

A morfologia para os filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPC foram investigadas em escalas micro e nanométrica via microscopia óptica e AFM, respectivamente. A Figura 19 mostra imagens de microscopia óptica e de AFM realizadas, respectivamente, para 21 e 10 bicamadas do filme LbL de PAH/DPPG enquanto a Figura 20 mostra as mesmas medidas realizadas, respectivamente, para 13 e 10 bicamadas do filme LbL de PAH/DPPC.

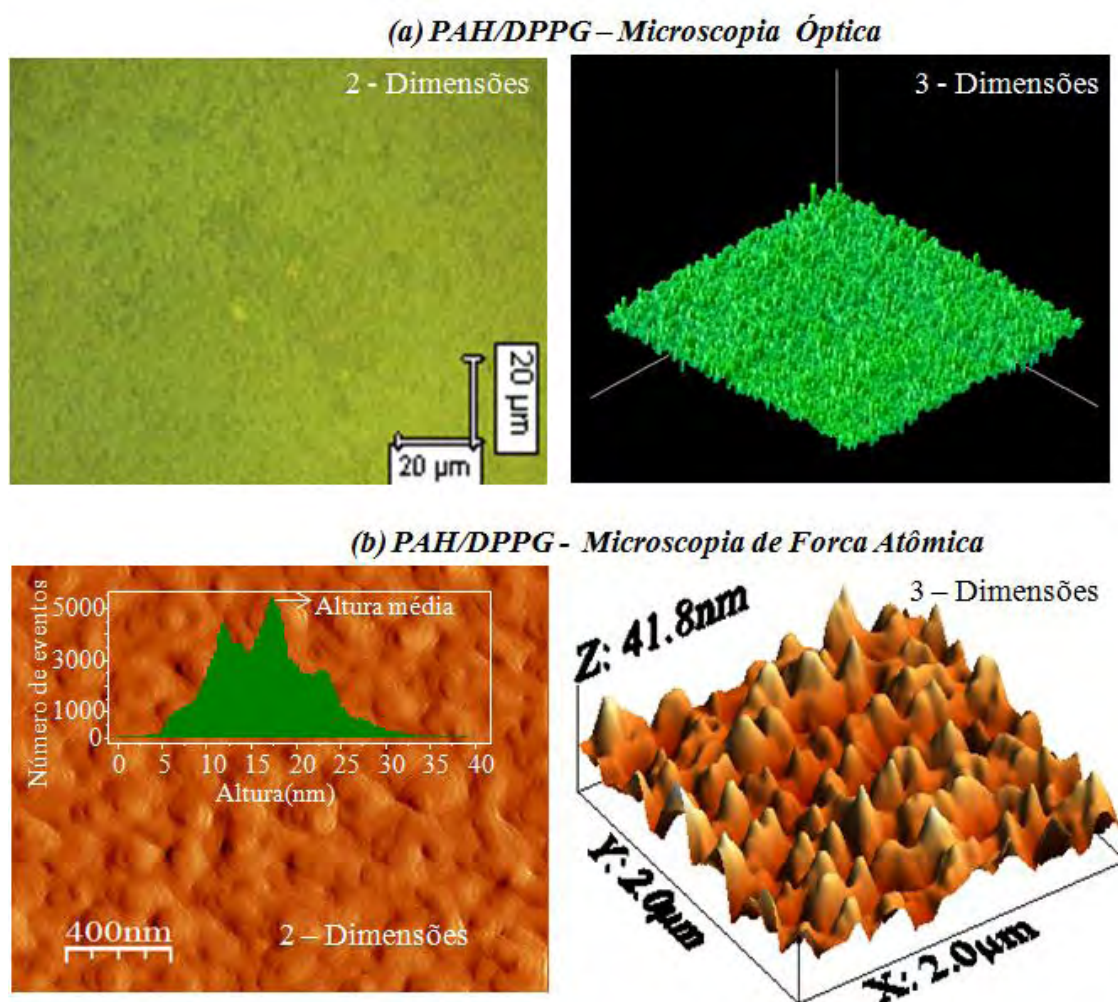


Figura 19: (a) imagem óptica em 2 e 3 dimensões para 21 bicamadas LbL de PAH/DPPG. (b) Imagem topográfica de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas LbL de PAH/DPPG. O *detalhe* exibe um histograma com a distribuição de alturas para uma área de 2 μm x 2 μm.

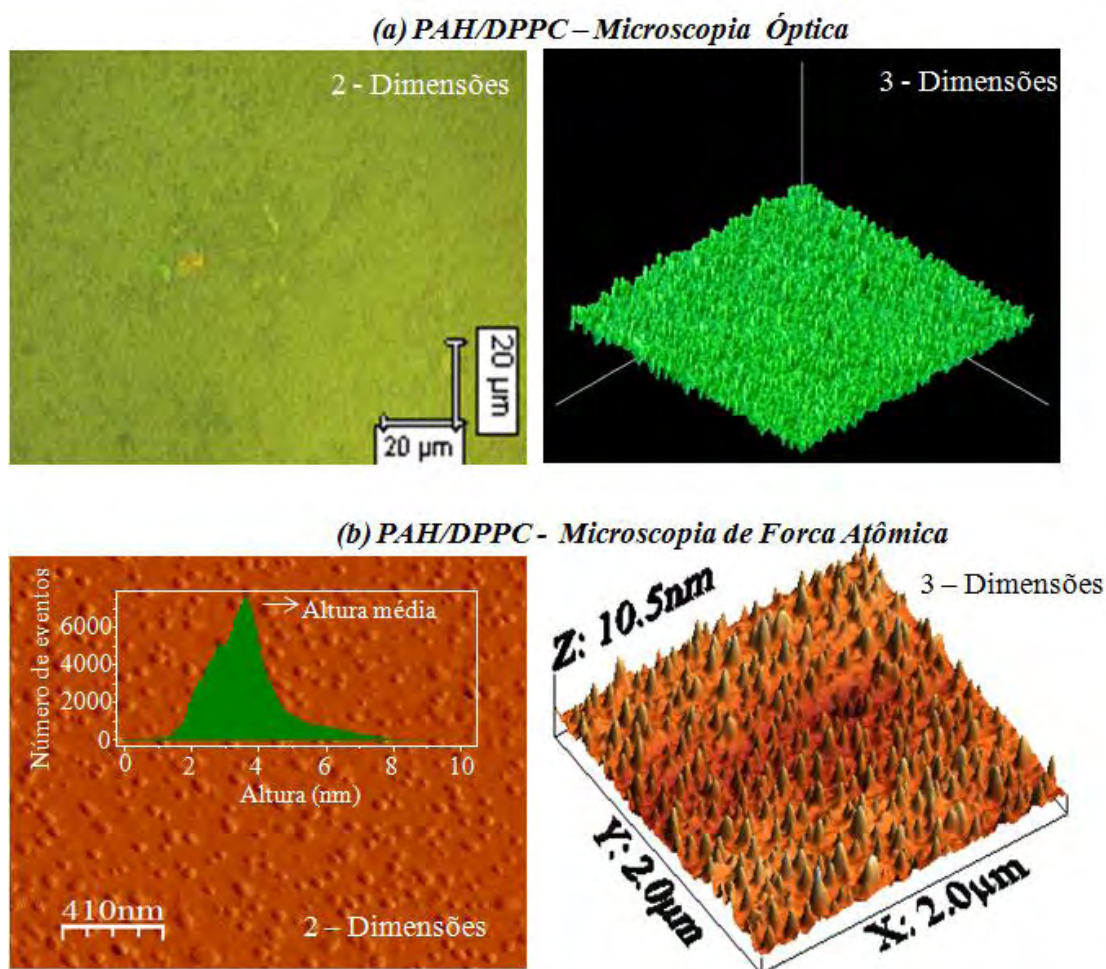


Figura 20: (a) imagem óptica em 2 e 3 dimensões para 13 bicamadas LbL de PAH/DPPC. (b) Imagem topográfica de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas LbL de PAH/DPPC. O *detalhe* exibe um histograma com a distribuição de alturas coletadas para uma área de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$.

De acordo com as microscopias ópticas exibidas nas Figuras 19a e 20a em 2 e 3 dimensões, realizadas para os filmes LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG, constatou-se que ambos possuem uniformidade morfológica em escala micrométrica. As imagens de AFM, exibidas nas Figuras 19b e 20b mostram a presença de domínios ou agregados moleculares cujas distribuições de altura são dadas pelos histogramas nos *detalhes*. Esses domínios podem ser atribuídos a vesículas multilamelares (MLV) de fosfolípídios, similar ao que foi reportado para vesículas por Fang *et al.*, Lunelli *et al.*, You *et al.*, e Tarasova *et al.*¹²⁹⁻¹³². A presença de MLV é corroborada pela coalescência de domínios e protuberâncias globulares notadas nas imagens de AFM (Figuras 19b e

20b), cujas dimensões ("diâmetro") estão entre 1000-3000 Å para DPPG e menores que 1000 Å para DPPC. Volodkin *et al.*¹³³ relatou a imobilização de DPPC e DPPG, na forma de vesículas unilamelares (extrusão), sobre polieletrólitos utilizando a técnica de LbL. No trabalho, imagens de AFM semelhantes às nossas revelaram que as vesículas mantêm sua forma quando imobilizadas na forma de filmes LbL.

Complementarmente, os resultados obtidos para as medidas de AFM foram caracterizadas via rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média (diferença de altura entre picos e vales) utilizando o programa WSxM 4.0. A rugosidade

RMS é dada pelo desvio padrão de acordo com a equação $R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (Z_n - \bar{Z})^2}{N - 1}}$ onde

\bar{Z} é a média dos valores de Z dentro da área determinada, Z_n é a altura do enésimo pixel e N é o número de pixels considerado, enquanto a altura média é simplesmente a média aritmética das alturas medidas. Foram realizadas medidas para áreas com 5,0 x 5,0 μm^2 ; 2,0 x 2,0 μm^2 e 1,0 x 1,0 μm^2 e os valores obtidos estão na Tabela 2.

Tabela 2. Rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média para os filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/DPPC e PAH/DPPG.

Amostra	Área (μm^2)	Rugosidade RMS (nm)	Altura média (nm)
PAH/DPPC	5 x 5	5,2	8,6
	2 x 2	1,1	3,6
	1 x 1	0,8	2,0
PAH/DPPG	5 x 5	10,0	21,5
	2 x 2	5,5	16,6
	1 x 1	5,0	11,3

Verifica-se que os filmes LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG apresentaram valores de rugosidade RMS e altura média que variam com a área de varredura, o que é esperado já que a distribuição dos agregados não é homogênea tanto ao longo da superfície do filme quanto em termos de tamanho. Pode-se observar que a rugosidade

apresentada pelo filme de PAH/DPPG, para as diferentes áreas de análise, é maior que a do filme de PAH/DPPC. Esse resultado está relacionado com a diferença na altura média dos filmes analisados (diferença de altura entre picos e vales), para o qual se observa maiores valores para o filme de PAH/DPPG. Além disso, o fato do filme de PAH/DPPG possuir uma altura média maior que a do filme de PAH/DPPC sugere que uma maior quantidade de material esteja presente em tal filme, o que está em acordo com as medidas de espectroscopia de absorção UV-Vis, que apresentou valores de absorbância com uma ordem de grandeza a mais para o filme LbL de PAH/DPPG.

A Figura 21 mostra a imagem óptica obtida para o filme contendo 14 bicamadas LbL de PAH/CLP.

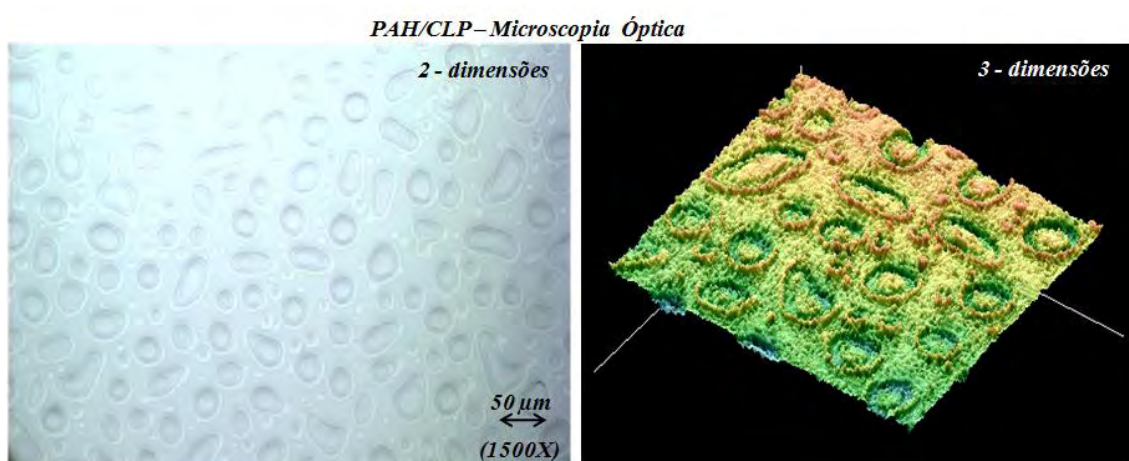


Figura 21: imagem óptica em 2 e 3 dimensões para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP.

De acordo com a Figura 21, em 2 e 3 dimensões, a CLP pode ser observada na forma de vesículas com diâmetro variando entre 4 a 60 μm (diâmetro médio de ~ 20 μm) o que é característico de vesículas gigantes. Com esse diâmetro, essas vesículas são suficientemente grandes para serem observadas pelas microscopias ópticas, diferentemente dos filmes LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG cujas vesículas, com diâmetros da ordem de nanômetros, só foram observadas via AFM. As principais

técnicas utilizadas hoje em dia para o preparo de vesículas gigantes de fosfolipídios são derivadas da eletroformação¹³⁴ e hidratação¹³⁵, onde um filme seco serve de ponto de partida. Uma comparação entre ambas as metodologias foi reportada por Rodriguez *et al.*¹³⁶. A partir do contraste exibido pelo contorno das vesículas gigantes de CLP (Figura 20) e de acordo com Rodriguez *et al.*,¹³⁶ pode-se afirmar que estas vesículas gigantes apresentam o chamado “*nest of vesicles*”, o que significa que as vesículas contêm pelo menos uma outra vesícula cujo diâmetro é superior a 80% da maior¹³⁶. Essas vesículas gigantes de CLP são formadas em solução quando preparadas sem nenhum procedimento especial (hidratação ou eletroformação), com a estrutura preservada após a transferência para o substrato. Conseqüentemente, a metodologia utilizada aqui pode ser aplicada como um procedimento alternativo para o preparo de vesículas gigante de CLP quando uma distribuição uniforme de forma e tamanho não é requerida, o que é nosso caso. São poucos os trabalhos existentes sobre vesículas gigantes de CLP, as quais são normalmente fabricadas a partir de misturas de fosfolipídios¹³⁷⁻¹³⁹, dificultando assim a comparação com os resultados apresentados.

3.1.3. Incorporação de AgNP aos filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/CLP

Visando um estudo de interação entre AM e fosfolipídios utilizando como ferramenta de análise o efeito SERS, abordado com detalhes no capítulo V, AgNP foram incorporadas aos filmes LbL. O crescimento de filmes LbL contendo PAH, DPPG ou CLP e AgNP foi sistematicamente monitorado por espectroscopia de absorção no UV-Vis. A Figura 22a apresenta os espectros UV-Vis para a solução aquosa de colóide de Ag contendo DPPG e CLP. Para evitar a saturação do detector do espectrofotômetro UV-Vis, esses espectros foram obtidos para solução aquosa diluídas 50 vezes em relação às soluções utilizadas para fabricar os filmes LbL contendo PAH/(DPPG+AgNP), PAH/(CLP+AgNP). No caso do colóide de Ag, a solução estoque

também foi diluída 50 vezes. Em contraste com a Figura 22a (colóides), a Figura 22b mostra os espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL contendo 10 bicamadas de PAH/AgNP, PAH/(DPPG+AgNP) e PAH/(CLP+AgNP).

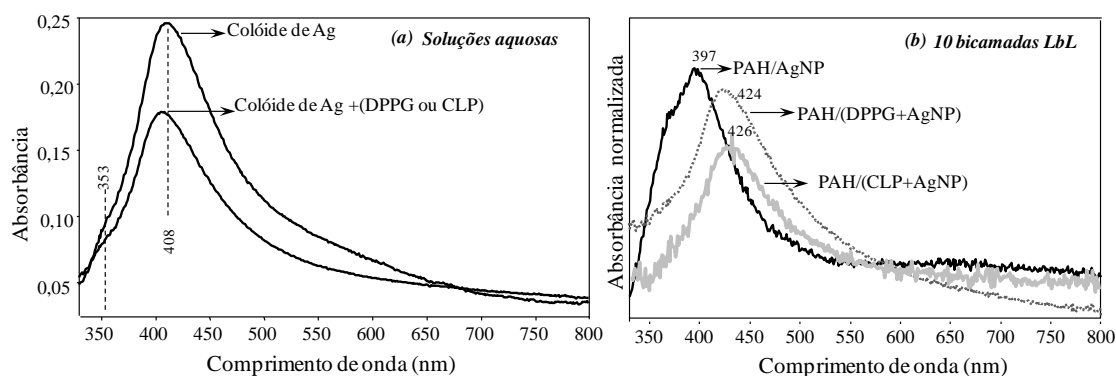


Figura 22: (a) espectros de absorção UV-Vis para solução aquosa de colóide de Ag e colóide de Ag contendo DPPG ou CLP. (b) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/AgNP, PAH/(DPPG+AgNP) e PAH/(CLP+AgNP).

De acordo com os resultados exibidos na Figura 22a, o colóide de Ag apresenta um ombro em 353 nm, uma forte banda de absorção com máximo em 408 nm e uma cauda que se estende para comprimentos de onda mais elevados que são atribuídos a absorção por plasma de superfície dos modos quadripolo, dipolo e partículas agregadas, respectivamente¹⁴⁰. Em termos de agregação do colóide de Ag, a cauda do espectro de UV-Vis sem a presença de uma banda larga indica um baixo nível de agregação^{141,142}. Além disso, as alterações observadas nos espectros UV-Vis do colóide de Ag contendo DPPG e CLP sugerem que a agregação das partículas de Ag no colóide não é significativamente afetada. O ligeiro deslocamento do máximo em 408 nm para a banda de absorção do colóide de Ag em termos de nanômetros (energia) sugere que as concentrações de DPPG e CLP não provocam uma mudança significativa na função dielétrica dos meios aquosos¹⁴². Já os espectros exibidos na Figura 22b para os filmes LbL sugerem que os deslocamentos do máximo de absorção (397, 424 e 426 nm respectivamente) sejam decorrência de mudanças na função dielétrica dos meios.

As Figuras 23a e 23b exibem os espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL contendo PAH/AgNP e PAH/(DPPG+AgNP), respectivamente, cujas imagens ópticas para 10 bicamadas são exibidas nos *detalhes*. As Figuras 23c e 23d exibem, respectivamente, os espectros de absorção UV-Vis para o filme LbL de PAH/(CLP+AgNP) e uma imagem MEV referente a 14 bicamadas LbL do filme em questão.

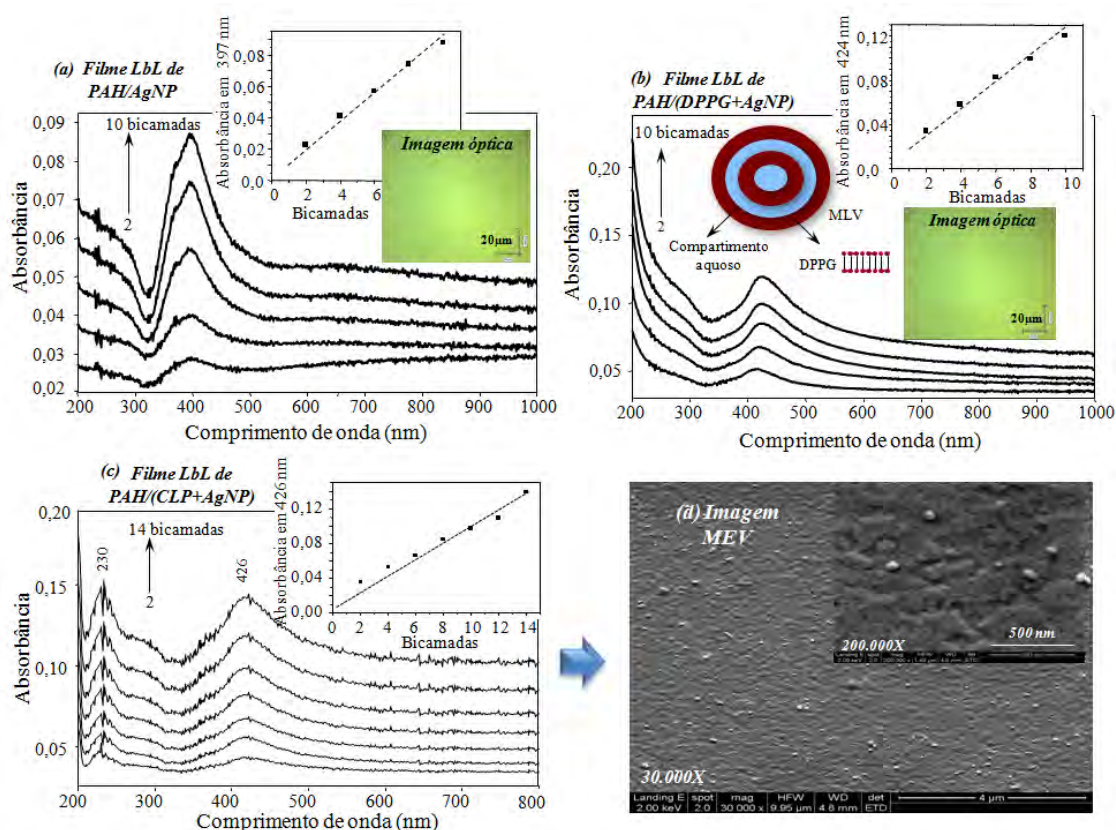


Figura 23: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/AgNP. Os *detalhes* mostram a dependência linear da absorbância em 397 nm em função do número de bicamadas depositadas e a imagem óptica para o filme LbL com 10 bicamadas de PAH/AgNP. (b) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/(DPPG+AgNP). Os *detalhes* mostram a dependência linear da absorbância em 424 nm em função do número de bicamadas depositadas, a imagem óptica para o filme LbL com 10 bicamadas de PAH/(DPPG+AgNP) e uma ilustração das vesículas multilamelares de DPPG (MLV). (c) Espectros de absorção UV-Vis para filmes LbL com diferentes números de bicamadas de PAH/(CLP+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 426 nm em função do número de bicamadas depositadas. (d) Imagem de MEV para o filme LbL com 14 bicamadas de PAH/(CLP+AgNP). O *detalhe* mostra as AgNP.

A dependência linear do número de bicamadas depositadas vs absorvância (*detalhes*) para todos os casos revela que quantidades semelhantes de AgNP são adsorvidas em PAH por bicamada depositada, levando a um crescimento controlado dos filmes LbL em escala nanométrica de espessura. No caso do PAH/(DPPG+AgNP) e PAH/(CLP+AgNP), considerando que o PAH é um polieletrólito catiônico (NH_3^+), o DPPG e CLP são fosfolipídios aniônicos (PO_4^-) e as AgNP são negativamente carregadas¹¹⁸, tanto os fosfolipídios quanto as AgNP competem pelos grupos NH_3^+ considerando interações eletrostáticas. Dessa forma, um questionamento com relação a possibilidade da transferência de DPPG e CLP para a camada de suporte de PAH pode ser levantado. A resposta vem com o crescimento dos valores de absorção em 200 nm e a banda em 230 nm que estão relacionadas, respectivamente, a adsorção de DPPG e CLP. É importante mencionar que o nível de agregação das AgNP parece não ser afetado consideravelmente com o crescimento desses filmes LbL. Por outro lado, Goulet *et al.* trabalhando com filmes LbL de dendrímeros/AgNP¹⁴² e Zhang *et al.* trabalhando com filmes LbL de PAH/AuNP¹⁴¹ relataram um forte aumento da banda de absorção UV-Vis com máximo em 650 nm, o qual atribuíram a agregação das partículas de metais nobres. A principal razão para essa diferença está relacionada ao tempo em que os filmes LbL permanecem imersos nos colóides de Ag ou Au, sendo 2 horas em Goulet *et al.*, 30 minutos para Zhang *et al.* e 3 minutos no nosso caso. Além disso, no caso do filme LbL de PAH/(DPPG+AgNP) e PAH/(CLP+AgNP), as AgNP estão adsorvidas dentro da camada de DPPG e CLP enquanto nos outros casos as AgNP e AuNP estão dispostas na forma de camadas. Na imagem MEV exibida na Figura 23d é possível observar as AgNP dispersas ao longo da superfície do filme LbL, as quais são observadas tanto agregadas como partículas isoladas, corroborando os resultados de espectroscopia de absorção UV-Vis.

3.2. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

3.2.1. Filmes de Langmuir de DPPG

Considerando a dificuldade na fabricação de filmes LB que vão além de mono ou bicamadas¹²⁷ de DPPG, uma nova estratégia foi adotada para a deposição desses filmes. Em analogia aos filmes LbL, em que multicamadas foram crescidas em função da interação PAH-fosfolipídios, estudos de interação DPPG-PAH foram realizados via filmes de Langmuir na tentativa de se obter filmes LB contendo multicamadas de (DPPG+PAH). Os filmes de Langmuir de DPPG na interface ar/água foram preparados com uma subfase contendo diferentes concentrações de PAH. As isotermas π -A correspondentes são exibidas na Figura 24.

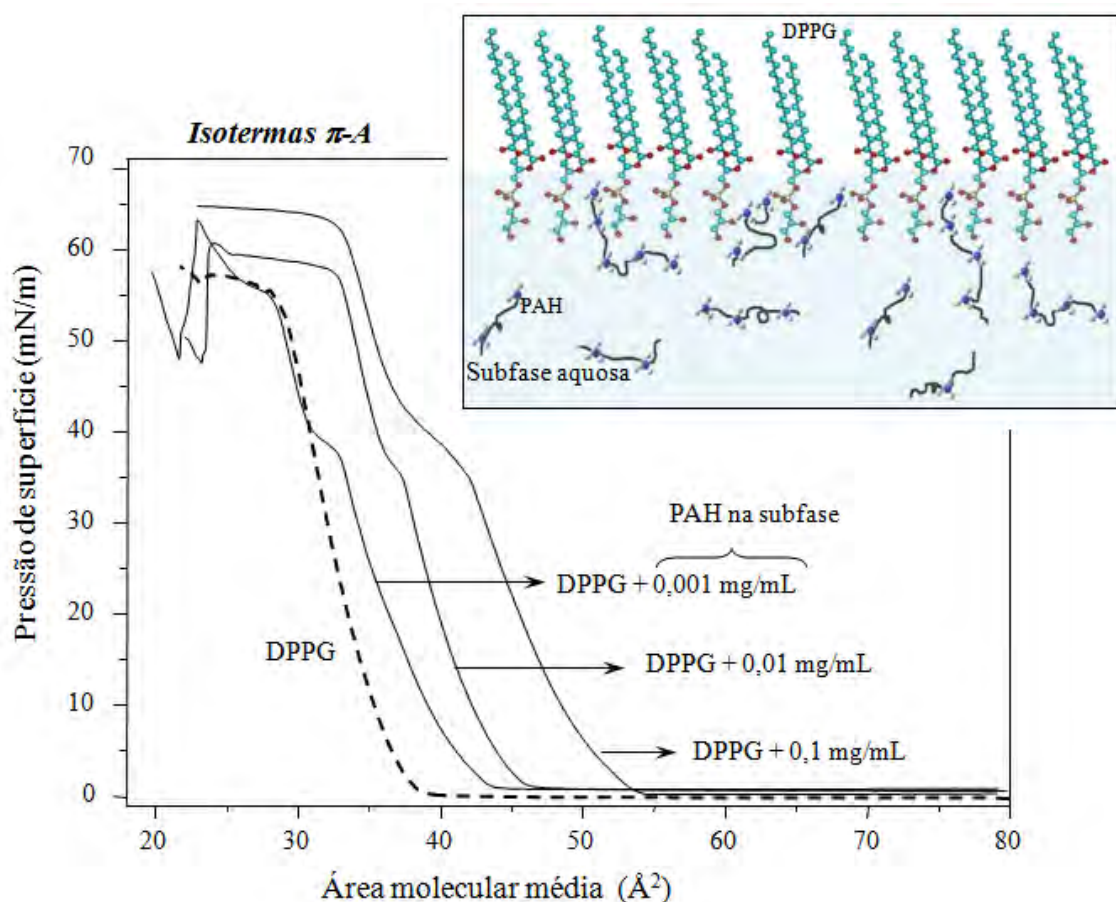


Figura 24: isotermas π -A de DPPG obtidas para subfase de água contendo diferentes concentrações de PAH. *Detalhe:* ilustração do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água contendo PAH dissolvido na subfase.

Dependendo da concentração de PAH na subfase, um deslocamento das isotermas π -A para maiores áreas moleculares é observado. Para o pH da subfase utilizado (5,6), tanto o PAH¹⁴³ quanto o DPPG¹¹⁵ estão altamente ionizados. Dessa forma, o deslocamento observado nas isotermas π -A pode ser resultado de interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ e PO_4^- do PAH e DPPG, respectivamente. As moléculas de PAH podem estar posicionadas preferencialmente entre os grupos polares do DPPG na interface ar/água (*detalhe* da Figura 24) levando a um deslocamento das isotermas π -A para concentrações mais elevadas de PAH. Neste caso, as interações entre os grupos polares do DPPG e grupos não polares da cadeia do PAH (interações hidrofóbicas) devem ser fracas. Apesar da elevada ionização do PAH e DPPG a um pH

de 5,6, na seção 3.1 demonstramos que filmes LbL contendo bicamadas de PAH/DPPG podem ser crescidos sem restrições em termos de número de bicamadas. No entanto, o crescimento de filmes LbL contendo bicamadas de PAH/DPPC foi restringido a 13 bicamadas. Esse fato é explicado com base no caráter aniônico do DPPG e zwitteriônico do DPPC, revelando o quão importante são as interações eletrostáticas para este sistema.

A Figura 24 também mostra que as isotermas π -A apresentam uma inflexão em 38 mN/m, independentemente da concentração de PAH na subfase aquosa. Nesta pressão de superfície as moléculas de PAH provavelmente são expelidas da interface ar/água de volta para a subfase. A quantidade de moléculas de PAH que são expelidas da interface ar/água depende da concentração de PAH na subfase. Nesse sentido, as fases condensadas indicadas pelas isotermas π -A dos filmes de Langmuir de DPPG para subfase de água pura e para a concentração de 0,001 mg/mL de PAH são coincidentes. Isso revela que todas as moléculas PAH foram expelidas da interface. Por outro lado, para as concentrações de 0,01 e 0,1 mg/mL de PAH, as isotermas π -A indicam que os filmes de Langmuir de DPPG constituem fases condensadas em áreas moleculares maiores quando comparado ao resultado obtido para subfase de água pura. Portanto, para estas concentrações, as moléculas de PAH são apenas parcialmente expelidas da interface ar/água.

3.2.2. Crescimento dos Filmes LB de (DPPG+PAH)

Os filmes LB foram crescidos para uma pressão de superfície constante a 25 mN/m. Neste valor, os filmes de Langmuir de DPPG já estão bem empacotados sobre a subfase aquosa independentemente da concentração de PAH, como mostrado pelas isotermas π -A (Figura 24). Além disso, esse valor garante que as moléculas de PAH

permanecem na interface ar/água, o que é a principal responsável pela transferência dos filmes de Langmuir de DPPG para substratos sólidos formando filmes com multicamadas LB. O crescimento dos filmes LB foi monitorado pela espectroscopia de absorção de UV-Vis, conforme exibido pela Figura 25.

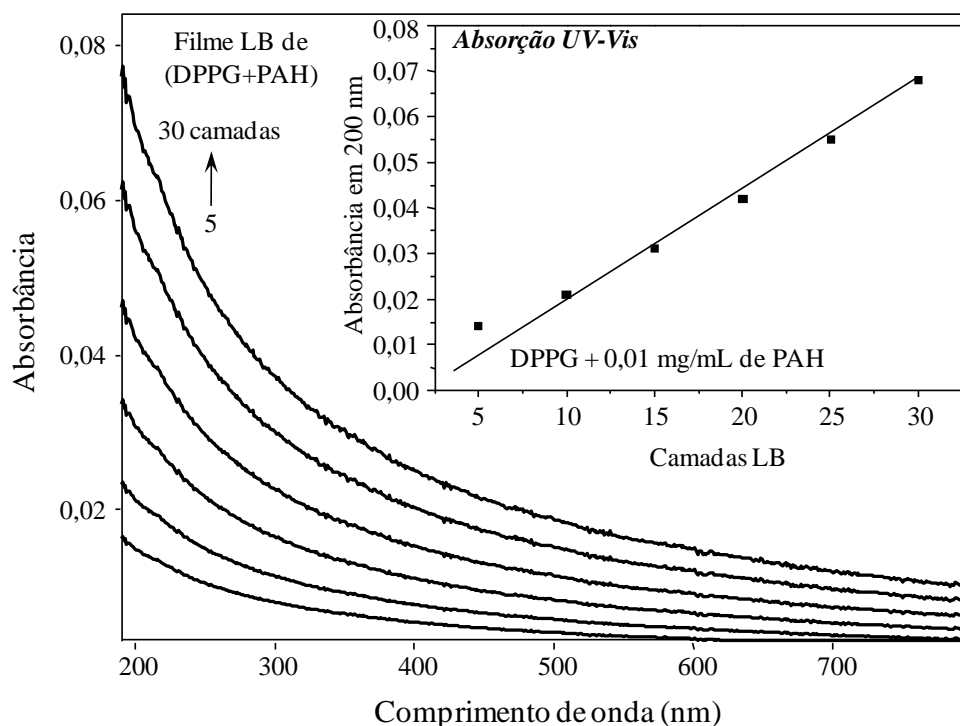


Figura 25: espectros de absorção UV-Vis para filmes LB com diferentes números de camadas de DPPG transferidos sobre um substrato de quartzo com subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH. *Detalhe:* absorbância em 200 nm em função do número de camadas depositadas.

A Figura 25 apresenta os espectros dos filmes LB coletados a cada 5 camadas até 30 camadas utilizando uma subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH. O *detalhe* mostra a absorção em 200 nm em função do número de camadas depositadas. O crescimento linear de absorbância indica que quantidades semelhantes de material são transferidas por camada depositada, revelando um crescimento controlado dos filmes LB. A presença dos dois materiais nos filmes LB foi confirmada usando o FTIR no modo de transmissão. A Figura 26 mostra os espectros FTIR para 17 camadas LB de (DPPG+PAH) e também para os filmes *cast* de PAH e DPPG.

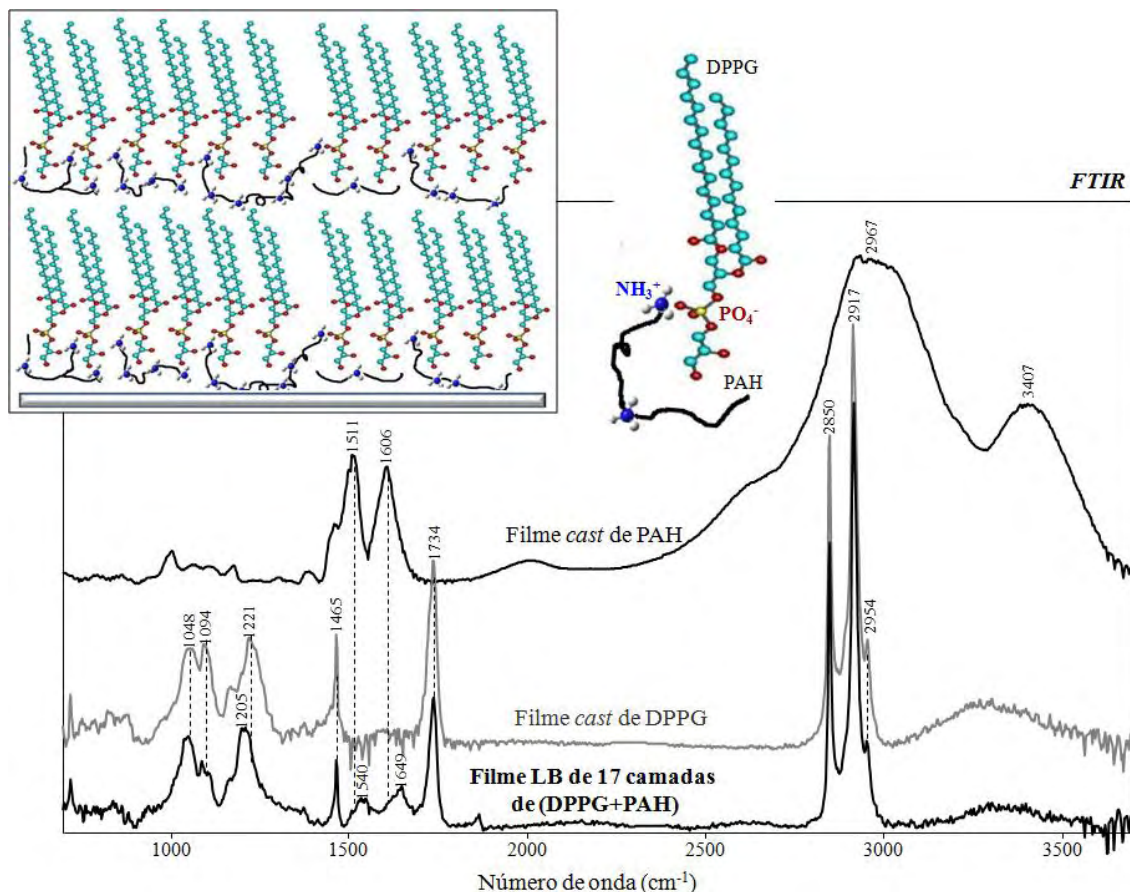


Figura 26: espectro FTIR do filme LB contendo 17 camadas de DPPG transferidas para um substrato de ZnSe com o subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH. *Detalhe:* ilustração do filme LB contendo DPPG e PAH. Os espectros FTIR dos filmes *cast* de PAH e DPPG são dados como referências.

Verifica-se que o filme LB apresenta as bandas de absorção de DPPG e PAH. No entanto, as bandas de DPPG são relativamente muito mais intensas do que as de PAH, indicando que o DPPG é o material mais abundante como inicialmente desejado. As bandas de DPPG em 2917 e 2850 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, ao estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 , enquanto as bandas menos intensas em 2954 e 2873 cm^{-1} (observável somente sob *zoom*) são atribuídas ao estiramento antissimétrico e simétrico do CH_3 . A banda em 1734 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do grupo carbonila e em 1465 cm^{-1} a deformação angular no plano do CH_2 ^{144,145}. Além disso, as bandas em 1221 e 1094 cm^{-1} para o filme *cast* de DPPG são atribuídas, respectivamente, ao estiramento simétrico e antissimétrico do PO_2^- ^{144,145,146} e em 1048

cm^{-1} ao estiramento simétrico C-O-C¹⁴⁶. Entretanto, para o filme LB de (DPPG+PAH) a banda em 1221 cm^{-1} é deslocada para 1205 cm^{-1} e a intensidade relativa da banda em 1094 cm^{-1} é diminuída. Essas variações sugerem uma interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ do PAH e PO_4^- do DPPG conforme exibido pelas isotermas π -A dos filmes de Langmuir. Considerando o filme *cast* de PAH, a banda em 3407 cm^{-1} é atribuída ao estiramento N-H, em 2967 cm^{-1} ao estiramento C-H, e em 1606 e 1511 cm^{-1} são atribuídas as deformações angulares simétrica e antissimétrica do grupo NH_3^+ , respectivamente^{125,126}. As bandas relacionadas às vibrações do NH_3^+ são deslocadas para 1540 e 1649 cm^{-1} no caso dos filmes LB de (DPPG+PAH), o que está em acordo com as interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ e PO_4^- , também observadas para os filmes LbL descritos na seção 3.1. Além disso, a números de onda mais elevados, os filmes LB de (DPPG+PAH) são completamente dominados pelo estiramento C-H do DPPG e nenhuma alteração nesta região é observada nos espectros devido à presença de PAH. Isso mostra que o grupo polar do fosfolipídio desempenha um papel fundamental no crescimento dos filmes LB contendo DPPG e PAH (*detalhe* da Figura 26).

Capítulo IV

Aplicação dos filmes Langmuir-Blodgett (LB) e layer-by-layer (LbL) como unidades sensoriais na detecção do fármaco azul de metileno (AM)

4.1. Espectroscopia de impedância

As medidas elétricas foram realizadas levando em consideração alguns detalhes experimentais em virtude da elevada sensibilidade dos eletrodos utilizados. i) Os eletrodos de Pt sem recobrimento foram testados cuidadosamente em água ultrapura para garantir respostas elétricas semelhantes, já que para esse tipo de medida é preciso ter a certeza de que as possíveis mudanças observadas nas medidas elétricas sejam atribuídas à presença dos filmes sobre o eletrodo interdigitado e não a diferenças na geometria de um interdigitado para o outro. Todos eles apresentaram respostas elétricas praticamente indistinguíveis, conforme exibido na Figura 27a. ii) Uma sequência de medidas a cada 5 minutos foi realizada com as unidades sensoriais imersas em água ultrapura para verificar a estabilização temporal do sinal elétrico devido à formação da dupla camada na interface eletrodo/eletrólito¹⁴⁷. A Figura 27b exibe a estabilização temporal obtida para um dos eletrodos de Pt ainda sem recobrimento. Os sinais elétricos começam a se sobrepor a partir das medidas realizadas em um tempo superior a 15 minutos. O mesmo padrão de estabilização dos sinais elétricos foi encontrado para os demais eletrodos de Pt. Dessa forma, os eletrodos permaneceram imersos nas soluções de AM por 20 minutos antes da aquisição dos resultados para melhor garantir uma leitura estável dos dados. iii) Após cada conjunto de medidas, as unidades sensoriais foram lavadas cuidadosamente com água ultrapura, para a remoção de possíveis moléculas de AM adsorvidas nas superfícies dos filmes. Cinco medidas independentes feitas a partir de uma solução estoque foram tomadas para cada solução, além de medidas em água ultrapura antes e depois da imersão dos eletrodos em soluções de AM, para melhor verificar uma eventual contaminação dos eletrodos.

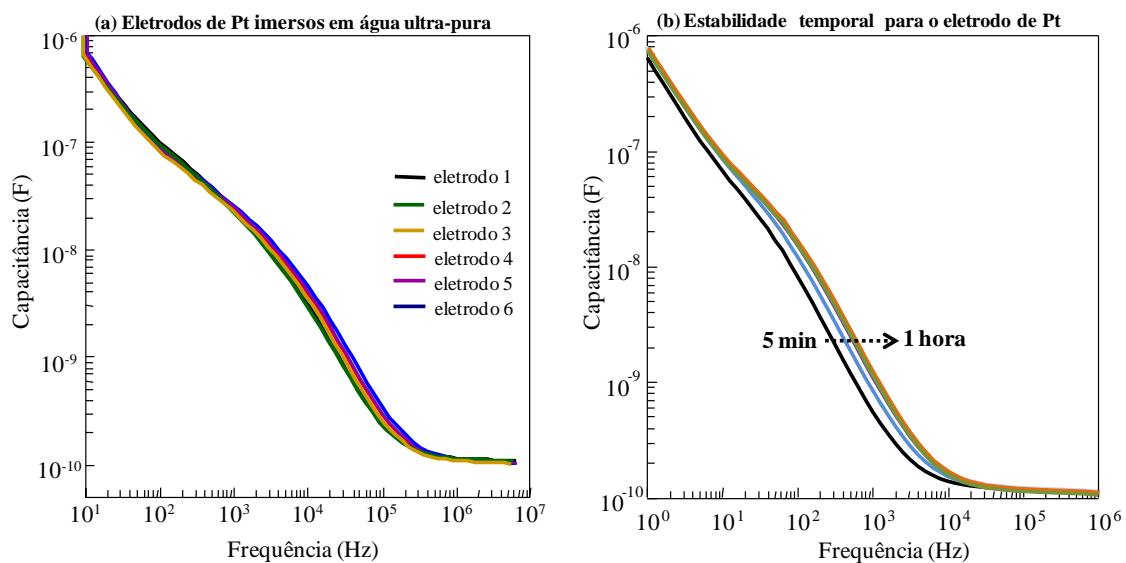


Figura 27: (a) espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para seis sensores de Pt imersos em água ultrapura. (b) Estabilidade temporal para um dos seis eletrodos de Pt quando imerso em água ultrapura.

4.1.1. Unidades sensoriais formadas por filmes LB e LbL de DPPG e DPPC

Medidas de capacitância pela frequência da tensão alternada foram realizadas para eletrodos recobertos por monocamadas LB de DPPG e DPPC e também 5 bicamadas LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG. As análises foram feitas inicialmente para a água ultrapura (água inicial) e posteriormente para soluções aquosas de AM a 0,01 nM, 0,1 nM, 1,0 nM e 10,0 nM. Os resultados obtidos são exibidos na Figura 28.

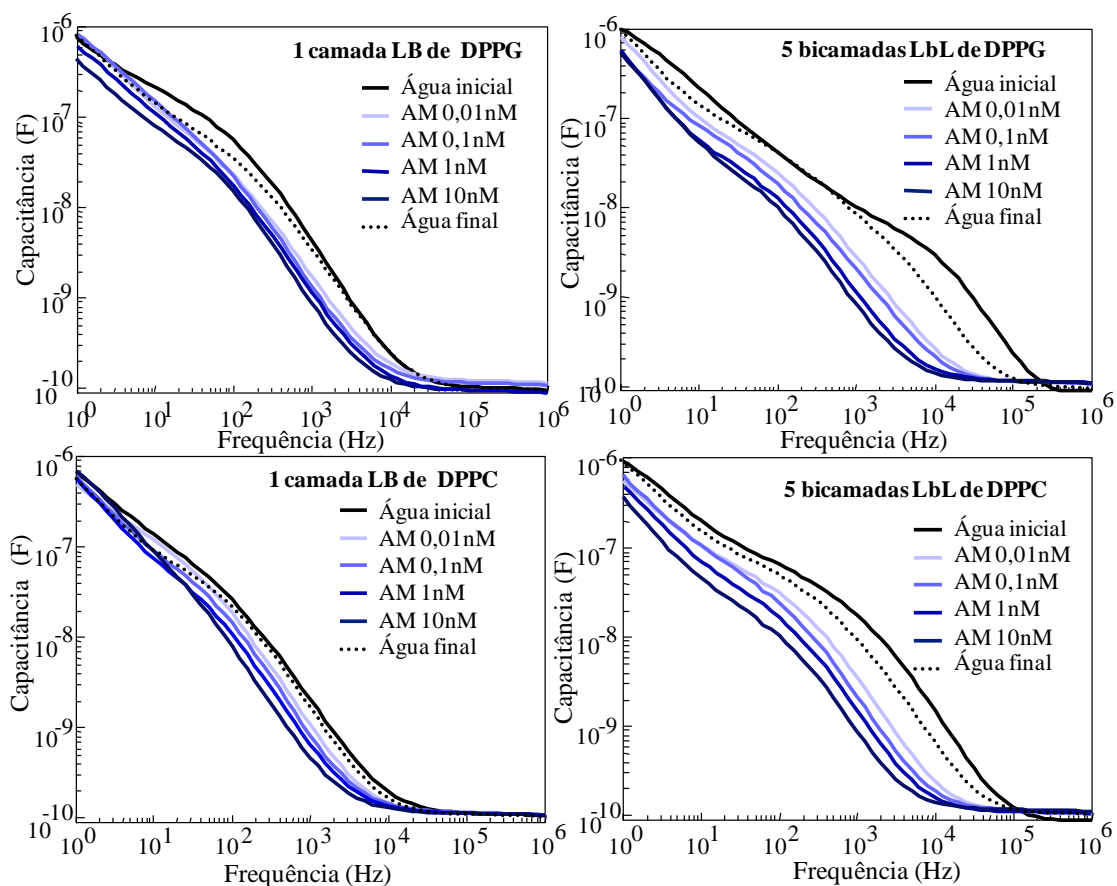


Figura 28: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais formadas por monocamadas LB de DPPG e DPPC e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG e PAH/DPPG imersas em água ultrapura antes e depois da imersão em soluções de AM a 0,01 nM; 0,1 nM; 1,0 nM e 10,0 nM.

De acordo com os resultados exibidos na Figura 28, mesmo em baixas concentrações molares os sensores foram capazes de diferenciar a água ultrapura das soluções de AM. Esse fato fica evidente à medida que a concentração de AM aumenta e se observa, para todas as unidades sensoriais, que as curvas de capacitância pela frequência da tensão alternada se deslocam para regiões de menor frequência (inferiores a 10^5 Hz). Algumas características poderiam ser destacadas: i) tal deslocamento ocorre com maior intensidade para as unidades sensoriais formadas pelos filmes LbL, possivelmente por uma questão de maior espessura dos filmes que recobrem os eletrodos interdigitados. ii) Além do efeito da espessura, ainda existe a influência da arquitetura molecular adquirida pelos fosfolipídios no filme LbL (vesículas) e LB

(monocamadas). iii) Os fosfolípidios mantêm sua atividade biológica em relação ao AM, apesar de sua interação com PAH no crescimento do filme LbL, aumentando sua eficiência como bons transdutores na detecção de AM. iv) Pode ser observado que as medidas realizadas em água antes e depois de expor as unidades sensoriais ao AM são bastante semelhantes, reforçando a possível reutilização do sensor. Vale ressaltar a alta sensibilidade do conjunto de sensores em relação às soluções de AM com alto grau de solubilidade, tendo em vista que para soluções com esse grau de diluição é muito difícil acontecer alterações no sinal elétrico.

Os dados da Figura 28 também foram analisados via PCA, que é um método matemático normalmente utilizado para localizar padrões nos dados, destacando suas semelhanças e diferenças¹⁴⁸. Para essa análise estatística, os valores de capacitância a uma dada frequência fixa de todos os espectros são inicialmente agrupados na forma de matrizes. Tal frequência é escolhida na região onde ocorre uma significativa variação entre as curvas de capacitância (~ 1 kHz neste caso). Cada matriz agrupa os resultados obtidos por todas as unidades sensoriais para uma dada solução. Cada coluna da matriz apresenta os valores de capacitância obtidos por uma unidade sensorial específica utilizada nas medidas. A título de ilustração, a Figura 29 exhibe uma das matrizes utilizadas para a geração do PCA da Figura 30. Tal matriz contém os valores de capacitância a 1 kHz obtidos para medidas realizadas em água.

Água inicial				
1.5820	4.3028	2.0934	10.0085	10.0385
1.7440	4.3029	2.0892	10.0192	10.0578
1.5493	4.1162	2.0001	10.0182	10.0432
1.5544	4.1928	2.0901	10.0201	10.0112
1.5709	4.1992	2.0892	10.0312	10.1103

Figura 29: matriz utilizada na geração de um PCA a partir dos resultados de impedância da Figura 28.

O resultado final do tratamento estatístico das matrizes é um PCA como o exibido na Figura 30, onde os dados obtidos para a água ultrapura (antes e depois das medidas em AM) e soluções de AM a 0,01 nM, 0,1 nM, 1,0 nM e 10,0 nM são correlacionados.

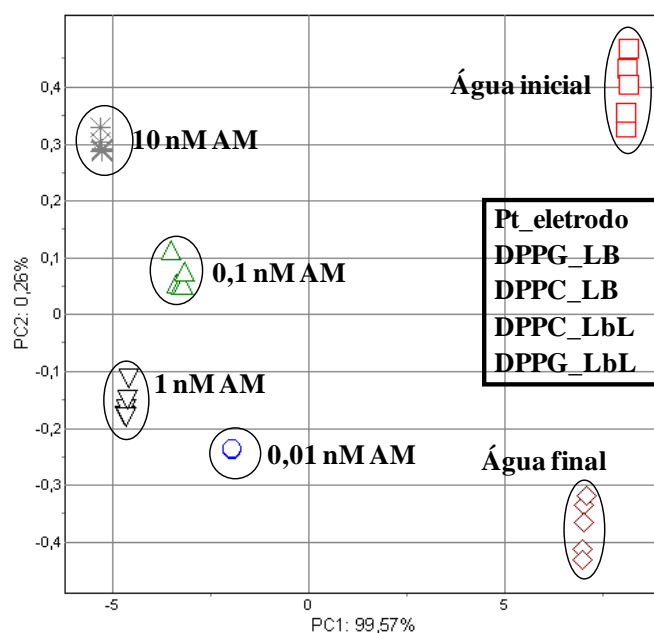


Figura 30: PCA gerado para valores de capacitância em 1 kHz para as cinco unidades sensoriais da Figura 28 imersas em água ultrapura e soluções de AM.

Uma boa distinção das soluções de AM de água foi obtida e uma boa correlação entre PC1 com a concentração de AM também foi encontrada. Quanto mais concentrados são os *clusters* de AM, mais eles se deslocam para a esquerda, ficando as

amostras de água posicionadas muito próximas umas das outras e do lado oposto do eixo PC1.

Outra forma de analisar os resultados é obtida quando se compara um PCA feito para todos os sensores utilizados nas medidas com outro PCA obtido com um sensor a menos. Este procedimento tem por objetivo inferir qual dos sensores poderia contribuir de maneira mais significativa na detecção das moléculas de AM que estão em solução, através do peso que os resultados deste sensor possui para a análise estatística. Esses resultados são apresentados na Figura 31 para a qual foram retirados da análise estatística os sensores formados pelas 5 bicamadas LbL de PAH/DPPC e PAH/DPPG.

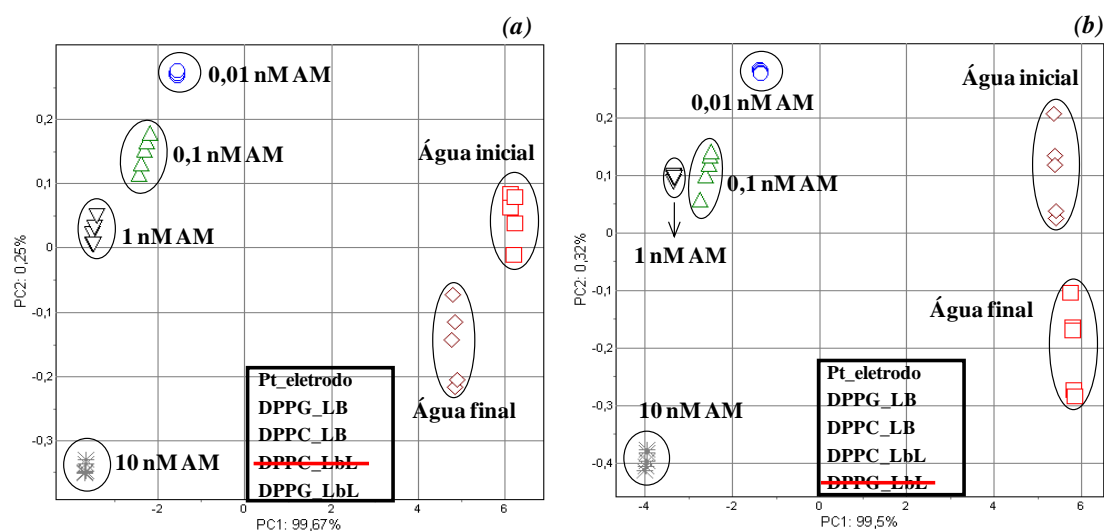


Figura 31: PCAs gerados como o apresentado na Figura 30, porém desconsiderando os resultados da unidade sensorial formada pelo filme LbL de (a) PAH/DPPC e (b) PAH/DPPG.

Alterações provocadas no padrão global obtido na Figura 31 são evidentes devido à ausência dos filmes LbL no conjunto de sensores, o que não aconteceu significativamente quando as demais unidades sensoriais foram removidas da configuração (resultados não mostrados). O filme LbL de PAH/DPPG mostrou uma

forte influência na análise global já que sua ausência provoca uma maior proximidade entre os clusters de 0,1 e 1,0 nM tanto em PC1 quanto em PC2.

4.1.2. Unidades sensoriais formadas por filmes LB e LbL de (DPPG+PAH) com diferentes espessuras

O desempenho dos filmes LB de (DPPG+PAH) como transdutores em unidades sensoriais foi avaliado por sua imersão em soluções aquosas contendo diferentes concentrações de AM. Essa metodologia foi escolhida para permitir uma comparação com os resultados precedentes (seção 4.1.1.) obtidos usando filmes LB contendo 1 monocamada de DPPG puro e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG. Dessa forma, filmes LB de (DPPG+PAH) com 1 e 5 camadas foram depositados em eletrodos interdigitados de Pt formando as unidades sensoriais. Complementarmente, unidades sensoriais foram formadas com a deposição de 1 camada LB de DPPG puro e também com 1 e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG. Essas cinco unidades sensoriais permitem comparar o efeito da espessura e arquitetura molecular dos filmes sobre a resposta de impedância. A Figura 32 exibe as curvas de frequência vs capacitância registradas para água ultrapura antes e após as medidas e para soluções aquosas de AM a 0,01 nM, 1,0 nM e 100 nM usando eletrodos de Pt sem recobrimento (referência) e as 5 unidades sensoriais descritas anteriormente.

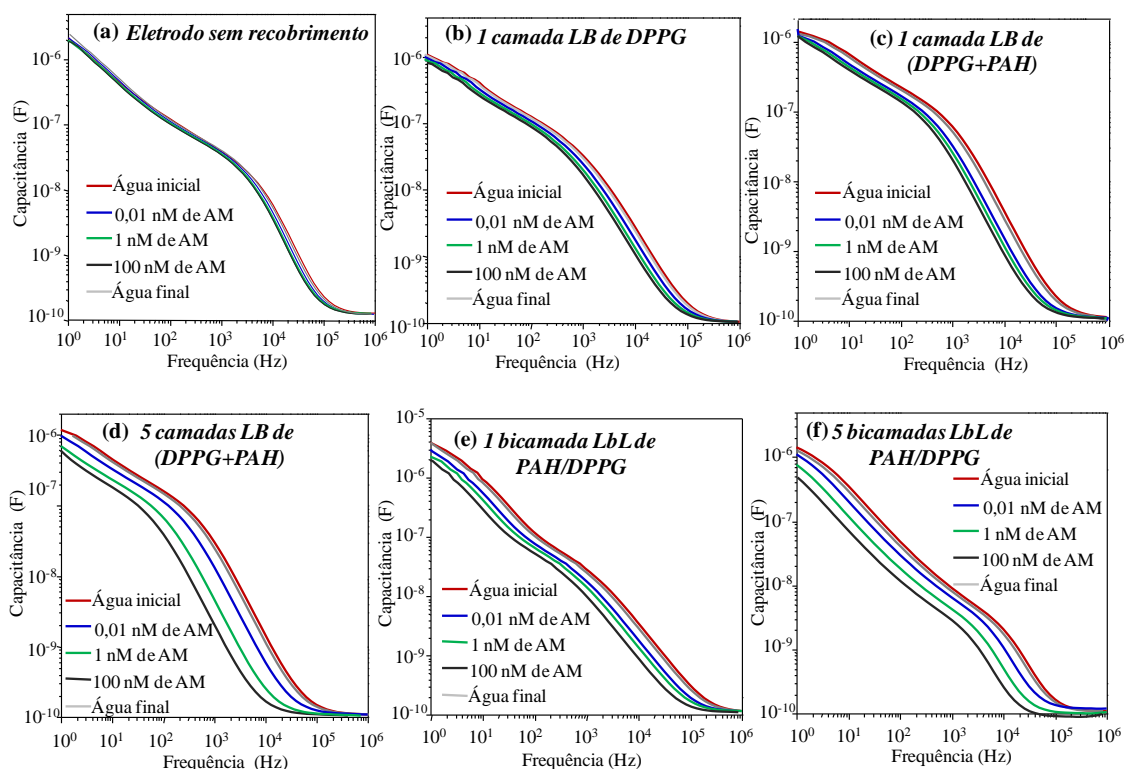


Figura 32: (a–f) espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais eletrodo de Pt, 1 e 5 camadas LB de (DPPG+PAH), 1 camada LB de DPPG e 1 e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG imersas em água antes e depois da imersão em soluções de AM a 0,01 nM; 1,0 nM e 100 nM.

Algumas informações podem ser extraídas dos dados de impedância. i) Para as medidas realizadas em água, antes e após a imersão das unidades sensoriais em AM, as curvas de capacitância são bastante similares, evidenciando a reutilização dos sensores conforme discutido previamente na seção 4.1.1. Esse resultado também indica uma fraca interação química entre o AM e os materiais que compõem as unidades sensoriais. ii) Em contraste com os eletrodos interdigitados de Pt (Figura 32a), diferenças consideráveis aparecem nos resultados de impedância com as unidades sensoriais imersas em água ultrapura e em soluções de AM, revelando que os filmes afetam a resposta elétrica dos sensores, apesar de serem ultrafinos. iii) Diferenças também são observadas entre as unidades sensoriais, mesmo em água ultrapura ou em concentrações muito baixas de AM, o que revela uma elevada sensibilidade do conjunto de sensores como um todo. Estas diferenças de uma unidade sensorial para outra podem ser

discutidas considerando tanto a espessura dos filmes (1 e 5 camadas ou bicamadas) quanto os métodos de fabricação utilizados (LB e LbL), o que levam a distintas arquiteturas moleculares. iv) Espessura: considerando os filmes LB com 1 camada (Figuras 32b e 32c), a presença de PAH melhora a capacidade da unidade sensorial em distinguir água com e sem AM. Em analogia ao que foi discutido na seção 4.1.1., o PAH provavelmente contribui porque pode produzir filmes ligeiramente mais espessos (mais material é transferido). Este efeito da espessura fica claro comparando os filmes de 1 e 5 camadas LB de (DPPG+PAH) (Figuras 32c e 32d). É evidente que o filme LB contendo 5 camadas distingue melhor as diferentes concentrações de AM. Esse mesmo efeito também é observado comparando os filmes LbL contendo 1 e 5 bicamadas de PAH/DPPG, conforme exibido nas Figuras 32e e 32f, respectivamente. No caso dos filmes LbL com apenas uma bicamada, o não recobrimento completo dos eletrodos também pode ser um fator importante. v) Por outro lado, comparando os filmes LB e LbL (Figuras 32c e 32e e Figuras 32d e 32f), observa-se que o perfil das curvas de capacitância é o principal parâmetro afetado. Mais uma vez a arquitetura molecular dos filmes finos presentes nas unidades sensoriais (vesículas nos filmes LbL e monocamadas nos filmes LB) deve ser a responsável por estas mudanças no perfil dos espectros, especialmente porque a resposta elétrica é regida por fenômenos distintos em intervalos de frequências diferentes¹⁴⁷. vi) No caso dos filmes LB depositados sobre os eletrodos de Pt, uma das principais informações é que o DPPG mantém sua atividade biológica em relação ao AM apesar da interação com PAH durante o crescimento das multicamadas LB. Informações similares foram encontradas para os filmes LbL contendo multicamadas LbL de PAH/DPPG, discutidos na subseção anterior.

Os dados de impedância também foram tratados estatisticamente através de análises PCA. A Figura 33 mostra os dados obtidos para uma frequência fixa em 10

kHz, que está em uma região onde ocorre uma variação significativa dos dados, para a água ultrapura (antes e depois das medidas em AM) e soluções de AM a 0,01 nM, 1,0 nM e 100 nM.

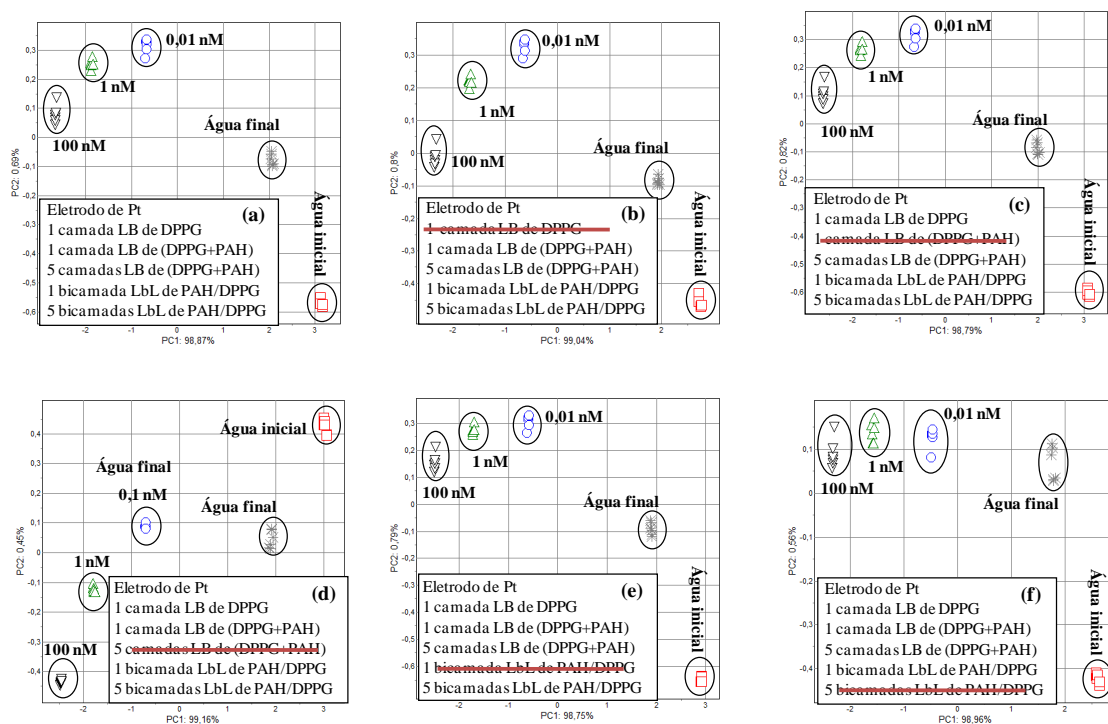


Figura 33: PCAs gerados para valores de capacitância a 10 kHz para as unidades sensoriais da Figura 32 - (a) todas as unidades sensoriais; (b) o mesmo de (a), mas excluindo uma das unidades sensoriais como destacado na própria figura.

Uma boa distinção das soluções AM de água foi encontrada e verificou-se igualmente uma boa correlação entre PC1 com a concentração de AM. Pode-se observar na Figura 33a que os *clusters* de AM mais concentrados são deslocados para esquerda enquanto as amostras de água são posicionadas próximas umas das outras do lado oposto do eixo PC1. Uma tendência semelhante é encontrada para PC2 tendo as soluções mais concentradas de AM deslocadas para a parte inferior.

A fim de avaliar a importância de cada unidade sensorial para a alta sensibilidade global, PCAs foram obtidos eliminando uma das unidades sensoriais. As Figuras 33b-33d apresentam os resultados eliminando os filmes LB e as Figuras 33e –

33f removendo os filmes LbL. Os gráficos foram ligeiramente afetados quando excluído o eletrodo interdigitado de Pt sem recobrimento e as unidades sensoriais formadas pelos filmes contendo 1 camada LB de DPPG (Figura 33b), 1 camada LB de (DPPG+PAH) (Figura 33c) e 1 bicamada LbL de PAH/DPPG (Figura 33e). No entanto, os PCAs foram significativamente afetados com a remoção dos filmes contendo 5 camadas LB de (DPPG+PAH) (Figura 33d) e 5 bicamadas LbL de PAH/DPPG (Figura 33f). Dessa forma, é possível estabelecer que esta tendência está intimamente ligada à espessura do filme como já discutido para os dados de impedância. Além disso, comparando estes dois tipos de filmes, a ausência do filme LB contendo 5 camadas de (DPPG+PAH) leva a uma mudança mais significativa no PCA reforçando o importante papel desempenhado pela arquitetura molecular dos filmes.

4.1.2. Unidades sensoriais formadas por filmes LbL de DPPG e CLP com e sem AgNP

Unidades sensoriais formadas pelo eletrodo interdigitado de Pt recoberto com 5 bicamadas LbL de PAH/CLP, PAH/DPPG, PAH/(CLP+AgNP) e PAH/(DPPG+AgNP) foram imersos em soluções de AM a baixas concentrações (100 nM, 1 nM e 0,01nM). Curvas de capacitância pela frequência da tensão alternada foram coletadas para cada solução de AM conforme exibido na Figura 34.

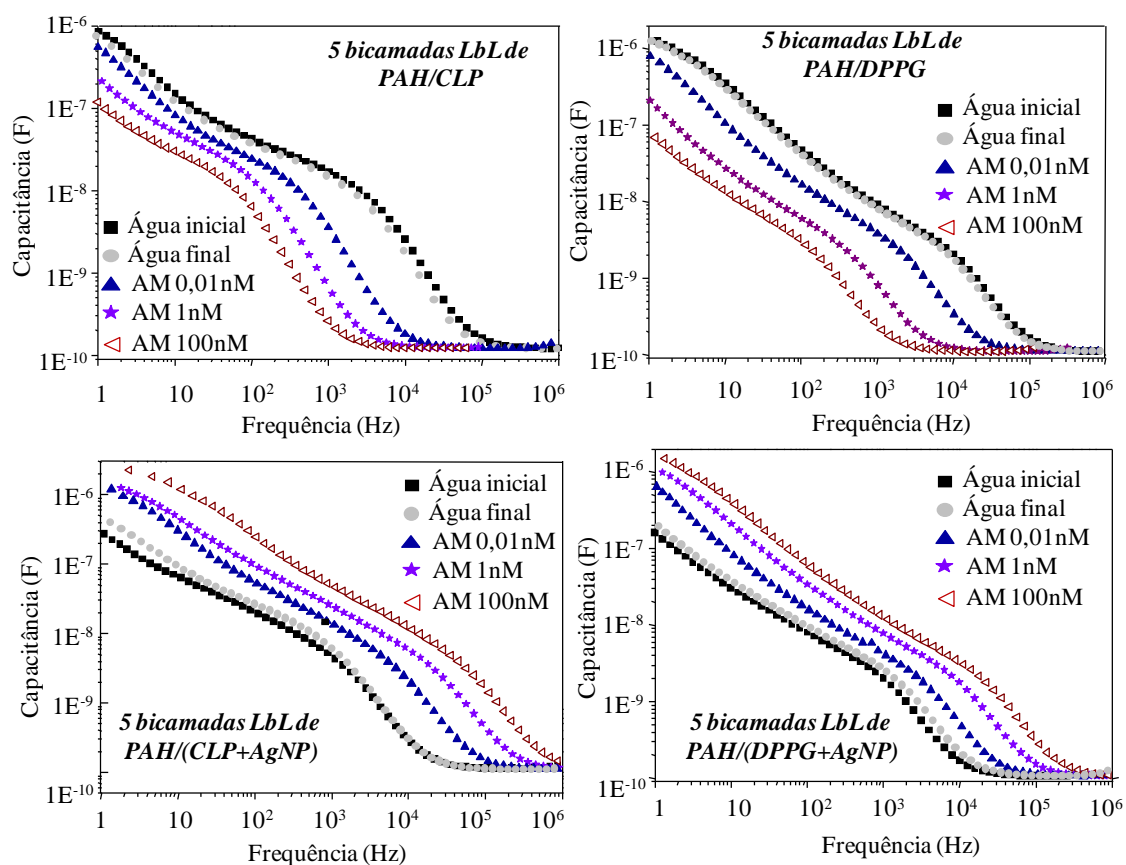


Figura 34: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) para as unidades sensoriais eletrodo de Pt e 5 bicamadas LbL de PAH/CLP, PAH/DPPG, PAH/(CLP+AgNP) e PAH/(DPPG+AgNP) imersas em água ultrapura antes e depois da imersão em soluções de AM a 100 nM; 1 nM e 0,01 nM.

De acordo com a Figura 34, os valores de capacitância tendem a aumentar com o aumento da concentração de solução de AM, enquanto para os filmes sem as AgNP essa tendência é oposta. Entretanto, o perfil geral das curvas obtidas e a sensibilidade das unidades sensoriais não foram comprometidos pela adição de AgNP nos filmes LbL. Os resultados de impedância exibidos na Figura 34 sugeriram que as amostras com diferentes concentrações de AM puderam ser distinguidas, o que foi confirmado com o PCA exibido na Figura 35a.

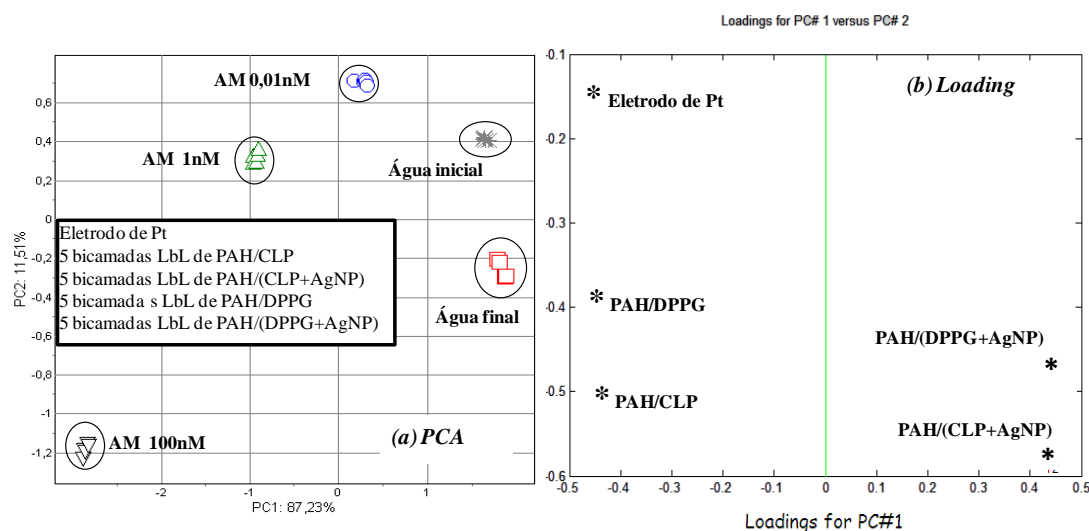


Figura 35: (a) PCA gerado para valores de capacitância a 1 kHz para as unidades sensoriais da Figura 34. (b) *Loadings* para PC1 vs PC2.

Na Figura 35a, dados do eletrodo sem recobrimento e das 4 unidades sensoriais formadas pelos filmes LbL foram combinadas, corroborando a detecção de soluções altamente diluídas de AM observada nas subseções anteriores. Além disso, uma clara tendência nos *clusters* é observada com o aumento da concentração, com uma boa correlação entre as componentes principais e concentração de AM. Complementarmente, a incorporação das AgNP na estrutura dos filmes LbL é claramente notada nas análises de *loadings* exibidas na Figura 35b, indicando sua forte contribuição para PC1, onde a maior correlação entre as amostras é estabelecida. Isso também pode ser ilustrado com as mudanças observadas nas respostas elétricas da Figura 34, em função da forte interferência trazida pelas AgNP na interface dos filmes. Uma descrição detalhada do processo pode não ser uma tarefa simples em função do comportamento coletivo governado por fracas interações em nível molecular. Como mostrado na próxima seção, os espectros SERRS revelaram que o AM adsorve na superfície dos filmes LbL e que sua interação com o meio muda a cada região analisada levando a obtenção de espectros distintos.

4.2. SERRS aplicado a análise das unidades sensoriais

Considerando a elevada seção de choque das moléculas de AM para o espalhamento Raman¹⁴⁹, as unidades sensoriais antes e depois da exposição a soluções de AM foram investigadas pela espectroscopia micro-Raman. A técnica de micro-Raman combina informações morfológicas e químicas por um microscópio óptico acoplado a um espectrógrafo Raman, que permite coletar espectros de regiões com resolução espacial de 1 micrometro¹⁵⁰. A Figura 36 apresenta as microscopias ópticas obtidas para a unidade sensorial formada por 5 camadas LB de (DPPG+PAH), antes e após a imersão em soluções de AM, assim como espectros RRS obtidos com a linha de laser em 633 nm.

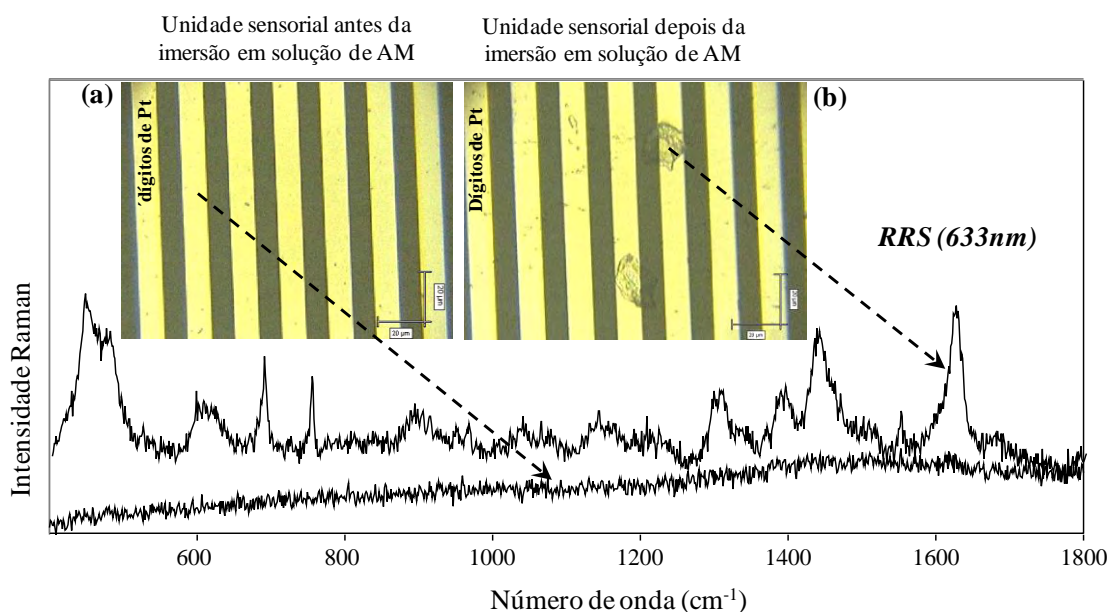


Figura 36: espectros RRS obtidos com laser em 633 nm para o filme LB contendo 5 camadas de (DPPG+PAH) depositadas sobre eletrodo interdigitado de Pt (a) antes e (b) depois da imersão nas soluções de AM utilizadas nas medidas sensoriais da Figura 32. *Detalhes* (a) e (b): imagens ópticas coletadas para a unidade sensorial antes e depois da imersão em soluções de AM, respectivamente.

Analisando os resultados, observa-se que antes da imersão da unidade sensorial nas soluções de AM (*detalhe a*), não existe qualquer tipo de agregados com dimensões micrométricas sobre a superfície do sensor. Porém, após sua imersão nas soluções de

AM foi possível observar, de acordo com o *detalhe b*, a formação de domínios moleculares ao longo de sua superfície. Para uma análise química da morfologia observada, espectros Raman foram coletados ao longo da superfície das unidades sensoriais. Verificou-se que espectros RRS podem ser obtidos apenas a partir dos domínios moleculares e que estes são atribuídos ao AM¹⁴⁹. Considerando que esse efeito de agregação foi observado para todas as unidades sensoriais utilizadas, essas variações na morfologia dos filmes quando em presença de AM podem ser responsáveis pela alta sensibilidade atingida pelas medidas realizadas.

A elevada sensibilidade de medidas sensoriais baseadas em espectroscopia de impedância é bem conhecida¹⁵¹, porém o desafio principal é compreender o motivo dessa elevada sensibilidade. Mais especificamente, a determinação da natureza das interações estabelecidas entre os filmes finos transdutores e os analitos em concentrações muito baixas (nM). Acredita-se que a composição química e a estrutura da interface entre o filme fino e a amostra líquida desempenham um papel importante na elevada sensibilidade alcançada^{152,153}. Entretanto, obter essas informações estruturais em tal nível de diluição requer técnicas capazes de combinar sensibilidade, análise química e resolução espacial, além de ser preferencialmente não destrutiva. As medidas de RRS exibidas na Figura 36, não apresentaram sensibilidade suficiente para esses pré-requisitos. Nesse contexto, o efeito SERS ou SERRS é provavelmente um dos melhores candidatos para cumprir essas exigências. Com isso, pela primeira vez na literatura reportamos o efeito SERRS e a língua eletrônica baseada nas medidas de espectroscopia de impedância acoplados¹⁵⁴, combinando sensibilidade e informação estruturais, para uma análise mais detalhada do AM adsorvido nos filmes que recobrem os eletrodos. Caracterizações foram realizadas para as unidades sensoriais contendo AgNP dispersas nos filmes LbL de DPPG e CLP. A idéia é utilizar as AgNP para ativar o efeito SERRS

do AM e assim possibilitar sua caracterização a níveis mais diluídos, conforme exibido pela ilustração da Figura 37.

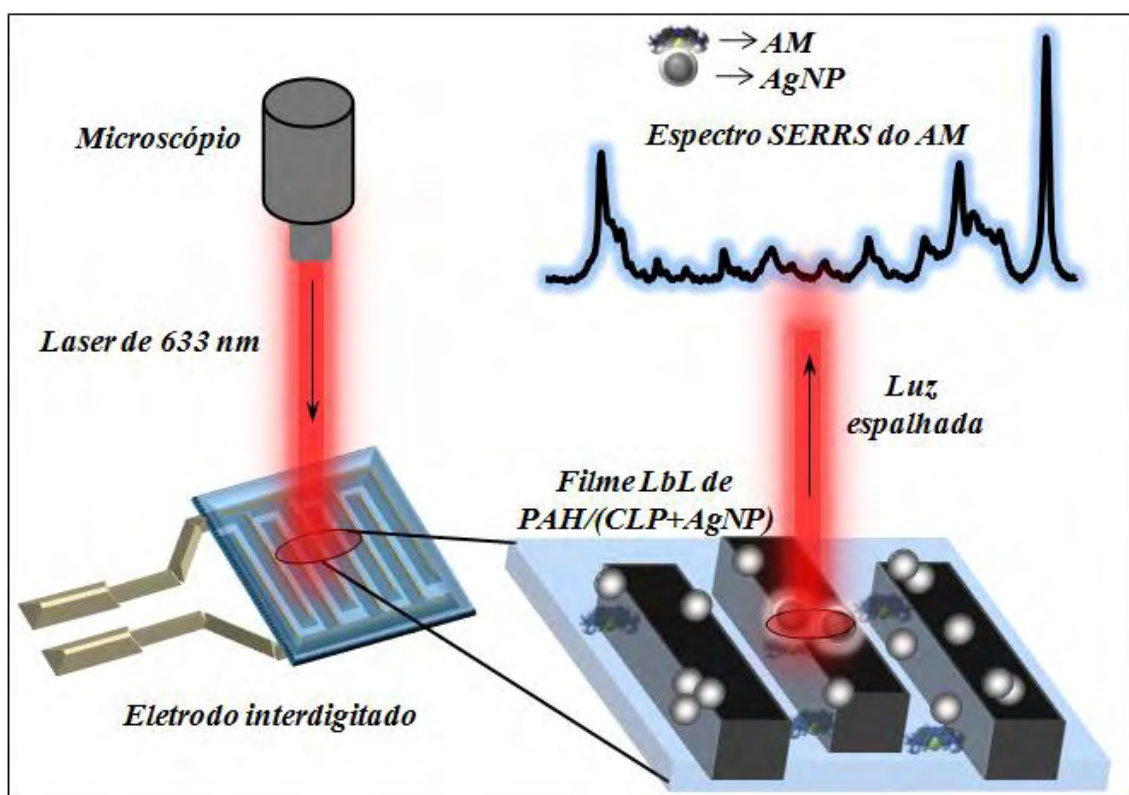


Figura 37: ilustração do procedimento experimental utilizado para coletar espectros SERRS de AM diretamente das unidades sensoriais.

A Figura 38 mostra a imagem óptica para o domínio micrométrico de AM na superfície da unidade sensorial formada pelo filme LbL de PAH/(CLP+AgNP) e uma série de espectros SERRS de AM coletados sobre esse domínio. A Figura 39 apresenta uma imagem óptica para outra região da mesma unidade sensorial, a qual não apresenta domínios micrométricos, e uma série de espectros SERRS de AM relativos a essa região. Superposto as imagens ópticas das unidades sensoriais exibidas nas Figuras 38 e 39 estão mapeamentos Raman coletados em uma área de $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$, com passo de $2 \mu\text{m}$, levando a um total de 961 espectros. Os mapeamentos Raman foram construídos plotando a intensidade da banda em 1623 e 1627 cm^{-1} , para as regiões agregadas e não

agregadas respectivamente, onde os pontos claros fazem referência às bandas Raman com maior intensidade.

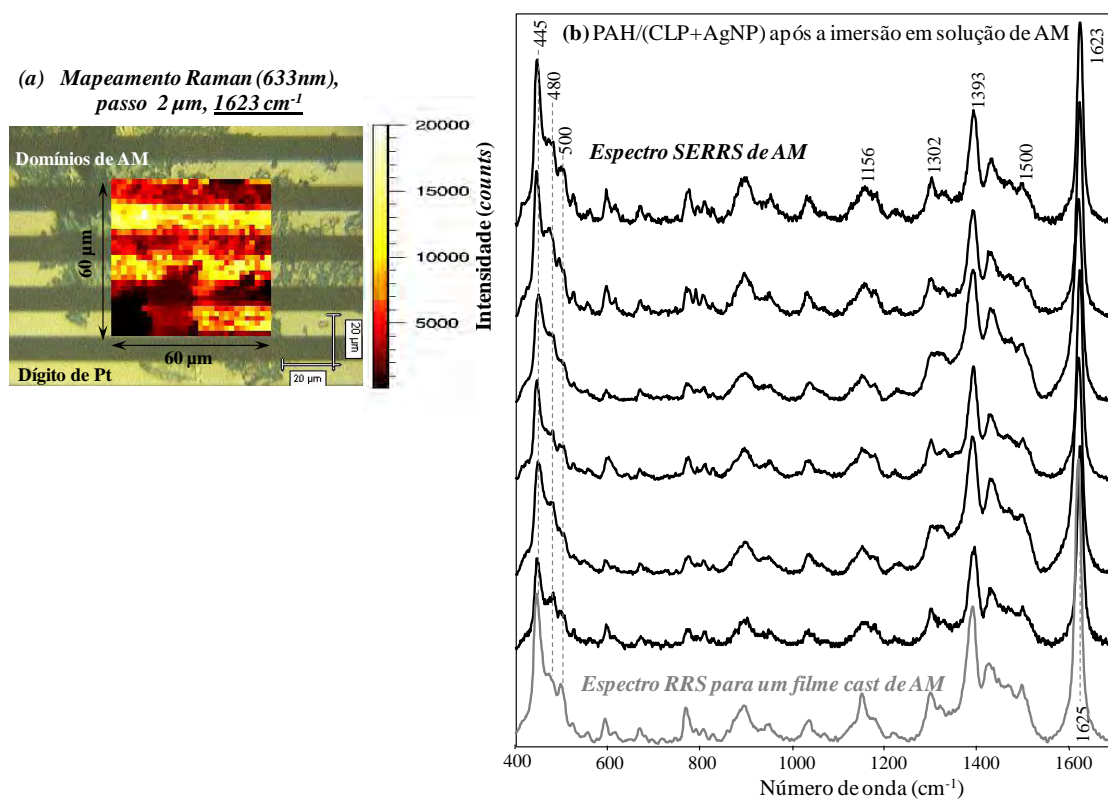


Figura 38: (a) imagem óptica e mapeamento Raman (superposto) coletados em uma área contendo um domínio micrométrico de AM para a unidade sensorial formada por 5 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AgNP). (b) Espectros SERRS de AM coletados na área exibida em (a). Laser em 633nm.

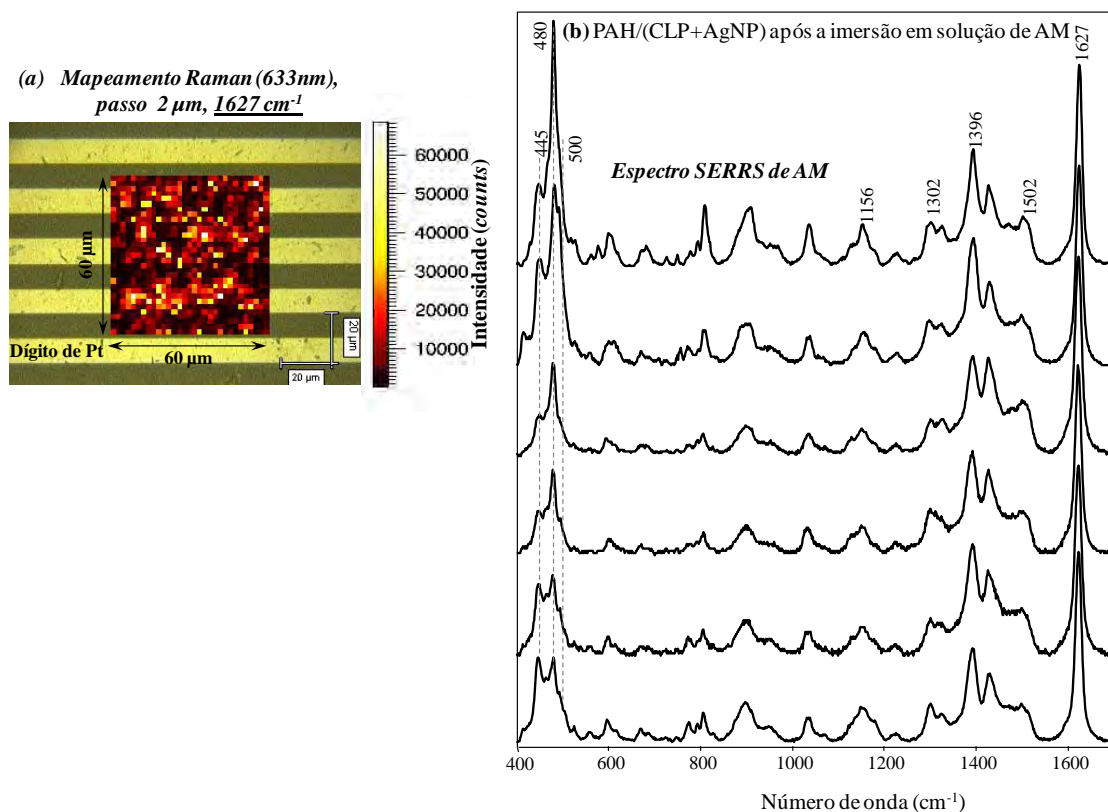


Figura 39: (a) imagem óptica e mapeamento Raman (superposto) em uma área que não contém domínios micrométricos de AM para a unidade sensorial formada por 5 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AgNP). (b) Espectros SERRS de AM coletados na área exibida em (a). Laser em 633 nm.

A partir dos resultados exibidos nas Figuras 38 e 39, as principais informações extraídas podem ser assim sumarizadas: i) os mapeamentos Raman são atribuídos a espectros SERRS de AM já que a CLP (ou DPPG) e PAH não exibem sinal SERS. Além disso, a Figura 38 exibe o espectro RRS para um filme *cast* de AM cujo perfil é similar ao do SERRS coletado para o filme LbL da unidade sensorial. ii) A intensidade SERRS para os domínios micrométricos de AM (Figura 38) segue a distribuição espacial de acordo com a imagem óptica, isto é, o sinal SERRS é mais forte onde são vistos domínios de AM. De fato, já que esses espectros são dos domínios de AM, os quais não estão necessariamente em contato com as AgNP, pode-se especular que os espectros são RRS ao invés de SERRS. iii) Por outro lado, nas regiões sem domínios micrométricos (Figura 39), o espectro de AM faz referência a SERRS e deve seguir a

distribuição espacial das AgNP. Essa proposição é baseada no fato de que os espectros SERRS não foram observados para regiões sem a presença de domínios micrométricos de AM em unidades sensoriais formadas por filmes sem AgNP. Além disso, considerando que o fenômeno SERRS é fortemente dependente da distância de separação entre a molécula alvo e as nanopartículas metálicas^{155,156}, o AM deve estar próximo o suficiente das AgNP para ter o espectro SERRS ativado. iv) São pequenas as diferenças em termos de número de onda a baixas frequências vibracionais entre os espectros SERRS das regiões com e sem domínios micrométricos de AM. As diferenças observadas estão relacionadas ao nível de agregação do AM nestas regiões. Essa agregação pode ser determinada a partir da intensidade relativa das bandas em 450 e 500 cm^{-1} . A distinção entre monômeros e agregados¹⁵⁷ (dímeros, trímeros, etc) é feita principalmente baseada na intensidade relativa da banda em 480 cm^{-1} , a qual cresce para monômeros quando comparada com as bandas em 450 e 500 cm^{-1} . Conseqüentemente, a região com domínios micrométricos contém em maioria agregados de AM enquanto a região sem domínios micrométricos é dominada por monômeros de AM. Entretanto, é importante mencionar que as diferenças encontradas nos espectros SERRS de AM não são desprezíveis; especialmente para a região sem domínio micrométrico de AM (AM mais “diluído” na matriz de fosfolípido)

Os espectros revelam o quão susceptível a molécula de AM é em relação ao seu entorno. Essa variação espectral SERRS vem sendo observada em trabalhos com sistemas altamente diluídos em regimes de uma única molécula¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Isso sugere que, apesar do AM possuir dois espectros SERRS distintos relacionados ao espalhamento inelástico da luz por monômeros e agregados, ao alcançar sistemas altamente diluídos - se aproximando do regime de uma única molécula - os espectros SERRS podem variar significativamente dependendo do meio onde o AM se encontra. Nesse sentido, vale

ressaltar que para concentração de AM a 0,01 nM, o número de moléculas por pL (10^{-12} L) é estimada em aproximadamente 6. A escala de pL foi escolhida pois essa é a ordem de grandeza do volume provável do laser em experimentos de detecção de uma única molécula: um volume de 30 pL foi reportado por Kneipp *et al.*¹⁶¹, 2,5 pL por Delfino *et al.*¹⁶² e 0,0314 pL por Zhang *et al.*¹⁶³. Em trabalhos anteriores de nosso grupo foi reportado 1 pL¹⁶⁴, trabalhando com a linha de laser em 514,5 nm (objetiva de 50x e NA 0,75) para a detecção de uma única molécula de derivados de perilenos em colóides de Ag ou Au. v) Como já mencionado anteriormente (item iii), o sinal RRS não foi detectado para regiões sem domínios micrométricos de AM em filmes LbL sem AgNP, evidenciando assim o papel desempenhado pelo fenômeno de amplificação em superfície. Além disso, imergindo os filmes LbL em soluções aquosas contendo AM, mesmo em soluções mais concentradas do que as usadas para as medidas de espectroscopia de impedância, nenhuma diferença foi detectada pelos espectros de absorção UV-Vis e FTIR.

Uma estimativa para o fator de amplificação pode ser feita considerando a razão SERRS/RRS para qualquer uma das bandas do espectro. Na Figura 40 é exibido um comparativo entre as intensidades de um espectro SERRS e outro RRS.

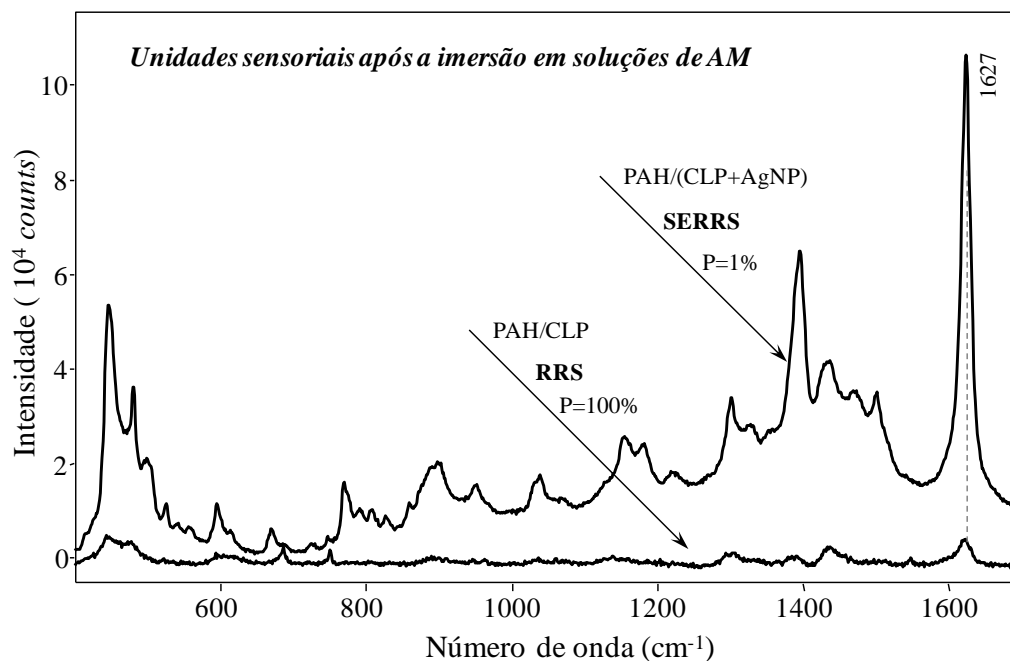


Figura 40: espectros SERRS e RRS coletados para as unidades sensoriais formadas por 5 bicamadas LbL de PAH/CLP e PAH/(CLP+AgNP) após a imersão em soluções de AM. Laser em 633 nm.

De acordo com a Figura 40, foi determinado que a razão SERRS/RRS para a banda em 1627 cm^{-1} é de $105.640\text{counts} / 5.200\text{counts}$. Considerando que os espectros SERRS foram coletados com 1% da potência do laser e que os espectros RRS foram coletados com 100% de potência, o fator de amplificação pode ser estimado como

$$\left(\frac{105,640\text{counts} * 100\%}{5,200\text{ counts} * 1\%} \right).$$

Essa estimativa leva a uma amplificação em torno de $\sim 10^3$,

que está de acordo com os fatores de amplificação previstos pelo mecanismo eletromagnético¹⁶⁵. Complementarmente, deve ser mencionado que a concentração de moléculas de AM não foi considerada nessa estimativa. Caso contrário, o fator de amplificação deveria ser ainda maior, já que os espectros RRS foram coletados em regiões com elevada concentração de moléculas de AM (domínios) e os espectros SERRS em regiões de baixa concentração.

4.3. Detecção de uma única molécula (SMD)

4.3.1. Detecção de uma única molécula de AM em solução

Para as medidas de detecção de uma única molécula (SMD) de AM em meio aquoso, inicialmente foram realizadas medidas de absorção UV-Vis para soluções aquosas em diferentes concentrações, visando inferir o estado de agregação de AM (monômeros ou agregados). É importante garantir que, para as soluções utilizadas nas medidas de SMD, o AM se encontre na sua forma monomérica ao invés de agregados. A Figura 41 exibe o espectro de absorção UV-Vis para solução aquosa de AM a 10^{-6} M e colóides de Ag. O espectro de fluorescência coletado para solução aquosa de AM a 10^{-6} M utilizando a linha de laser em 633nm, também é exibido na mesma figura.

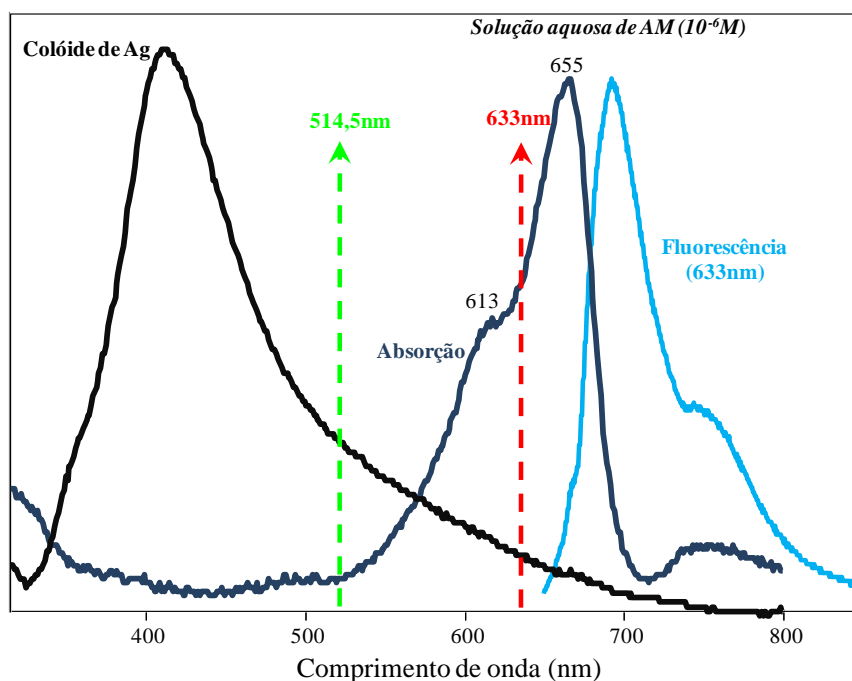


Figura 41: (a) espectro de absorção UV-Vis para solução de AM a 10^{-6} M e colóides de Ag. Também é exibido o espectro de fluorescência coletado para a mesma solução de AM utilizando laser em 633nm.

De acordo com o espectro de absorção UV-Vis, exibido na Figura 41, observam-se duas principais bandas de absorção com máximos em 613 e 655 nm, atribuídas a transições $\pi-\pi^*$ de dímeros e monômeros, respectivamente¹⁴⁹. Para esta concentração, a

banda em 655 nm prevalece em relação à banda em 613 nm indicando que o AM se encontra predominantemente na sua forma monomérica. Esse resultado está de acordo com os trabalhos reportados por Jockusch *et al.*¹⁶⁶, Severino *et al.*¹⁶⁷ e Varga *et al.*¹⁶⁸, que demonstram o predomínio de AM na sua forma monomérica para soluções com concentração da ordem de 10^{-6} M. Considerando que as soluções de AM utilizadas para o SMD são várias ordens de grandeza menos concentrada, é esperado que a forma monomérica do AM continue prevalecendo. Para que se observe o efeito SERS do AM quando em presença dos colóides de Ag, foi utilizado a linha de laser em 514,5 nm que está em ressonância com a absorção dos colóides. No caso de completa ressonância com a absorção eletrônica do AM, para a linha de laser em 633 nm, espectros de fluorescência são obtidos como apresentado na Figura 41.

As amostras utilizadas para o SMD foram preparadas a partir de uma solução estoque de AM a 10^{-9} M, a qual foi diluída diretamente em solução de colóide para concentrações de $1,6 \times 10^{-10}$; $1,6 \times 10^{-11}$ e $1,6 \times 10^{-12}$ M. Nestas concentrações estima-se que em média 100, 10 e 1 molécula de AM esteja presente em 1 pL, que é a ordem de magnitude do volume provável de espalhamento do laser. Do total de Ag presente na solução de colóide, segundo o trabalho de Kneipp *et al.*¹⁶¹ foi estimado que o número de *clusters* individuais de Ag no volume de espalhamento está em torno de 100. Dessa forma, supõe-se que o movimento *browniano* destes clusters de Ag transporta as moléculas de AM para dentro e para fora do volume de espalhamento. O tempo de permanência média de uma partícula no volume de espalhamento pode ser grosseiramente estimado entre 10 e 20 segundos¹⁶¹, o qual é pelo menos 10 vezes maior que o tempo de medição. Por isso, é mais provável que todo espectro Raman de uma única molécula seja gerado pela mesma molécula e que todas as propriedades do espectro seja função das propriedades individuais dessa molécula.

A Figura 42a exibe os espectros SERS de AM coletados para soluções de AM mais concentradas (10^{-5} e 10^{-6} M), obtidas com a diluição de uma solução aquosa de AM a 10^{-4} M diretamente em solução de colóide. A Figura 42b trás os espectros SERS obtidos para soluções de AM a concentrações de $1,6 \times 10^{-10}$; $1,6 \times 10^{-11}$ e $1,6 \times 10^{-12}$ M (100, 10 e 1 molécula por pL). Uma sequência de 100 espectros SERS para a solução de 10^{-5} M e 20 espectros para a solução de $1,6 \times 10^{-10}$ M são exibidos nas Figuras 42c e 42d, respectivamente.

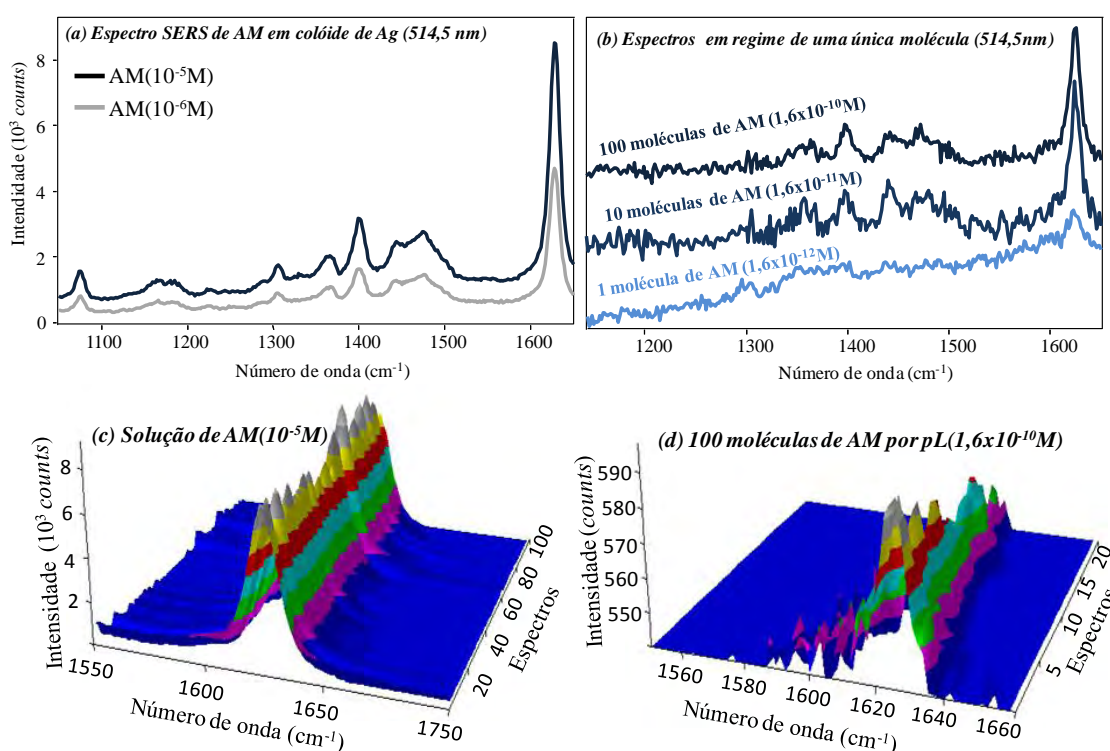


Figura 42: espectros SERS coletados para soluções de AM, diluídos diretamente em colóide, a concentrações de (a) 10^{-5} e 10^{-6} M; (b) $1,6 \times 10^{-10}$; $1,6 \times 10^{-11}$ e $1,6 \times 10^{-12}$ M (100, 10 e 1 molécula por pL). (c) Sequência de 100 espectros SERS, plotados em 3D, para a solução de AM a 10^{-5} M. (d) Sequência de 20 espectros (3D) coletados para a solução de AM a $1,6 \times 10^{-10}$ M. Laser em 514,5 nm.

De acordo com os resultados exibidos, a intensidade dos espectros diminui com a diminuição da concentração das soluções de AM, o que é esperado já que o número de moléculas de AM presente no volume de espalhamento diminui. No caso das soluções mais concentradas (10^{-5} e 10^{-6} M), além da elevada intensidade, os espectros mostraram-

se bastante reprodutíveis, conforme apresentado pelos 100 espectros coletados sequencialmente exibidos em 3D na Figura 42c. Quando o regime de uma única molécula é atingido, uma forte diminuição na intensidade absoluta das bandas é observada. A única banda predominante nos espectros está em torno de 1625 cm^{-1} e apresenta uma grande variação em termos de deslocamento em número de onda, intensidade absoluta e largura de banda, o que é característico em estudos de uma única molécula em virtude da susceptibilidade desta molécula a variações em seu entorno. Essa variação pode ser observada na Figura 42d, onde 20 espectros atribuídos a 100 moléculas de AM foram plotados em 3D.

4.3.2. Detecção de uma única molécula de AM em filmes LB

Considerando que a área média do foco dos lasers utilizados para as medidas de micro-Raman é de $1\mu\text{m}^2$, para o SMD é preciso que sobre esta área exista apenas uma única molécula de AM. Nesse sentido a técnica LB é a melhor opção para esses requisitos, pois proporciona controle em nível molecular. Entretanto, é importante ressaltar que o AM é uma molécula solúvel em água e, portanto, não é possível a formação espontânea de filmes de Langmuir nesse caso. Dessa forma, a idéia é tirar proveito da interação AM-DPPG, discutida em detalhes no capítulo V, para que se possa depositar filmes LB contendo AM disperso em uma matriz de DPPG em diversas proporções moleculares, até que o regime de uma única molécula seja atingido. A Figura 43a exibe os espectros de absorção UV-Vis para o filme PVD contendo 9 nm de Ag, além de monocamadas LB, depositadas sobre quartzo, contendo diversas proporções moleculares de AM disperso em matriz de DPPG (AM:DPPG em moléculas: 4:1, 1:1, 1:2, 1:5). A Figura 43b exibe a imagem de AFM obtida para o filme evaporado de Ag contendo 9 nm de espessura.

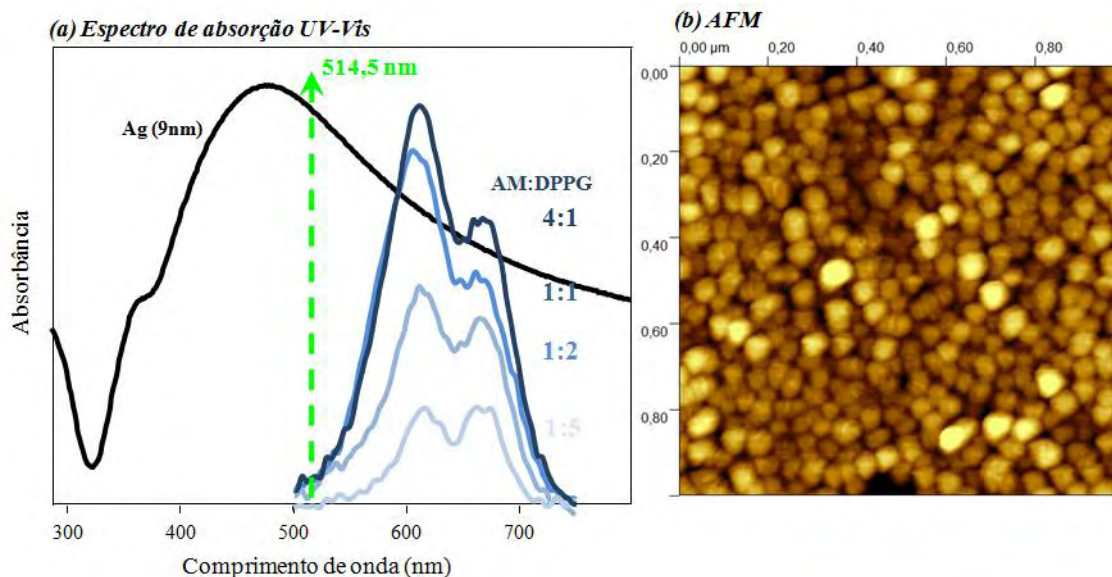


Figura 43: (a) espectros de absorção UV-Vis para o filme PVD contendo 9 nm de Ag, além de espectros obtidos para monocamadas LB depositadas sobre quartzo para diferentes proporções moleculares de AM (AM:DPPG = 4:1, 1:1, 1:2, 1:5 moléculas). (b) Imagem de AFM para o filme PVD de 9 nm de Ag.

De acordo com os espectros de absorção obtidos para as monocamadas LB, é possível afirmar que a interação AM-DPPG estabelecida na interface ar/água é suficiente para promover a deposição do AM juntamente com o DPPG, durante a formação dos filmes LB. Além disso, à medida que a proporção molecular de AM aumenta, a banda em 610 nm passa a predominar o espectro, indicando que o AM prevalece na sua forma agregada. No caso do filme PVD de nanopartículas de Ag, observa-se um largo espectro de absorção que cobre toda a escala do visível com máximo em 488 nm, o que indica uma distribuição relativamente grande de tamanho, morfologia e agregação das partículas¹⁰¹. A linha de laser em 514,5 nm utilizada também está em ressonância com a absorção eletrônica do filme de nanopartículas de Ag, o que é condição necessária para a ativação do efeito SERS. Com relação à morfologia, imagens de AFM foram coletadas para uma área de 1 μm x 1 μm , a qual corresponde aproximadamente à área média do foco do laser. A imagem exibida na Figura 43b demonstra uma distribuição não homogênea das partículas com tamanhos

variando entre ~20 e 80 nm, o que está de acordo com os resultados de absorção UV-Vis.

Para as análises SERS de AM, uma amostra contendo uma proporção de 1:2 moléculas de AM em relação ao DPPG foi fabricada. Essa razão resulta em uma monocamada de DPPG contendo $1,25 \times 10^6$ moléculas de AM/ μm^2 , que foi posteriormente depositada sobre o filme evaporado de Ag. Os espectros SERS foram coletados utilizando a linha de laser em 514,5 nm e um mapeamento Raman é exibido na Figura 44, onde uma área de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, com um passo de $3 \mu\text{m}$ (total de 1156 espectros) foi analisada. Os mapeamentos Raman foram construídos plotando a intensidade da banda em 1625 cm^{-1} , onde os pontos claros fazem referência às bandas Raman com maior intensidade.

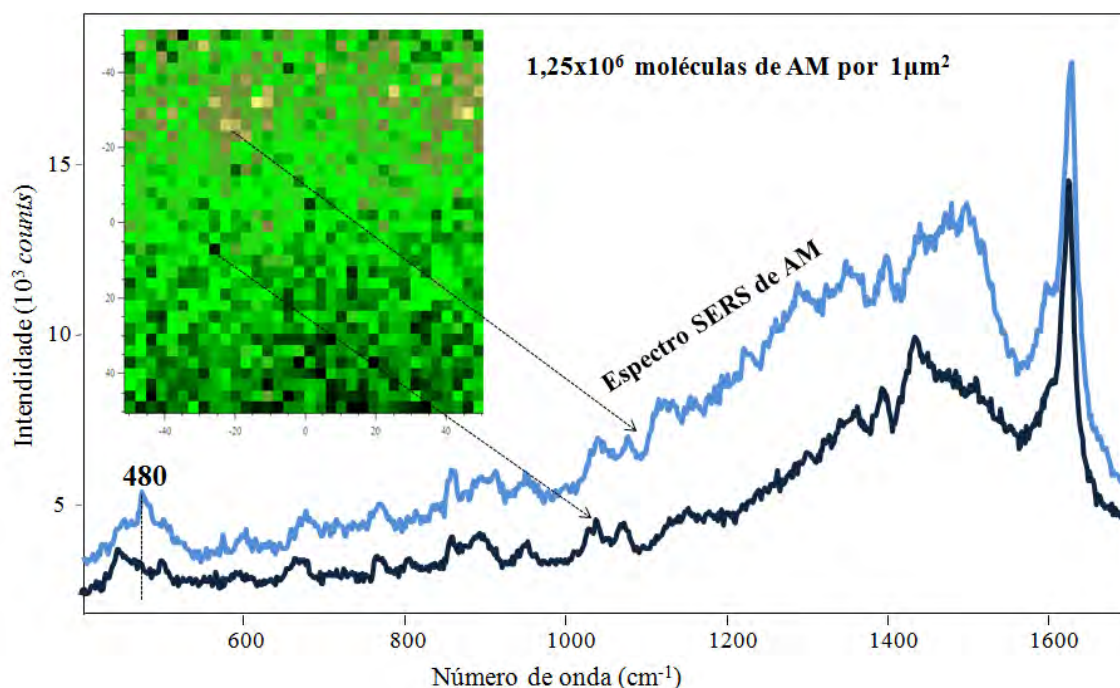


Figura 44: mapeamento Raman, área de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ e passo $3 \mu\text{m}$, obtido para a monocamada LB contendo AM disperso em matriz de DPPG a uma proporção molecular de 1:2 (AM:DPPG). Laser em 514,5 nm.

É possível observar apenas uma pequena variação na intensidade absoluta dos espectros, garantindo que o AM ligado ao DPPG é depositado de maneira homogênea,

ou seja, há AM em todos os pontos do filme dentro de uma escala micrométrica. Outra informação importante a ser observada é o estado de agregação em que o AM se encontra nessa proporção (1:2) utilizada para a deposição de filme LB. Foi verificado, a partir da variação da intensidade da banda em 480 cm^{-1} em relação às bandas em 450 e 500 cm^{-1} , que é possível encontrar o AM tanto na sua forma agregada quanto na sua forma monomérica, conforme exibido pelos espectros SERS da Figura 44. Esse resultado corrobora os espectros de absorção UV-Vis onde, para a proporção de 1:2 moléculas de AM em relação às de DPPG, as bandas de absorção de dímeros (610 nm) e monômeros (660 nm) possuem valores de intensidade similares, sugerindo a coexistência dessas duas formas de organização do AM no filme LB.

Para a aquisição de espectros de uma única molécula, amostras foram fabricadas contendo 100, 10 e 1 molécula de $\text{AM}/\mu\text{m}^2$. Estudos mostram que mesmo as concentrações superficiais mais elevadas, os eventos de uma única molécula ainda são observados¹⁶⁹. No caso do AM, essas concentrações superficiais de moléculas/ μm^2 (100, 10 e 1) são os valores máximos em que o material pode ser encontrado. Considerando que o AM é um fármaco solúvel em água, parte dessas moléculas pode estar sendo solubilizada pela subfase, ao invés de se ligar com o DPPG durante a formação do filme de Langmuir. Em termos da agregação do AM, sabe-se que em soluções altamente diluídas o mesmo se encontra na sua forma monomérica, conforme discutido na seção anterior. Os mapeamentos Raman foram coletados a baixas potências de laser ($\sim 20\ \mu\text{W}$) para evitar possíveis fotodegradações. Os espectros foram coletados a cada $3\ \mu\text{m}$, em uma área de $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ (total de 1156 espectros) para evitar qualquer contribuição proveniente da sobreposição de áreas. Os mapeamentos de SMD foram gerados com base na correspondência espectral de um conjunto representativo de espectros de AM. Apenas os pontos com maior coincidência com base no seu grau de

similaridade com o espectro de referência são distinguidos. Após a construção dos mapeamentos de SMD cada ponto de destaque ainda foi examinado, com base em seu caráter espectral, para a eliminação de falsos positivos. Os mapeamentos de SMD para 100, 10 e 1 molécula de AM/ μm^2 são exibidos na Figura 45, onde os pontos claros correspondem aos espectros de uma única molécula.

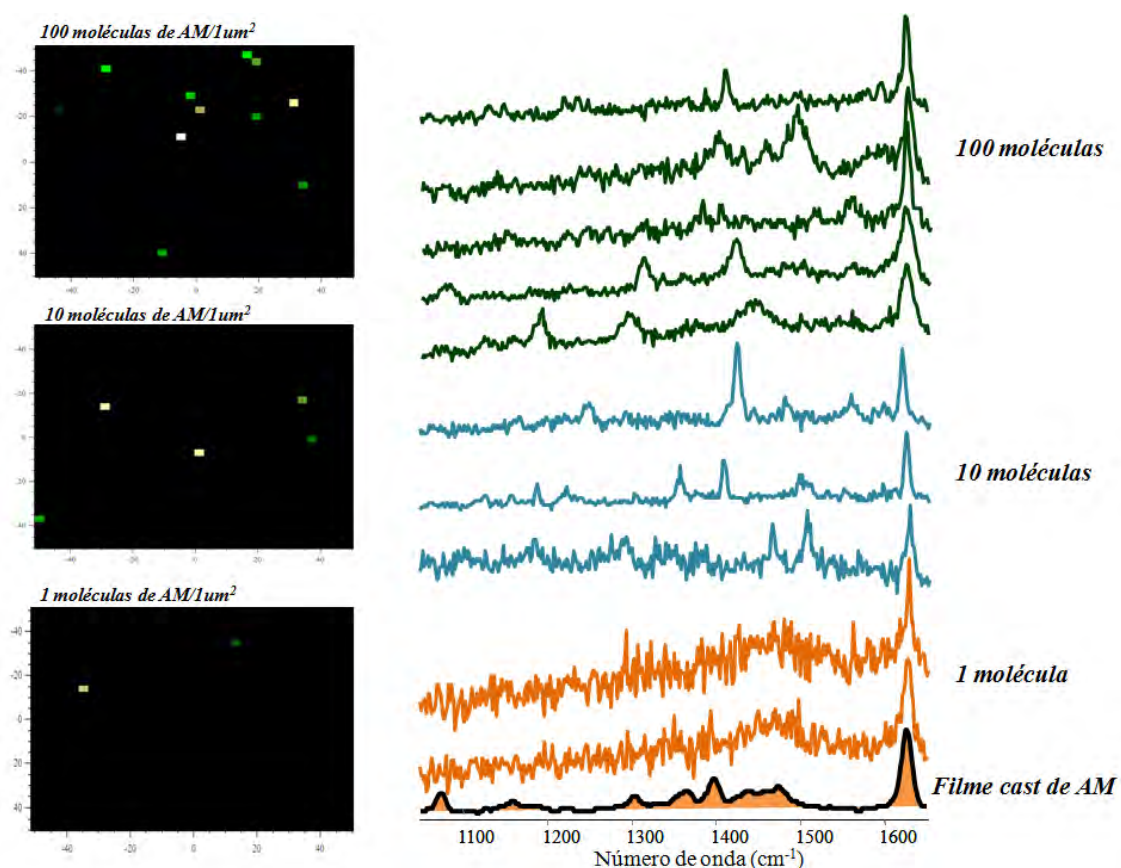


Figura 45: mapeamentos Raman para as monocamadas LB contendo 100, 10 e 1 molécula de AM/ μm^2 dispersa em matriz de DPPG. Foram analisadas áreas de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, com um passo de $3 \mu\text{m}$ levando a um total de 1.156 espectros. Laser em 514,5 nm.

De acordo com a Figura 45, foi observado que o número de eventos de uma única molécula diminui com a redução do número de moléculas/ μm^2 , o que é esperado já que a probabilidade de encontrar uma única molécula também é menor. Além disso, o número de bandas presentes para o caso de 1 molécula de AM/ μm^2 é muito menor do que o observado para as demais concentrações superficiais e uma forte variação é

observada para todos os parâmetros incluindo a largura de banda, o perfil de banda, o deslocamento Raman e a intensidade relativa e absoluta das bandas, similar ao que foi encontrado para as unidades sensoriais discutidas na seção 4.4. Esse comportamento é comumente observado em estudos de uma única molécula e tem sido atribuído a diferenças locais do meio que a molécula alvo experimenta¹⁷⁰. Essas variações ilustram a sensibilidade dos espectros SERS a perturbações e o potencial apresentado pela molécula em reportar seu entorno. É importante ressaltar que, apesar de depositar aproximadamente 1 molécula de AM/ μm^2 sobre toda a superfície do substrato contendo o filme evaporado de Ag, não se observa o sinal de todas essas moléculas. Isso ocorre, pois, a máxima amplificação do sinal SERS, necessária para a SMD, ocorre somente quando a molécula está posicionada nos chamados *hot spots*, que não são distribuídos homogeneamente ao longo de todo o filme.

Capítulo V

*Estudo da interação entre fosfolipídios e o
fármaco azul de metileno (AM)*

5.1. Filmes de Langmuir fabricados com e sem a presença de AM

Filmes de Langmuir formados por fosfolipídios aniônicos (CLP e DPPG) e zwitteriônicos (DPPC e DOPC) foram fabricados na tentativa de verificar a sensibilidade das isothermas π -A à presença de AM em diversas concentrações. Por meio de deslocamentos nas isothermas é possível identificar mudanças no empacotamento das moléculas de fosfolipídios nos seus diversos estágios de compressão em função da concentração de droga incorporada. As Figuras 46a e 46b apresentam, respectivamente, as isothermas π -A de DOPC e DPPC para diferentes razões moleculares de AM (de 10:1 até 1:4 moléculas de fosfolipídio:AM) incorporadas durante o co-espalhamento.

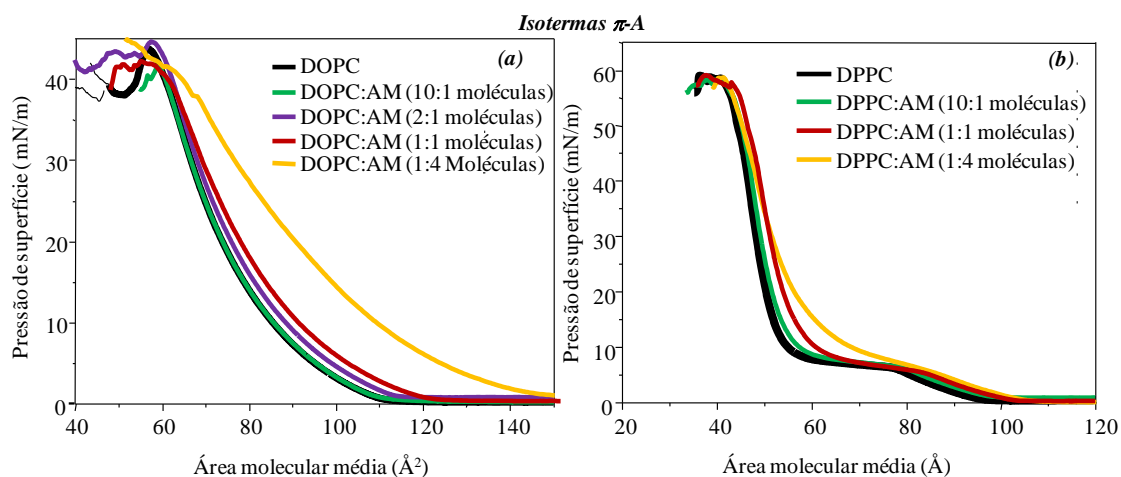


Figura 46: (a) isothermas π -A de DOPC co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DOPC:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. (b) Isothermas π -A de DPPC co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DPPC:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C.

De modo geral, pode-se observar que o aumento de concentração de AM na monocamada provoca um deslocamento das isothermas π -A para maiores áreas³, resultante da interação entre as moléculas de fosfolipídio e AM. Este efeito torna-se significativo para razões acima de 2:1 para DOPC:AM e 10:1 para DPPC:AM. Porém, tal deslocamento é observado apenas quando os filmes de Langmuir se encontram em

sua fase líquida, onde as moléculas de fosfolipídios não se encontram totalmente empacotadas. Uma vez que um elevado empacotamento molecular é atingido, correspondente a fase condensada da monocamada, as isotermas π -A são coincidentes com aquelas coletadas sem a presença de AM. Este comportamento pode ser discutido com base no fato de que o AM possui uma carga elétrica positiva (catiônica) e os fosfolipídios, acima citados, são eletricamente neutros. Desse modo, a interação eletrostática existente entre estas moléculas é fraca, fazendo com que as moléculas de AM não se liguem fortemente com as moléculas dos fosfolipídios. A partir do momento em que a fase condensada é atingida, a pressão de superfície é suficiente para se sobrepor a interação entre AM e fosfolipídios fazendo com que as moléculas de AM sejam expelidas da interface água-ar e, por consequência, as isotermas tendem a se sobrepor. É provável que o AM não se encontre inserido entre as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios zwitteriônicos, mas sim em sítios de ligação mais próximo à interface monocamada-subfase aquosa³.

As Figuras 47a e 47b apresentam, respectivamente, as isotermas π -A de DPPG e CLP para diferentes razões moleculares de AM (variando de 50:1 até 1:4 para CLP:AM e de 10:1 até 1:4 para DPPG:AM) co-espalhadas na monocamada.

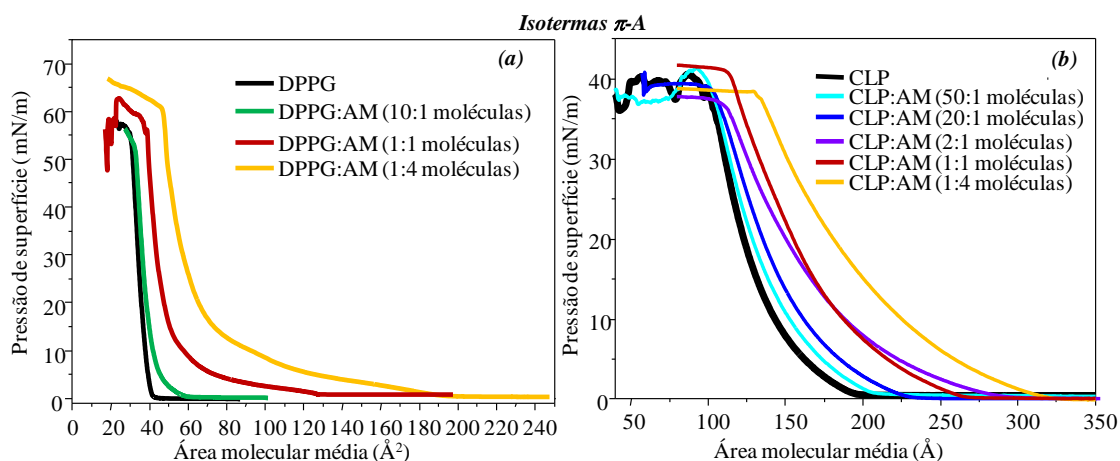


Figura 47: (a) isothermas π -A de DPPG co-espalhado com diferentes proporções moleculares de AM (DPPG:AM = 10:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C. (b) Isothermas π -A de CLP co-espalhado com AM (CLP:AM = 50:1 até 1:4 moléculas) em subfase de água ultrapura a 23°C.

Os resultados apresentados mostram que com o aumento da proporção molecular de AM, as isothermas π -A dos fosfolipídios em questão sofrem deslocamentos significativos para regiões de maiores áreas quando comparadas com isothermas π -A em subfase de água ultrapura. Dessa forma, o AM pode ser incorporado na monocamada nas diversas concentrações utilizadas quando na fase líquida. Nessa fase, os filmes formados pela CLP mostraram-se mais sensíveis à presença de AM, sendo possível observar alterações nas isothermas para razões moleculares a partir de 50:1 ao passo que para os filmes de DPPG essas modificações só foram observadas para razões moleculares a partir de 10:1. A mesma tendência é observada para a fase condensada onde a incorporação do AM já é detectável para a isoterma referente a razão molecular de 20:1 no caso da CLP, enquanto para o DPPG tal incorporação é detectada para a isoterma referente a razão molecular de 1:1. Considerando que tanto a CLP quanto o DPPG são fosfolipídios aniônicos, as interações eletrostáticas devem prevalecer com o AM (catiônico). Essa interação eletrostática é suficientemente forte para que o AM na interface ar/água resista a pressão de superfície exercida quando as moléculas de fosfolipídio se encontram em sua fase condensada (razões moleculares acima de 20:1

para CLP:AM e 1:1 para DPPG:AM), fazendo com que as isotermas se desloquem para regiões de maiores áreas em seus diversos estágios de compressão, diferentemente do observado para os fosfolipídios zwitteriônicos. Como a CLP possui dois grupos polares (duas cargas negativas) por molécula, e o DPPG apenas um, sua interação com as moléculas de AM deve ser mais intensa, o que leva a maior sensibilidade observada para as isotermas. Porém, os mecanismos de interação do AM com o DPPG e CLP são diferentes. Uma evidência disso é a variação no valor da pressão de colapso da monocamada de DPPG com a incorporação de AM (aumentando de cerca de 8 mN/m). Esses mecanismos de interação serão investigados em detalhes na seção 5.2.4. Contudo, em comparação com o reportado na literatura para outros derivados fenotiazínicos, clorpromazina e trifluoperazina, as mudanças nas propriedades da monocamada de DPPG foram observadas para razões moleculares de droga abaixo de 1:1¹⁰. Em outras palavras, a interação entre AM e os fosfolipídios não é forte, pelo menos não tão forte como outros fenotiazínicos.

5.2. Estudo da interação entre os fosfolipídios e o fármaco AM em filmes *layer-by-layer* (LbL)

5.2.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Filmes LbL de PAH/DPPG e PAH/CLP foram aplicados como sistemas miméticos utilizando o AM como molécula alvo em estudos de interações. A metodologia adotada para essas análises foi crescer filmes LbL contendo AM e AgNP inseridas nas camadas de PAH/fosfolipídios. O crescimento dos filmes LbL contendo PAH/(DPPG+AM), PAH/(DPPG+AM+AgNP), PAH/(CLP+AM) e PAH/(CLP+AM+AgNP) são exibidos nas Figuras 48a, 48b, 48c e 48d, respectivamente.

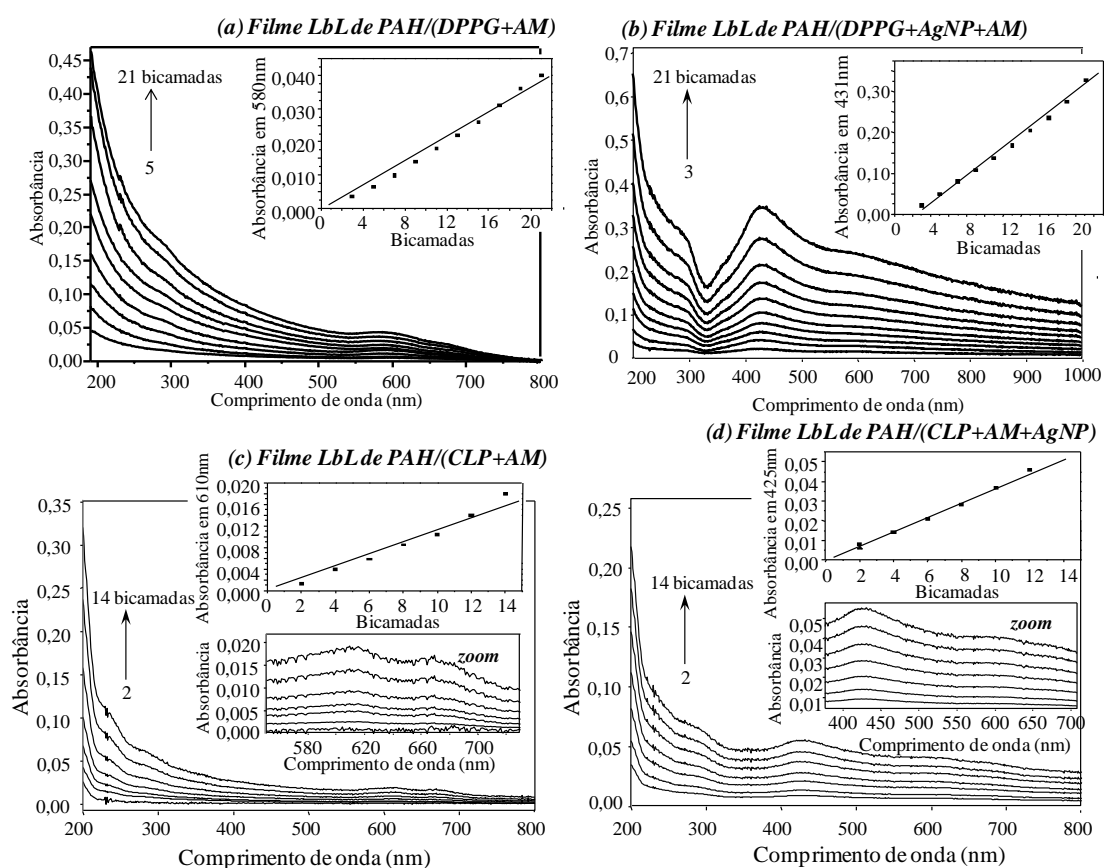


Figura 48: espectros de absorção UV-Vis para diferentes números de bicamadas LbL contendo: (a) PAH/(DPPG+AM). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 580 nm em função das bicamadas depositadas; (b) PAH/(DPPG+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 431 nm em função das bicamadas depositadas; (c) PAH/(CLP+AM). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 610 nm em função das bicamadas depositadas e o *zoom* exibe a região de absorção do AM; (d) PAH/(CLP+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a dependência linear da absorbância em 425 nm em função das bicamadas depositadas e o *zoom* exibe a região de absorção do AM.

Considerando que a possibilidade de fabricação de filmes LbL contendo AgNP dispersas nas camadas de fosfolipídios já foi discutido no capítulo III, o crescimento da região em torno de 200 nm, para os filmes contendo DPPG, e o crescimento da banda em 230 nm, para os filmes contendo CLP, garante que os fosfolipídios estão sendo depositados apesar da interação com o AM. O mesmo é observado para os filmes contendo AgNP, cujo crescimento linear da banda em 431 e 425, para os filmes de DPPG e CLP, respectivamente, indicam que as AgNP estão sendo depositadas. Nesse caso, apesar de misturar os fosfolipídios aniônicos, AgNP negativa e o AM catiônico na

mesma solução aquosa, a adsorção de AgNP nas camadas de PAH é favorecida em relação a dessorção. As bandas em torno de 610 e 655 nm, evidenciadas pelo *zoom* nas Figuras 48c e 48d, são atribuídas as transições π - π^* de dímeros e monômeros de AM, respectivamente¹⁴⁹. Essas bandas crescem linearmente com o número de bicamadas LbL depositadas, como mostrados nos *detalhes* das figuras, indicando que quantidades similares de AM também são adsorvidas a cada deposição. Em todos os casos, o AM catiônico é arrastado para os filmes LbL em função da interação eletrostática estabelecida com os fosfolipídios aniônicos, conforme discutido para os filmes de Langmuir na seção anterior.

5.2.2. Morfologia

Análises morfológicas foram feitas por medidas de MEV realizadas para filmes LbL de 10 bicamadas contendo PAH/(DPPG+AgNP+AM), PAH/(DPPG+AM) e PAH/DPPG como mostrado nas Figuras 49a, 49b e 49c, respectivamente.

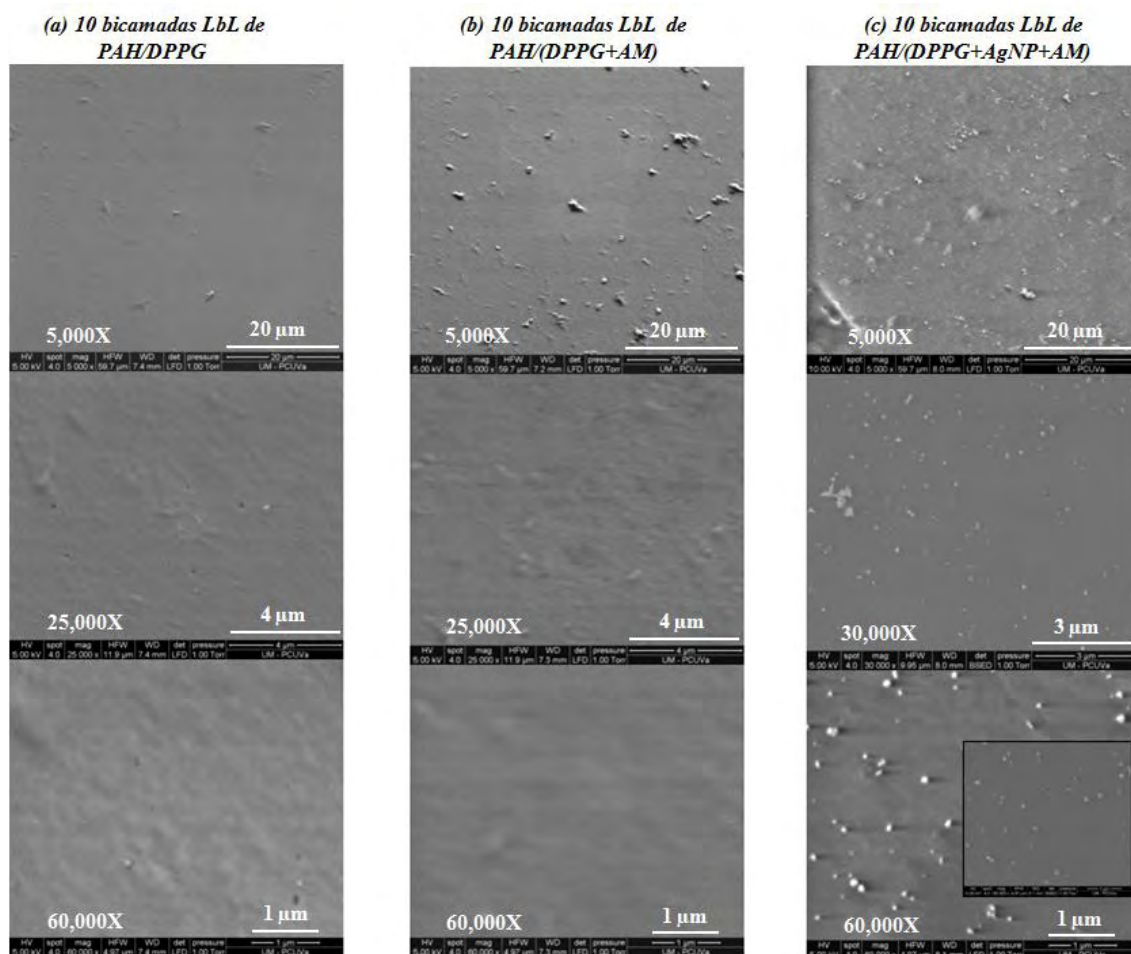


Figura 49: imagens de MEV com diferentes ampliações para os filmes LbL contendo 10 bicamadas de (a) PAH/DPPG, (b) PAH/(DPPG+AM) e (c) PAH/(DPPG+AM+AgNP).

De acordo com as imagens de MEV realizadas com ampliação de 5.000X observa-se que a homogeneidade da superfície diminui conforme a complexidade do sistema aumenta, ou seja, de PAH/DPPG para PAH/(DPPG+AgNP+AM). Além disso, é possível observar a presença das AgNP dispersas ao longo da superfície do filme LbL de PAH/(DPPG+AgNP+AM). Aumentando a ampliação para 25.000X observa-se claramente que o padrão de homogeneidade discutido anteriormente é mantido para os distintos filmes LbL. Tomando a ampliação de 60.000X, é possível observar alguns domínios nos filmes LbL de PAH/DPPG que podem ser atribuídos a vesículas multilamelares de DPPG (MLV) conforme relatado no capítulo III. Para a imagem MEV do filme LbL de PAH/(DPPG+AgNP+AM), o *detalhe* mostra uma imagem

também obtida com uma ampliação de 60.000X, porém usando um detector de elétrons no modo que recolhe os elétrons espalhados a um ângulo de 180° (*back scattering*). Este modo é altamente dependente da densidade do alvo, o que confirma a presença das AgNP, já que estas espalham melhor os elétrons devido a sua densidade elevada em comparação com as demais moléculas orgânicas que compõem o filme LbL. Também de acordo com os resultados de UV-Vis (capítulo III), observa-se que as AgNP isoladas prevalecem em relação aos agregados.

A morfologia dos filmes LbL de PAH/DPPG, PAH/(DPPG+AM) e PAH/(DPPG+AgNP+AM) foi completada em escala de nanômetros via AFM. A Figura 50 mostra as imagens AFM em 2 e 3 dimensões para o (a) substrato de vidro tratado termicamente (referência) e para os filmes LbL contendo 10 bicamadas de (b) PAH/DPPG, (c) PAH/(DPPG+AM) e (d) PAH/(DPPG+AgNP+AM), cujas distribuições de altura são dadas pelos histogramas nos *detalhes*.

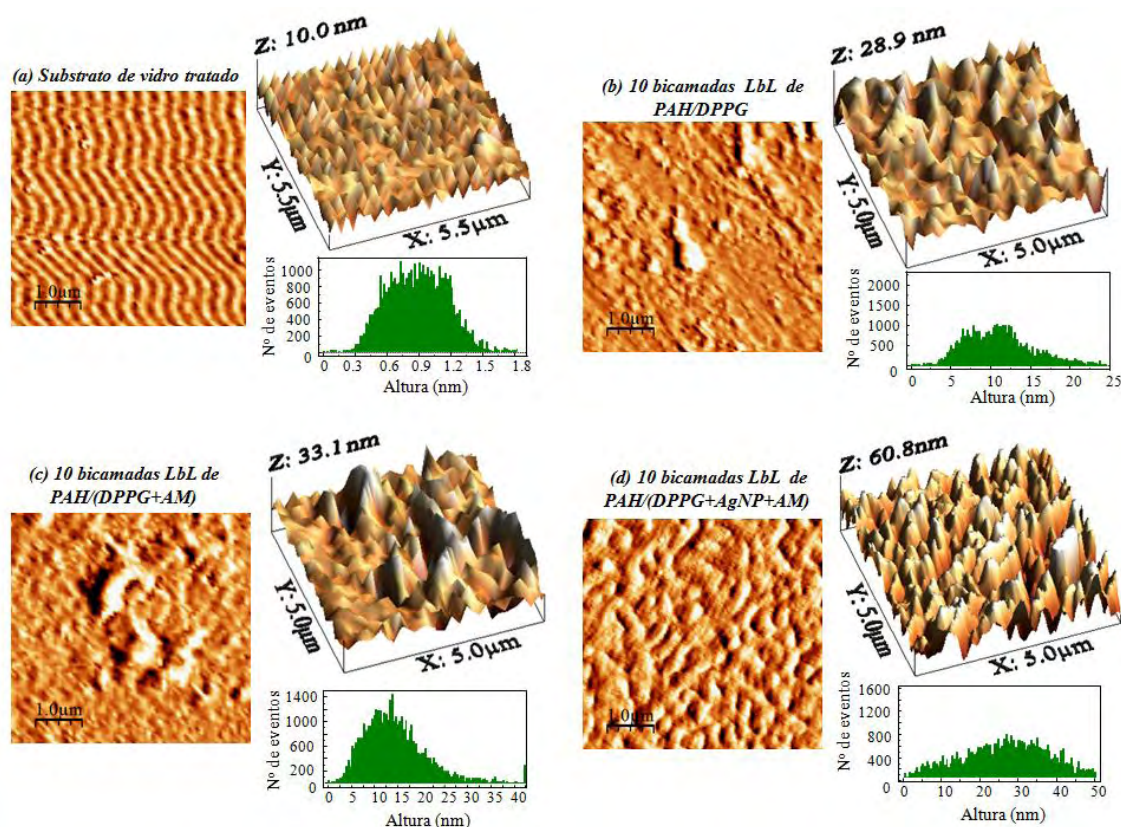


Figura 50: imagens topográficas de AFM exibidas em 2 e 3 dimensões e seus histogramas com a distribuição das alturas registradas para (a) substrato de vidro tratado termicamente (2 horas a 600 °C) e 10 bicamadas LbL dos filmes de (b) PAH/DPPG, (c) PAH/(DPPG+AM) e (d) PAH/(DPPG+AgNP+AM).

Os baixos valores em termos de altura média e rugosidade apresentada pelo próprio substrato de vidro (Tabela 3) garantem maior precisão para os resultados obtidos contendo os filmes LbL. As imagens de AFM, exibidas nas Figuras 50b e 50c (especialmente as imagens 3D), mostram predominantemente a presença de domínios que podem ser atribuídos às MLV de DPPG¹³³, corroborando a discussão sobre MEV e garantindo que a interação DPPG-AM não é suficiente para desestruturar a organização de MLV nos filmes LbL. Estes resultados também corroboram os dados de UV-Vis, com relação ao crescimento dos valores de absorção em 200 nm atribuído a adsorção de DPPG. Como as AgNP foram claramente observadas através das imagens MEV, as imagens de AFM exibidas na Figura 50d foram obtidas evitando as áreas onde as AgNP eram proeminentes, caso contrário informações sobre a superfície do filme iriam ser

desperdiçadas. As áreas varridas não apresentaram um perfil topográfico distinto, sugerindo que as MLV de DPPG são predominantes como também observado para maiores áreas via MEV.

Complementarmente, os resultados obtidos para as medidas de AFM foram caracterizadas via rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média (diferença de altura entre picos e vales). Foram realizadas medidas para áreas com 5,0 x 5,0 μm^2 ; 2,0 x 2,0 μm^2 e 1,0 x 1,0 μm^2 e os valores obtidos estão postados na Tabela 3.

Tabela 3. Rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média para o substrato de vidro e filmes LbL com 10 bicamadas de PAH/DPPG, PAH/(DPPG+AM) e PAH/(DPPG+AgNP+AM).

Amostra	Área escaneada (μm^2)	Rugosidade RMS (nm)	Altura média (nm)
Substrato de vidro tratado	5 x 5	0,8	2,4
	2 x 2	0,3	1,1
	1 x 1	0,2	0,9
PAH/DPPG	5 x 5	10,9	24,3
	2 x 2	7,0	17,3
	1 x 1	6,4	13,2
PAH/(DPPG+AM)	5 x 5	12,7	30,2
	2 x 2	9,4	22,6
	1 x 1	7,7	16,5
PAH/(DPPG+AgNP+AM)	5 x 5	17,3	34,1
	2 x 2	15,4	31,7
	1 x 1	12,3	29,9

Verifica-se que todos os filmes analisados apresentaram valores de rugosidade RMS e altura média que variam com a área de varredura, o que é esperado já que a distribuição dos domínios moleculares não é a mesma tanto ao longo da superfície do filme quanto em termos de tamanho. Além disso, a rugosidade RMS em escala de nanômetros segue o que foi observado através das análises de MEV em escala micrométrica, isto é, a rugosidade cresce seguindo a sequência dos filmes LbL de

PAH/DPPG, PAH/(DPPG+AM) e PAH/(DPPG+AgNP+AM). A mesma tendência é observada para os valores de altura média (histogramas).

A morfologia em escala micrométrica para as 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) e PAH/(CLP+AM+AgNP) são exibidas, respectivamente, nas Figuras 51a e 51b. O *detalhe* da Figura 51a mostra uma imagem óptica para as 14 bicamadas LbL de PAH/CLP, discutida no capítulo III, onde a CLP se encontra na forma de vesículas gigantes (~20 μm).

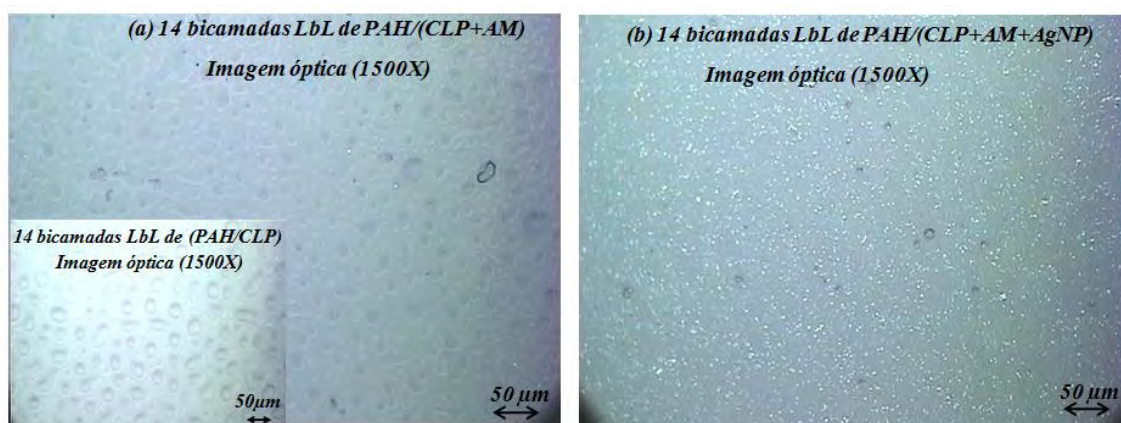


Figura 51: imagem óptica para os filmes LbL com 14 bicamadas de (a) PAH/(CLP+AM) e (b) PAH/(CLP+AM+AgNP). O *detalhe* mostra a imagem óptica do filme LbL com 14 bicamadas de PAH/CLP.

Diferentemente do observado para os filmes LbL contendo DPPG, nesse caso a adição de AM causa uma drástica diminuição no tamanhos das vesículas de CLP e na distribuição de forma, o qual está intimamente relacionado a afinidade de interação com membranas biológicas^{1,171}. De fato, os efeitos de vários fenotiazínicos em sistemas miméticos de membranas biológicas são governados por interações específicas e vem sendo bastante descrita na literatura^{172,173}. A respeito dos efeitos de fenotiazínicos em membranas biológicas, os seus derivados são conhecidos por causar hemólise eritrocitária¹⁷⁴, e em concentrações mais baixas induzem estomatocitose das células vermelhas do sangue¹⁷², que estão associados com as mudanças na estrutura da

membrana¹⁷⁵. Estudos com o fenotiazínico CPZ mostrou que em concentrações acima de 100 μM , a droga faz furos nas membranas de células vermelhas com 14 Å de diâmetro e em concentrações acima de 40 mM, torna as células permeáveis a substâncias com baixo peso molecular tais como ATP, ADP e frutose 1,6-bifosfato¹⁷⁶. Além disso, vale mencionar que os cenários típicos que eventualmente levam a alterações morfológicas da membrana em presença de AM foram analisados pela primeira vez em microscopias ópticas de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) de DOPC imersos em soluções de AM (de 4 μM até 130 μM)¹⁰. As microscopias obtidas para as GUVs em soluções de AM demonstraram que o contato entre as bicamadas de fosfolipídios e a solução de AM não leva a destruição das vesículas por si só, apesar de aumento significativo das oscilações da membrana e adesão das vesículas ao substrato de vidro. No entanto, experimentos com micropipetas foram utilizados nesse sistema na tentativa de medir o módulo de flexão¹⁷⁷ das vesículas em presença de AM. Surpreendentemente os resultados mostraram que as GUVs sempre tendem a entrar em colapso quando tocadas pela ponta da micropipeta. Portanto, todos estes resultados confirmam as mudanças nas propriedades mecânicas das membranas seguido por um dramático aumento da "fragilidade" da membrana fluida.

5.2.3. Cálculos teóricos Raman e FTIR para o AM

A fim de avançar na caracterização e no estudo de interação, uma investigação dos modos normais fundamentais do AM (absorção no infravermelho e espalhamento Raman) foi realizada através de cálculos teóricos usando a base DFT/6-31G fixada com um fator de escala de 0,9945¹⁷⁸ a ser aplicada para números de onda. Além disso, o AM foi considerado como uma molécula isolada, ou seja, o cálculo é executado para uma única molécula e sem perturbações externas, ao contrário das medidas experimentais onde as moléculas estão interagindo umas com as outras. O contra-íon Cl^- não foi

considerado na estrutura molecular do AM utilizada para os cálculos. Os espectros de infravermelho e Raman (experimental e cálculo teórico) do AM são apresentados na Figura 52, sendo o espectro experimental coletado de filme *cast* (a partir de soluções aquosas).

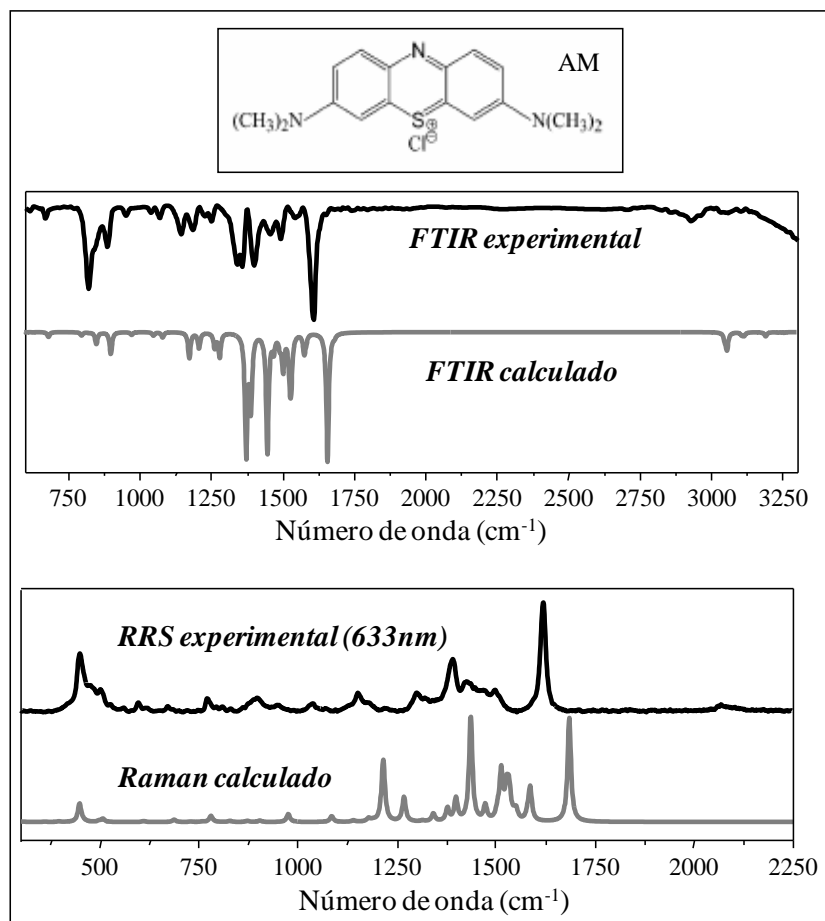


Figura 52: estrutura molecular do AM e espectros Raman e FTIR de AM obtidos experimentalmente e por meio de cálculos teóricos (programa Gaussian, base DFT/6-31G).

Considerando todos estes aspectos anteriores, um bom acordo foi obtido entre os espectros calculados e experimentais de AM em termos de números de onda e intensidades relativas, sobretudo no caso de absorção no infravermelho. No caso do Raman, deve ser salientado que a linha de laser em 633 nm utilizado nos experimentos está em ressonância com a absorção UV-Vis do AM levando a obtenção de espectros

RRS. Este último pode dar origem às principais diferenças encontradas em termos de intensidade relativa.

A Tabela 4 para o Raman e a Tabela 5 para o FTIR contém os números de onda, a intensidade relativa (em parênteses) e as atribuições para as bandas vibracionais. Esta última foi baseada nos cálculos teóricos e na literatura disponível^{157,179,180}.

Tabela 4. Atribuições e intensidades relativas (entre parênteses) para as bandas Raman do AM.

Raman Calculado (cm ⁻¹)	Raman Experimental (cm ⁻¹)	ATRIBUIÇÕES
444 (20)	446 (53)	Deformação esqueleto (CN, CS e CH ₃) / Deformação esqueleto CN ^a
503 (6)	495 (24)	Deformação esqueleto (CN e CH ₃) / Deformação esqueleto CN
605 (2)	595 (10)	Torção da molécula + CH <i>bending</i> for a do plano (anel) / Deformação esqueleto CC ^a
681 (6)	669 (8)	Deformação esqueleto (CC) / CH <i>bending</i> fora do plano ^a
774 (10)	769 (14)	Deformação esqueleto (CN and CH ₃) / CH <i>bending</i> no plano ^a
897 (2)	897 (16)	Skeletal deformation (CC) / CH <i>bending</i> no plano ^a
969 (12)	949 (9)	CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> for a do plano (CH ₃) / CH <i>bending</i> no plano ^a
1078 (8)	1039 (12)	Estiramento antissimétrico CS + CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> fora do plano (CH ₃) / CS estiramento antissimétrico ^a , CH <i>bending</i> no plano ^b
1207 (40)	1154 (19)	CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> for a do plano (CH ₃) / CH <i>bending</i> no plano ^a
1334 (12)	1301 (21)	Estiramento simétrico CN (centro) + CH <i>bending</i> no plano (anel) / estiramento CC ^{a,b}
1427 (100)	1394 (50)	Estiramento simétrico CN (lateral e centro) + CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> for a do plano (CH ₃), estiramento CN + estiramento CC ^a / estiramento antissimétrico CN ^b
1464 (22)	1429 (31)	CH <i>bending</i> fora do plano (CH ₃), estiramento CC ^a / estiramento simétrico CN ^b
1504 (55)	1449 (24)	Estiramento CC + CH <i>bending</i> fora do plano (CH ₃)
1521 (53)	1472 (23)	Estiramento antissimétrico CN (centro) + CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> fora do plano (CH ₃) / estiramento CC ^{a,b}
1576 (37)	1499 (23)	Estiramento simétrico CN (lateral) + CH <i>bending</i> no plano (anel) + CH <i>bending</i> fora do plano (CH ₃) / estiramento CC ^{a,b}
1675 (98)	1622 (100)	Estiramento CC + CH <i>bending</i> no plano (anel) / estiramento CN + estiramento CC ^{a,b}

^a [177] ; ^b [178]

Tabela 5. Atribuições e intensidades relativas (entre parênteses) para as bandas FTIR do AM.

FTIR Calculado (cm ⁻¹)	FTIR Experimental (cm ⁻¹)	ATRIBUIÇÕES
680 (7)	671 (13)	Deformação esqueleto (CC e CS) / CH bending fora do plano ^c
846 (11)	819 (73)	CH bending fora do plano (anel)/CH bending fora do plano ^c
897 (18)	886 (38)	Deformação esqueleto (CC e CS)/CH bending fora do plano ^c
970 (5)	951 (9)	Deformação esqueleto (CC and CH ₃)/CH bending fora do plano ^c
1045 (6)	1037 (8)	Estiramento antissimétrico CS + CH bending no plano (anel)/CH bending no plano ^c
1078 (8)	1069 (12)	Estiramento antissimétrico CS + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1170 (22)	1142 (26)	CH bending no plano (anel)
1204 (15)	1186 (23)	CH bending fora do plano (CH ₃) + CH bending no plano (anel)
1259 (17)	1227 (12)	Estiramento antissimétrico CN (lateral) + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1277 (23)	1249 (16)	CH bending in plane (anel)
1368 (98)	1339 (50)	Estiramento CC + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1385 (66)	1358 (54)	Estiramento CC + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1442 (94)	1398 (52)	Estiramento antissimétrico CN (centro) + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1497 (34)	1454 (25)	Estiramento CC + CH bending no plano (anel) + CH bending fora do plano (CH ₃)
1524 (52)	1491 (29)	Estiramento CN (centro) + estiramento CC + CH bending fora do plano (CH ₃) + CH bending no plano (anel) / vibrações do anel aromático ^c
1570 (20)	1541 (12)	Estiramento CN (lateral) + CH bending fora do plano (CH ₃) + CH bending no plano (anel) / vibrações do anel aromático ^c
1651 (100)	1605 (100)	Estiramento antissimétrico CN(centro e lateral) + estiramento CC + CH bending no plano (anel)
3039 (15)	2954 (14)	Estiramento simétrico (CH ₃)

^c [179]

Nas tabelas os termos no plano e fora do plano referem-se ao plano que contém os anéis aromáticos. Vale ressaltar que para as bandas Raman Sakar *et al.*¹⁷⁹ fez as atribuições para o AM⁺ adsorvido em nanoestruturas metálicas (SERRS), enquanto Nicolai *et al.*¹⁴⁹ apresenta atribuições baseadas em estudos vibracionais realizados para fenotiazínicos similares e outros compostos sulfonados e nitrogenados. No caso das bandas de FTIR, Somania *et al.*¹⁸⁰ trabalhou com pó de AM disperso em matriz de KBr e suas atribuições foram estabelecidas por intervalos de número de onda.

5.2.4. Análise de interação via FTIR

Espectros FTIR no modo de transmissão são exibidos na Figura 53 para 14 bicamadas LbL de PAH/CLP e PAH/(CLP+AM) depositadas sobre ZnSe. O espectro FTIR do filme *cast* de AM também é exibido. Os *detalhes* apresentam os *zooms* para regiões abaixo de 1900 cm^{-1} e acima de 2750 cm^{-1} , mostrando as bandas de absorção características da CLP, AM e PAH nos filmes LbL.

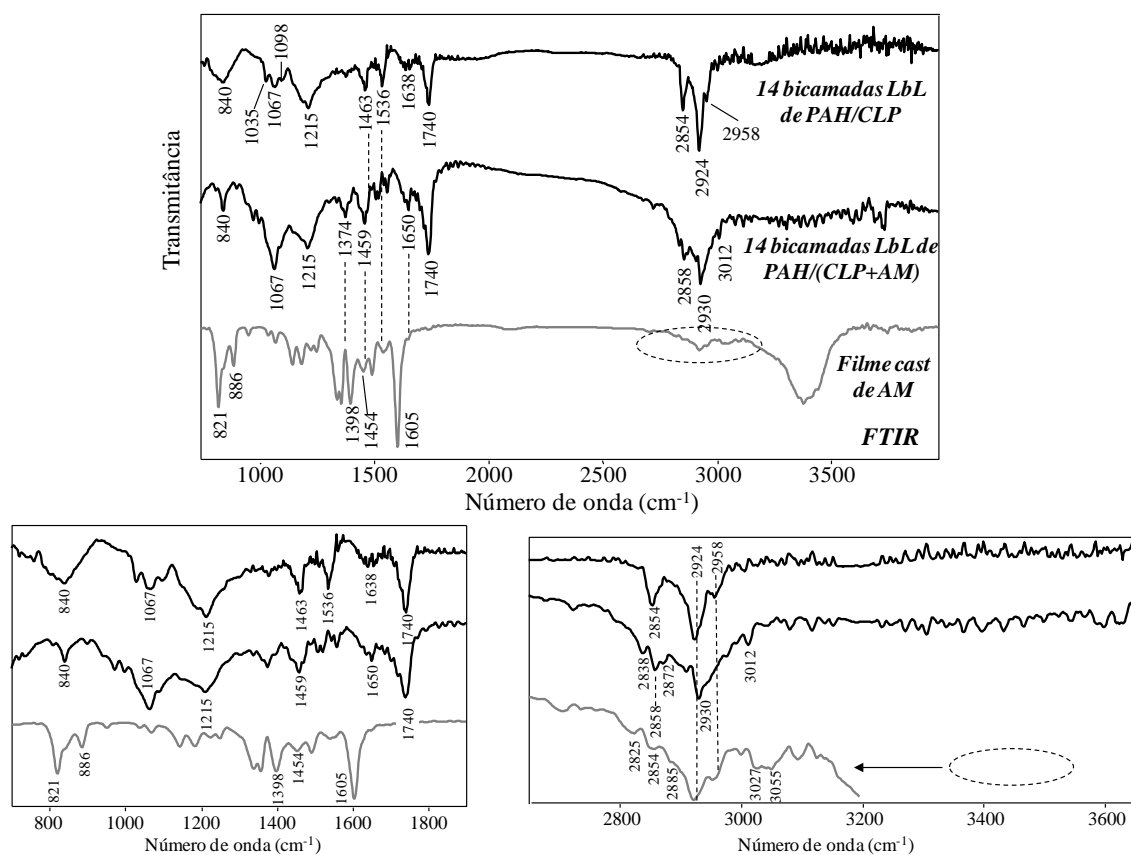


Figura 53: espectros FTIR para filmes LbL com 14 bicamadas de (a) PAH/CLP e (b) PAH/(CLP+AM). O espectro FTIR para o filme *cast* de AM é dado como referência.

As bandas FTIR para a CLP e PAH são relativamente mais intensas que as do AM presente no filme LbL, indicando que o polímero e as vesículas são os materiais mais abundantes, como inicialmente desejado, o que está de acordo com os resultados de UV-Vis obtidos para o filme LbL de PAH/(CLP+AM) (seção 5.2.1.). As análises de FTIR para 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) mostraram algumas modificações

nos espectros do polímero/vesícula em função das interações específicas entre PAH/CLP e AM quando comparado ao observado sem AM. As alterações foram detectadas nas bandas de estiramento do grupo fosfato (PO_4^-)¹²³ e amina (NH_3^+)¹²⁶ situados entre $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ e $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, e em menor extensão para as cadeias alquílicas de metileno em elevados números de onda¹²³.

Na região entre $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ para o filme LbL de PAH/(CLP+AM), a banda atribuída ao estiramento do grupo fosfato (PO_4^-) da CLP retoma a sua forma original e uma elevada intensidade relativa da banda em 1067 cm^{-1} foi observada, sem alterações na escala de número de onda, assemelhando-se ao espectro FTIR do filme *cast* de CLP. Os espectros FTIR para os filmes *cast* de CLP e PAH foram discutidos na seção 3.1.1. Da mesma forma, a incorporação de AM nos filmes LbL de PAH/CLP causou mudanças na forma e no número de onda das bandas em 1536 e 1638 cm^{-1} , deslocada para 1650 cm^{-1} , atribuídas a deformações angulares simétrica e antissimétrica do grupo NH_3^+ do PAH. Tais mudanças mostram a influência do AM, que ao se ligar afeta as interações apresentadas originalmente pelo filme LbL de PAH/CLP.

Complementarmente, na presença de AM as bandas a elevados números de onda entre $2800\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$ também são afetadas. As bandas em 2854 e 2924 cm^{-1} do filme LbL de PAH/CLP, atribuídas ao estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 presente nas cadeias alquílicas de CLP¹²³, são deslocadas para 2858 e 2930 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, o ombro em 2958 cm^{-1} originalmente detectado no filme LbL de PAH/CLP e atribuído ao estiramento simétrico CH_3 da CLP¹²³ desaparece, enquanto outros pequenos picos em 2838 , 2872 e 3012 cm^{-1} crescem no espectro do filme LbL de PAH/(CLP+AM). A banda atribuída à deformação do grupo CH_2 em 1463 cm^{-1} é deslocada para 1459 cm^{-1} pela presença do AM, reforçando os efeitos observados sobre a conformação das cadeias alquílicas da CLP presente nos filmes LbL. Dessa

forma, os resultados mostram que as interações entre os grupos amino do polímero e os grupos polares dos fosfolipídios, além da calda alifática, têm sido influenciadas pelas interações com o AM levando as mudanças observadas no espectro do filme LbL de PAH/CLP. Assim, interações eletrostáticas e do tipo dipolo-dipolo podem estar na origem da adsorção do AM nos filmes LbL.

Entretanto, a análise FTIR para as 21 bicamadas LbL PAH/(DPPG+AM) exibido na Figura 54 mostra que a interação eletrostática entre DPPG-AM é menos intensa, uma vez que a presença de AM nos filmes LbL não causa alterações significativas nos espectros obtidos quando comparados com espectros obtidos para filmes LbL sem a adição de AM.

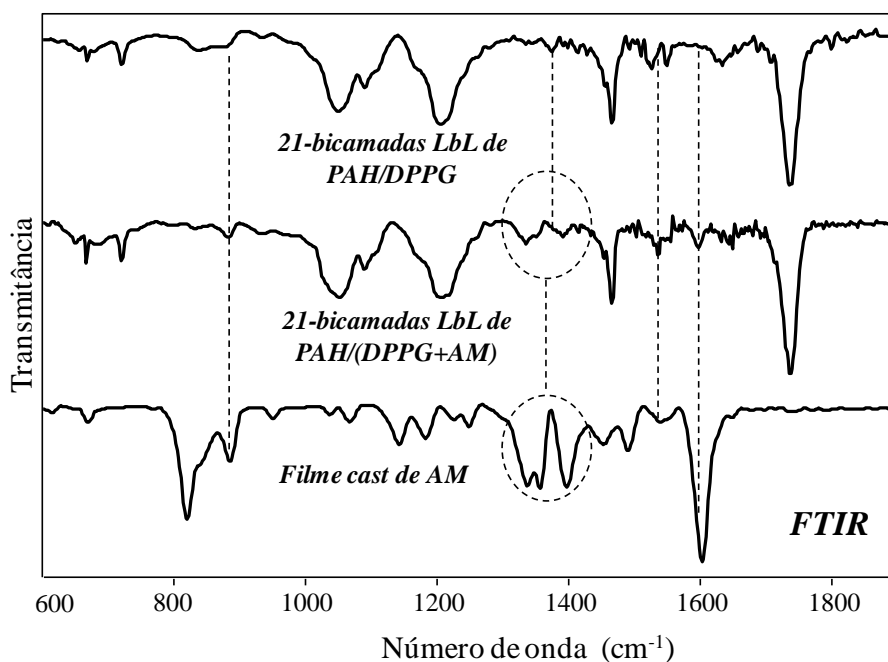


Figura 54: espectros FTIR para filmes LbL com 21 bicamadas de (a) PAH/DPPG e (b) PAH/(DPPG+AM). O espectro FTIR para o filme *cast* de AM é dado como referência.

Tais interações são caracterizadas por deslocamentos das bandas de absorção em termos de número de ondas ou mesmo o aparecimento de novas bandas como enfatizado pelas linhas tracejadas entre 600 e 1800 cm^{-1} . Para números de ondas mais elevados os filmes LbL são completamente dominados pelo estiramento C-H do DPPG

e nenhuma alteração é observada nos espectros FTIR com e sem a presença de AM (resultado não mostrado). Estes resultados garantem que os grupos polares dos fosfolipídios desempenham um papel fundamental nas interações AM-DPPG. Dessa forma, as interações mais intensas para o caso da CLP e as menos intensas para o DPPG justificam as mudanças morfológicas mais drásticas observadas para o filme LbL de PAH/CLP quando em presença de AM.

5.2.5. *Micro-Raman e SERRS*

A Figura 55a exibe o espectro RRS coletado para a região de domínios moleculares do filme LbL contendo 10 bicamadas de PAH/(DPPG+AM). As Figuras 55b, 55c e 55d mostram, respectivamente, o mapeamento Raman em área para 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) e PAH/(CLP+AM+AgNP) e 21 bicamadas LbL de PAH/(DPPG+AM+AgNP). Os mapeamentos foram construídos coletando espectros ponto a ponto ao longo de uma área de 80 μm x 80 μm no caso dos filmes contendo CLP e 60 μm x 60 μm para os filmes de DPPG utilizando um passo de 2 μm , levando a um total de 1681 e 961 espectros, respectivamente. Em seguida, a intensidade da banda em 1622 cm^{-1} foi plotada ao longo da área mapeada onde os pontos mais claros referem-se às bandas mais intensas

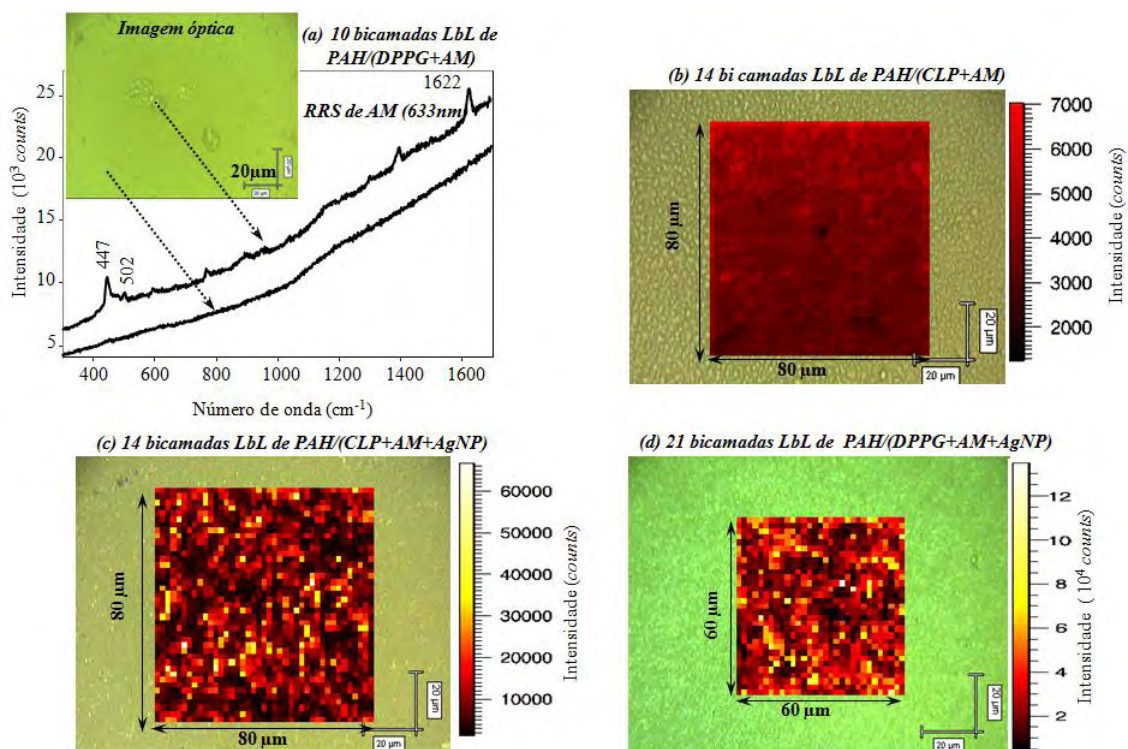


Figura 55: espectro RRS coletado para as regiões de domínios moleculares do filme LbL com 10 bicamadas de PAH/(DPPG+AM). Também são exibidos mapeamentos Raman apresentando a distribuição espacial da banda em 1622 cm^{-1} para os filmes LbL com 14 bicamadas de (b) PAH/(CLP+AM), (c) PAH/(CLP+AM+AgNP) e 21 bicamadas de (d) PAH/(DPPG+AM+AgNP). Laser em 633 nm .

Pode-se observar no mapeamento exibido na Figura 55b que é possível coletar espectros Raman em toda área analisada, cujo sinal é característico do AM (RRS). Isso mostra uma distribuição espacial bastante homogênea da banda em 1622 cm^{-1} , ou seja, não há pontos na escala micrométrica sem AM, o que levaria a pontos negros no mapeamento de área RRS. Já com relação ao filme LbL contendo PAH/(DPPG+AM) (Figura 55a) uma baixa quantidade de material foi encontrada ao longo da superfície do filme, onde espectros RRS só puderam ser coletados sobre domínios moleculares de AM. Essa diferença pode ser explicada com base na interação estabelecida entre fosfolipídio-AM. Como os espectros FTIR, assim como as isotermas de Langmuir, revelaram que a CLP apresenta uma interação mais intensa com o AM quando comparada ao DPPG, possivelmente uma maior quantidade de AM esteja sendo

depositada juntamente com a CLP na fabricação dos filmes LbL possibilitando sua caracterização via RRS ao longo de todo filme.

Por outro lado, a intensidade da banda em 1622 cm^{-1} dos espectros SERRS de AM varia significativamente de região para região, como observado no mapeamento de área Raman exibido nas Figura 55c e 55d. Isso é uma consequência direta da distribuição espacial das AgNP, conforme discutido na seção 5.2.2. As AgNP presente nos filmes LbL ativam os espectros SERRS de AM, o que leva a uma amplificação do sinal de AM. Nesse caso, as AgNP e as moléculas de AM devem estar preferencialmente próximas umas das outras já que o fenômeno da amplificação em superfície é altamente dependente da distância entre o analito de interesse e as nanopartículas metálicas^{155,156}. Um exemplo disso é exibido na Figura 56 onde espectros Raman de AM foram coletados para dois filmes LbL contendo 1 tetracamada cada, fabricados pela a imersão do substrato nas soluções (PAH, DPPG, AM e colóide de Ag) durante 3 minutos, seguindo a ordem mostrada nos *detalhes*. Pode-se observar que a intensidade Raman é muito mais fraca quando o DPPG é posicionado entre o AM e AgNP.

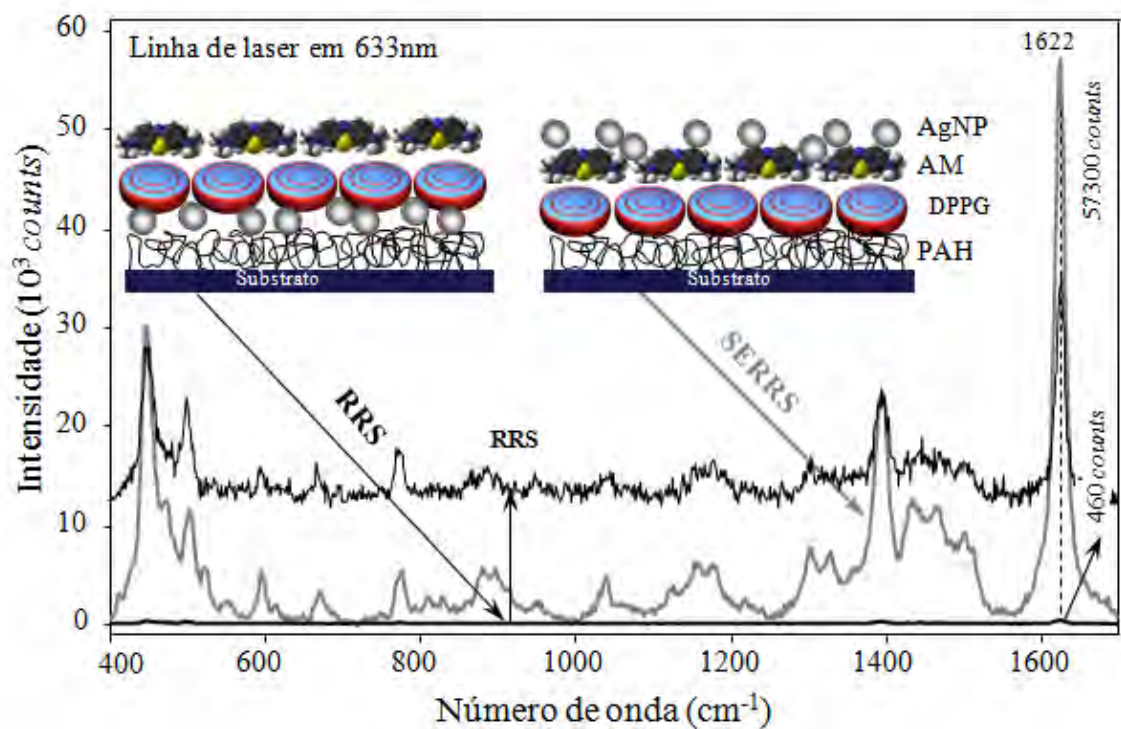


Figura 56: espectros Raman para dois filmes LbL contendo 1 tetracamada de PAH/AgNP/DPPG/AM e PAH/DPPG/AM/AgNP. Os *detalhes* mostram as arquiteturas moleculares de cada filme. Laser em 633nm.

Esse efeito SERRS ainda possibilita a caracterização dos filmes LbL utilizando até mesmo uma única bicamada. Esse resultado é evidenciado na Figura 57a, que compara os espectros coletados para 1 e 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM+AgNP) e 14 bicamadas de PAH/(CLP+AM).

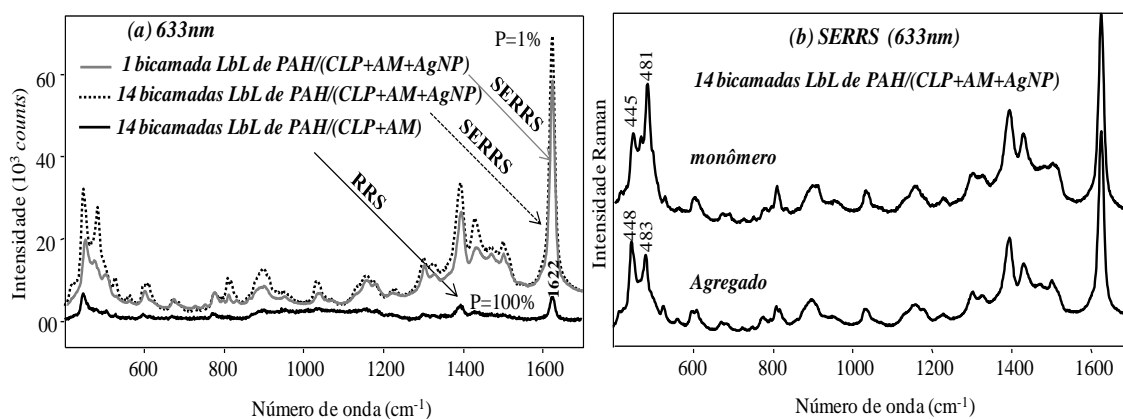


Figura 57: (a) espectro RRS para 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) com 100% da potência nominal do laser em 633nm, além de espectros SERRS coletados para 1 e 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM+AgNP) com 1% da potência nominal. (b) Dois espectros SERRS distintos que se referem a diferentes arranjos moleculares do AM (monômeros e agregados).

Foi observado que a intensidade Raman é muito mais fraca para as 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM) quando comparada a 1 e 14 bicamadas LbL de PAH/(CLP+AM+AgNP). Dessa forma, uma estimativa para o fator de amplificação pode ser feita da mesma forma que na seção 4.2. Consequentemente, o fator de amplificação está em torno de 10^3 , o qual está de acordo com os fatores de amplificação preditos para SERRS considerando o mecanismo eletromagnético¹⁶⁵. Vale ressaltar que o mesmo padrão de resultados foi encontrado para os filmes LbL de PAH/(DPPG+AM+AgNP) (resultado não exibido). Finalmente, a Figura 57b apresenta dois espectros SERRS de AM escolhidos a partir do mapeamento Raman exibido na Figura 55c cujos perfis foram considerados os mais distintos uns dos outros. Como discutido por Nicolai *et al.*¹⁴⁹ e também observado para o filme LbL de PAH/(DPPG+AgNP+AM), os espectros SERRS de AM da Figura 57b revelam o arranjo molecular encontrado para o AM, isto é, monômeros (primeiro espectro – dominado pela banda em 480 cm^{-1} em relação as bandas de 450 e 500 cm^{-1}) e agregados (segundo espectro).

5.3. Estudo da interação entre fosfolipídios e azul de metileno (AM) em filmes Langmuir-Blodgett (LB)

A fraca interação química entre o AM e o DPPG foi revelada usando abordagens diferentes, tais como filmes de Langmuir produzidos pelo co-espalhamento, filme LB com 1 camada e filmes LbL e LB contendo multicamadas. Nesse sentido foi realizado um estudo complementar visando confirmar que a fraca interação entre DPPG e AM não é devido à interação entre DPPG e PAH observada durante a formação dos filmes LB. Uma abordagem distinta daquelas descritas nas seções anteriores para espectroscopia de impedância, FTIR, UV-Vis (imersão dos filmes em soluções de AM e coletando os dados antes e depois disso) foi aplicada aqui. Filmes de Langmuir foram fabricados dissolvendo PAH e AM em subfase aquosa. Em seguida estes filmes foram transferidos para substratos sólidos formando uma camada mista LB. Este filme LB misto foi depositado sobre substrato de vidro previamente recoberto com um filme evaporado de Ag com 6 nm de espessura para a obtenção de espectros SERRS. A Figura 58a mostra uma isoterma π -A obtida para o DPPG na interface ar/água (100 μ L espalhados; 0,74 mg/mL) com o subfase contendo PAH (0,01 mg/mL) e AM (64×10^{-6} mg/mL).

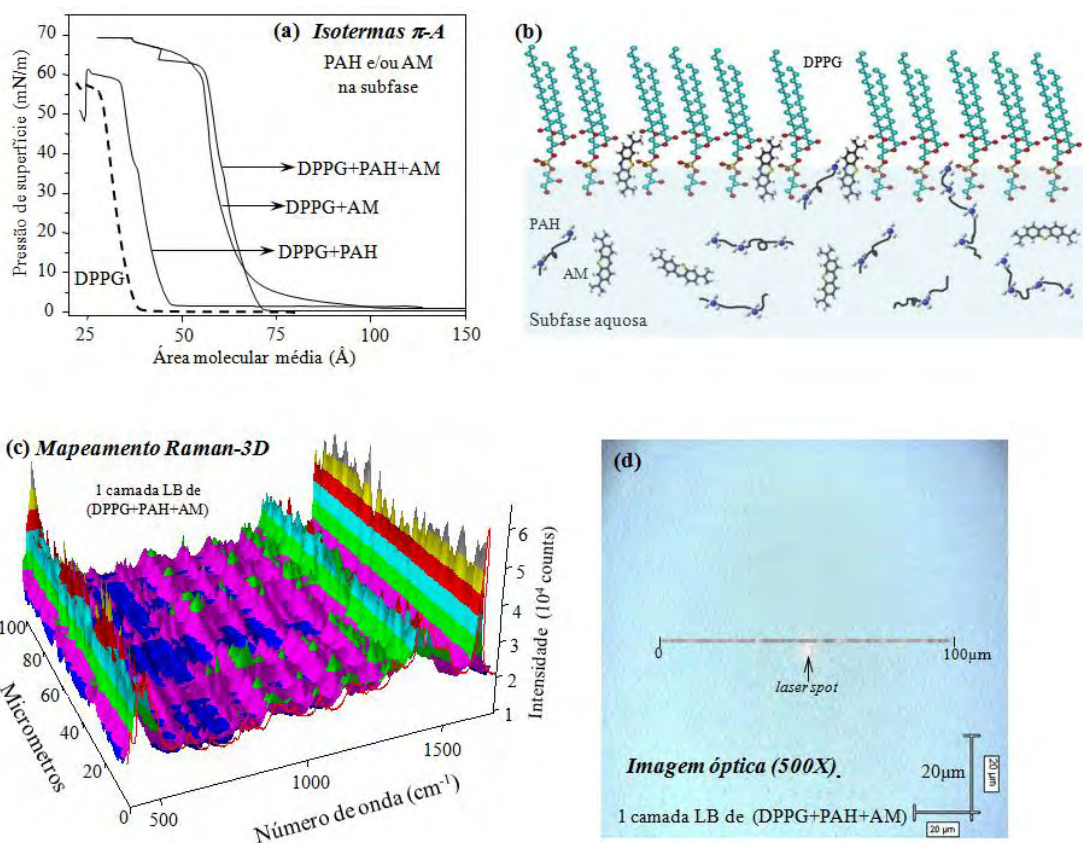


Figura 58: (a) isotermas π -A de DPPG coletadas para subfase de água contendo PAH (0,01 mg/mL) ou AM (64×10^{-6} mg/mL). (b) Ilustração do filme de Langmuir de DPPG na interface ar/água com PAH e AM dissolvidos na subfase. (c) Espectros SERRS para o filme LB contendo 1 camada de DPPG transferida da subfase de água contendo 0,01 mg/mL de PAH e 64×10^{-6} mg/mL de AM para um filme de Ag com 6 nm de espessura (laser de 633 nm). (d) Imagem óptica desta monocamada LB de onde espectros SERRS foram coletados ponto a ponto ao longo de uma linha de 100 μ m. *Detalhe:* imagem de MEV mostrando as AgNP formadas pela evaporação de 6 nm de Ag sobre um substrato de vidro.

Nestas condições experimentais, existe 1,0 molécula de DPPG na interface ar/água para aproximadamente 2,4 moléculas de AM e 2,15 moléculas de PAH (aproximadamente $2,7 \times 10^3$ meros de PAH, principalmente formado pelos grupos NH_3^+ uma vez que a maioria das moléculas de PAH está ionizada a um $\text{pH} = 5,6$)¹⁴³ dissolvidas na subfase aquosa. Os deslocamentos das isotermas π -A de DPPG para maiores áreas devido à presença de PAH já foi discutido na seção 3.2.1 (eles são repetidos aqui para melhor comparação). Observa-se que a presença de AM, mesmo em menor concentração que o PAH, induz um maior deslocamento das isotermas π -A de

DPPG para maiores áreas. Isso indica claramente uma maior afinidade entre DPPG e AM que DPPG e PAH como desejável, considerando o DPPG em aplicações sensoriais. A Figura 58b apresenta um esquema para ilustrar o filme de Langmuir de DPPG formado na interface ar/água na presença de PAH e AM dissolvidos na subfase aquosa.

Finalmente, a Figura 58c traz os espectros SERRS do filme LB contendo 1 camada de (DPPG+AM+PAH). Os espectros SERRS foram coletados ponto a ponto (passo de 1 μm) ao longo de uma linha de 100 μm em um total de 101 espectros, que são exibidos em 3 dimensões. Os espectros SERRS são atribuídos ao AM¹⁴⁹, revelando que a interação entre AM e DPPG é suficiente para transferir esta droga da subfase aquosa para o substrato sólido, apesar da interação entre DPPG e PAH. As diferenças de intensidade dos espectros SERRS na Figura 58c permite concluir que o AM está homogeneamente distribuído na superfície do substrato, assim como mostrado pela imagem óptica do filme em questão, exibida na Figura 58d. A imagem óptica (Figura 58d) também mostra o laser focado em uma área característica, com poucos micrometros de diâmetro, e a linha de onde foram coletados os espectros SERRS do AM (os pontos mais claros indicam sinais mais intensos para a banda em 1622 cm^{-1}).

Capítulo VI

Conclusões

Filmes nanoestruturados contendo os fosfolipídios aniônicos CLP e DPPG e o zwitteriônico DPPC immobilizados em uma camada de suporte do polieletrólito PAH foram fabricados com sucesso utilizando a técnica LbL. Verificou-se que interações eletrostáticas entre fosfolipídios-PAH é fundamental para o crescimento dos filmes LbL de maneira controlada. Nesse sentido, os filmes LbL contendo os fosfolipídios aniônicos (CLP e DPPG) foram crescidos com grande número de bicamadas enquanto o filme LbL contendo o fosfolipídio zwitteriônico (DPPC) atingiu um máximo de 13 bicamadas. Além disso, a técnica LbL permitiu a imobilização de nanopartículas de Ag (AgNP) carregadas negativamente juntamente com os fosfolipídios aniônicos CLP e DPPG em uma camada de suporte de PAH.

Filmes LB contendo multicamadas do fosfolipídio DPPG também foram crescidos com êxito por meio de interações eletrostáticas entre os grupos PO_4^- (DPPG) e NH_3^+ (PAH). Essa possibilidade de interação foi verificada inicialmente via isotermas π -A dos filmes de Langmuir de DPPG formados na interface ar/água com subfase de água contendo diferentes concentrações de PAH. As isotermas de DPPG foram deslocadas para maiores áreas moleculares para concentrações mais elevadas de PAH. O crescimento linear dos filmes LB contendo multicamadas de (DPPG+PAH) foi monitorado por espectros de absorção de UV-VIS. O FTIR revelou que o montante de DPPG presente no filme LB é muito maior do que o PAH, como desejável.

Apesar da interação intermolecular com PAH nos filmes LB e LbL, ambos fosfolipídios mantiveram sua atividade biológica para detectar AM em aplicações sensoriais. Em termos de espectroscopia de impedância, foi constatado que a arquitetura molecular dos filmes depositados sobre os eletrodos interdigitados de Pt são relevantes para as medidas realizadas, uma vez que respostas elétricas distintas foram obtidas

dependendo da estruturação dos fosfolipídios. Além disso, o efeito da espessura do filme sobre a sensibilidade de um conjunto de unidades sensoriais formadas por filmes LB e LbL com números distintos de camadas foi explorado em soluções aquosas altamente diluídas de AM ($< 10^{-9}$ M). Foi constatado que os filmes LB e LbL mais espessos, contendo 5 camadas LB e 5 bicamadas LbL, apresentam um melhor recobrimento dos eletrodos interdigitados e conseqüentemente um desempenho mais significativo para a sensibilidade alcançada.

As análises Raman das unidades sensoriais, após a imersão em soluções de AM, revelaram que espectros RRS de AM foram coletados sobre domínios moleculares encontrados sobre a superfície dos sensores formados por filmes sem AgNP. Com a adição das AgNP o efeito SERRS do AM foi ativado possibilitando não somente a detecção em níveis de diluição elevados, mas também a distinção do arranjo molecular assumido pelo AM (monômeros ou agregados). Em função da elevada diluição do sistema utilizado (10^{-11} M), os espectros SERRS de AM coletados para regiões do filme LbL dominado por monômeros de AM apresentam variações significativas de um determinado ponto para outro. Essa variação é similar ao que foi encontrado para os espectros de AM quando em regime de uma única molécula. A partir disto experimentos específicos demonstraram a possibilidade de detecção de uma única molécula de AM, tanto em meio aquoso (utilizando colóides de Ag) quanto em filmes LB onde o AM foi disperso em uma matriz de DPPG.

Em termos de interação AM-fosfolipídios, os filmes de Langmuir demonstraram que os fosfolipídios aniônicos (CLP e DPPG) apresentam uma interação mais intensa com o AM quando comparado aos fosfolipídios zwitteriônicos (DPPC e DOPC). De fato, as interações eletrostáticas com o AM catiônico foram mais intensas com os fosfolipídios aniônicos, conforme evidenciado pelos deslocamentos das isotermas π -A.

Estudos de interação também foram realizados para os filmes LbL contendo AM imobilizados em matriz de DPPG e CLP. Com a incorporação de AM, alterações nos espectros FTIR do filme LbL de PAH/CLP foram detectadas principalmente no estiramento dos grupos fosfatos (PO_4^-) e aminos (NH_3^+) (interações eletrostáticas), assim como nas cadeias alquílicas (interação dipolo-dipolo). Essa interação com o AM deve ter uma influência sobre o microambiente hidrofílico e hidrofóbico das vesículas e PAH, causando além das modificações nos espectros FTIR, uma diminuição clara no tamanho e perfil das vesículas gigantes. No caso do DPPG as interações estabelecidas com o AM foram identificadas via FTIR, porém não são tão intensas quando comparadas com a CLP. Não foram observadas, por exemplo, interações do AM com as cadeias alquílicas do DPPG via FTIR.

Com a inserção de AM nos filmes contendo AgNP, ocorreu a ativação do efeito SERRS do AM, atingindo um fator de amplificação médio de 10^3 , atribuído ao mecanismo eletromagnético. As diferenças no perfil dos espectros SERRS de AM, principalmente para a intensidade relativa das bandas em 450 , 500 e 480 cm^{-1} , revelou que o AM pode ser estruturalmente organizado como monômeros ou agregados (dímeros, trímeros e assim por diante), dentro da matriz de fosfolipídio (CLP e DPPG). Além disso, espectros SERRS de AM coletados em diferentes pontos dos filmes LbL com resolução espacial em micrometros permitiu concluir que tanto o AM quanto as AgNP estão bem dispersos no filme. Esse resultado está de acordo com as imagens MEV que mostram as AgNP tanto isoladas (maioria) como agregadas, o que também foi sugerido pelos dados de UV-Vis.

Finalmente, conclui-se que a interação AM-DPPG nos filmes LB ou LbL contendo PAH, quando estes filmes são imersos em solução aquosa de AM, é fraca. No entanto, essa fraca interação não deve ser atribuída a uma competição com as interações

DPPG-PAH. As isotermas π -A revelaram uma maior afinidade entre DPPG e AM em comparação com DPPG e PAH, o qual foi suficiente para transferir o AM entre as camadas de DPPG para um substrato sólido formando os filmes LB, como mostrado via SERRS.

Capítulo VII

Considerações finais e perspectivas

Esta dissertação de mestrado apresentou resultados a partir das atividades executadas no período de março/2009 a fevereiro/2011 referentes ao projeto de mestrado financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP processo nº 08/07241-5. Este projeto é uma continuação do trabalho de IC do próprio candidato, o qual foi desenvolvido por um período de 24 meses (FAPESP 06/57132-2 e 08/02826-5), abordando a fabricação e caracterização estrutural de filmes LbL contendo multicamadas dos fosfolipídios DPPC e DPPG. Os resultados propiciaram redigir e submeter um artigo logo no início deste mestrado, o qual foi aceito para publicação na revista *Langmuir* e intitulado “*Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications*”. Esse trabalho serviu como base para o desenvolvimento deste projeto, o qual propiciou a redação de quatro novos artigos submetidos e aceitos pelas revistas *Langmuir*, *Journal of Raman Spectroscopy*, *Analytical Chemistry* e *Vibrational Spectroscopy*. Os resultados destes quatro artigos foram contemplados na redação desta dissertação de mestrado. Todos os trabalhos descritos acima propiciaram a participação em congressos nacionais e internacionais. Abaixo é apresentada a produção científica durante o período de elaboração da dissertação.

Artigos:

- (a) P. H. B. Aoki, D. Volpati, W. Caetano, C. J. L. Constantino, Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems, **Vibrational Spectroscopy**, 2010, 54, 93–102. DOI:10.1016/j.vibspec.2010.03.013.

(b) P. H. B. Aoki, P. Alessio, A. Riul Jr., J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, Coupling Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Electronic Tongue as Characterization Tools to Investigate Biological Membrane Mimetic Systems, **Anal. Chem.** 2010, 82, 3537–3546. DOI: 10.1021/ac902585a.

(c) P. H. B. Aoki, P. Alessio, J. A. De Saja, C. J. L. Constantino, Incorporation of Ag Nanoparticles into Membrane Mimetic Systems Composed by Phospholipid Layer-by-Layer (LbL) Films to Achieve Surface-enhanced Raman Scattering as a Tool in Drug Interaction Studies, **Journal of Raman Spectroscopy** 2010, 41, 40-48. DOI 10.1002/jrs.2415.

(d) P. H. B. Aoki, D. Volpati, A. Riul Jr., W. Caetano, C. J. L. Constantino, Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications, **Langmuir** 2009, 25, 2331-2338. DOI: 10.1021/la802696j.

(e) P. H. B. Aoki, P. Alessio, M. L. Rodríguez-Mendez, J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, Taking Advantage of Electrostatic Interactions to Grow Langmuir-Blodgett Films Containing Multilayers of the Phospholipid Dipalmitoyl Phosphatidyl Glycerol, **Langmuir** 2009, 25, 13062-13070. DOI 10.1021/la901923v.

Congressos:

(a) P. H. B. Aoki, P. Alessio, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, Taking Advantage of Electrostatic Interactions to Grow Langmuir-Blodgett Films Containing Multilayers of DPPG. In. **MAINTEC**, 2010, Presidente Prudente, SP. Livro de Resumos.

- (b) P. H. B. Aoki, D. Volpati, W. Caetano, C. J. L. Constantino, Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems. In. **SBPmat**, 2010, Ouro Preto, MG. Livro de Resumos.
- (c) P. H. B. Aoki, P. Alessio, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, Taking Advantage of Electrostatic Interactions to Grow LB and LbL Films Containing Multilayers of DPPG. In. **SBPmat**, 2010, Ouro Preto, MG. Livro de resumos.
- (d) S. A. Camacho, P. H. B. Aoki, C. J. L. Constantino, A. M. Pires, Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Hybrid Films Containing $Y_2O_3: Er, Yb$. In. **SBPmat**, 2010, Ouro Preto, MG. Livro de resumos.
- (e) P. H. B. Aoki, D. Volpati, A. Riul Jr., W. Caetano, C. J. L. Constantino, Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids applied as Transducers in Sensing Applications. In: **INEO**, 2009, Atibaia. Livro de resumos.
- (f) P. H. B. Aoki, D. Volpati, A. Riul Jr., W. Caetano, C. J. L. Constantino, Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids applied as Transducers in Sensing Applications. In: International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures **ISAMN**, 2009, Santo André. Livro de resumos.
- (g) P. H. B. Aoki, P. Alessio, J. A. De Saja, C. J. L. Constantino, Incorporation of Ag Nanoparticles into Membrane Mimetic Systems Composed by Phospholipid Layer-by-Layer (LbL) Films to Achieve Surface-enhanced Raman Scattering as a Tool in Drug Interaction Studies, **ICAM**, 2009, Rio de Janeiro, Livro de resumos.

- (h) P. H. B. Aoki, P. Alessio, M. L. Rodriguez-Mendez, J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino, Taking Advantage of Electrostatic Interactions to Grow Langmuir-Blodgett Films Containing Multilayers of DPPG, **ICAM**, 2009, Rio de Janeiro, Livro de resumos.
- (i) F. C. Cabrera, P. H. B. Aoki, R. F. Aroca, C. J. L. Constantino, A. Job, Natural Rubber Membranes with Gold Nanoparticles for Application as Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Substrate, **ICAM**, 2009, Rio de Janeiro, Livro de resumos.
- (j) J. E. Oliveira, L. E. O. Iwaki, P. H. B. Aoki, C. J. L. Constantino, V. Zucolotto, L. H. C. Mattoso, Immobilization of Single Walled Carbon Nanotubes on Conducting Polymers-modified Electrodes, **ICAM**, 2009, Rio de Janeiro, Livro de resumos.
- (k) L. E. O. Iwaki, J. E. Oliveira, P. H. B. Aoki, L H C. Mattoso, C. J. L. Constantino, V. Zucolotto, Influence of Polyelectrolyte on the Electrochemical Response of Single-Walled Carbon Nanotubes-Modified Electrodes for Biosensing, **ICAM**, 2009, Rio de Janeiro, Livro de resumos.
- (l) P. H. B. Aoki, Filmes Nanoestruturados de Fosfolipídios como Sistemas Miméticos de Membranas Biológicas para aplicação de Sensores via SERS e Espectroscopia de Impedância, seminário apresentado durante a **7ª semana da Física/FCT-UNESP**, 2009, Presidente Prudente.
- (m) P. H. B. Aoki, P. Alessio, J. A. De Saja, C. J. L. Constantino, Incorporação de AgNP em filmes LbL de fosfolipídio biológico para o estudo de

interações com fenotiazínico AM utilizando o efeito SERRS como instrumento de análise, **ENBRAER**, 2009, São Pedro, Livro de resumos.

Durante a realização do projeto foi possível estabelecer e fortalecer parcerias com outros pesquisadores que colaboraram de forma categórica com os objetivos aqui alcançados, como o *Dr. Antonio Riul Jr.* da UFSCar/Sorocaba, o *Dr. Wilker Caetano* da UEM/Maringá e o *Dr. Ricardo Aroca* da University of Windsor, Canadá. A colaboração com o Dr. Aroca se deu a partir de um convite para a realização de um estágio em seu grupo de pesquisa (*Materials and Surface Science Group – Department of Chemistry and Biochemistry*), o qual foi realizado no período de 01 de abril a 30 de junho de 2010 (documento anexado ao final da dissertação) com o objetivo de iniciar e aprimorar o uso e os fundamentos de algumas técnicas de caracterização de materiais como SER(R)S e AFM. Também foi realizado um estágio (26/11/2010 a 16/12/2010) na universidade de Tsinghua – Beijing/China, sob a orientação do professor Dr. Xi Zhang, especialista na caracterização de filmes finos através da técnica de espectroscopia de foga atômica (AFS).

Como perspectivas futuras, pretende-se publicar os resultados aqui apresentados relativo a detecção de uma molécula de AM via SERS utilizando como matriz monocamadas formadas pelo fosfolipídio DPPG. Em termos da continuidade dos estudos em nível de doutorado, o estudante está regularmente matriculado no programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Materiais (POSMAT) e um projeto intitulado *Filmes Layer-by-Layer (LbL) e Langmuir-Blodgett (LB) de Fosfolipídios como Sistemas Miméticos Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos* foi aprovado pela FAPESP (processo nº 2010/17965-0).

January 10, 2010

To whom it may concern.

I am writing to confirm our invitation to Pedro Henrique Benites Aoki, currently a Graduate student (and FAPESP scholar) in the “Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)”, C.P. 467, Presidente Prudente, 19060-900, SP, Brazil, to come to Windsor as a visiting student to carry out research in our Laboratory of the Materials and Surface Science Group (MSSG) at the University of Windsor during the year 2010 (from March 30 to June 30, 2010). The visit is part of a strong international collaboration between the UNESP of São Paulo State and the University of Windsor that already has produced an extensive list of joint scientific publications. Our groups can combine materials characterization techniques and the application of surface-enhanced spectroscopy to ultrasensitive detection using plasmonics in metallic nanostructures.

Please do not hesitate to contact me if you need further information.

FAX 519-973-7098 Phone: 519-253-4232 (Ext. 3528)

Sincerely,



Ricardo Aroca, FCIC
University Professor
Materials & Surface Science Group
University of Windsor



清华大学

Tsinghua University

December 6th, 2010

To whom it may concern.

I am writing to confirm that Pedro Henrique Benites Aoki, currently a graduate student (and FAPESP scholar) in the Department of Physics, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNESP, C.P. 467, Presidente Prudente, 19060-900, SP, Brazil, was a visiting student here in Beijing and carried out research in our Laboratory of organic optoelectronics & molecular engineering at the Tsinghua University – Beijing/China during the year 2010 (November 27th to December 17th).

Please do not hesitate to contact me if you need further information.

Phone: +86 (10) 62773672

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "Huaping Xu".

Huaping Xu,
Associate Professor
Tsinghua University –Beijing/China

Referências

- [1] AGASOLER, A.V.; HOLMSEN, H.; **Biophysical Chemistry** 91, 37, 2001.
- [2] GUPTA, R. R. **Phenothiazines And 1,4-Benzothiazines: Chemical And Biomedical Aspects**, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [3] HIDALGO, A.A.; CAETANO, W.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR., O.N. **Biophys. Chem.** 109, 85, 2004.
- [4] PARKANYI, C.; BONIFACE, C.; AARON, J. J.; MAAFI, M. **Spectrochim. Acta** 12, 1715, 1993.
- [5] RAMU, A.; RAMU, N. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 30, 165, 1992.
- [6] NIU, W.; NIE F.; LU, J. **Anal. Sci.** 22, 971, 2006.
- [7] ZHONG, J.; QI, Z.; DAI, H.; FAN, C.; LI, G.; MATSUDA, N.; **Anal. Sci.** 19, 653, 2003.
- [8] ATTWOOD, D. **Adv. Colloid Interface Sci.** 55, 271, 1995.
- [9] BARBOSA, L. R. S.; CAETANO, W.; ITRI, R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; TABAK, M. **J. Phys. Chem. B.** 110, 13086, 2006.
- [10] CAETANO, W.; HADDAD, P. S.; ITRI, R.; SEVERINO, D.; VIEIRA, V. C.; BAPTISTA, M. S.; SCHRÖDER, A. P.; MARQUES, C. M. **Langmuir** 22, 1307, 2007.
- [11] BASAVAIHAH, K.; KRISHNAMURTHY, G.; **Anal. Sci.** 15, 67, 1999.
- [12] CHOI, H. N.; CHO, S. H.; PARK, Y.J.; LEE, D. W.; LEE, W.Y. **Anal. Chim. Acta** 541, 49, 2005.
- [13] BOUCHTA, D.; IZAOUEN, N.; ZEJLI, H.; KAOUTIT, M. E.; TEMSAMANI, K. R. **Biosensors And Bioelectronics** 20, 2228, 2005.
- [14] SIMONS, K.; IKONEN, E. **Nature** 387, 659, 1997.
- [15] Website http://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasm%C3%A1tica acessado em 26/03/2011.

-
- [16] RICCHELLI, F. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology** 29, 109, 1995.
- [17] JORI, G. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology** 36, 87, 1996.
- [18] WRIGHT, M.M.; HOWE, A. G.; ZAREMBERG, V. **Biochem. Cell Biol.** 82, 18, 2004.
- [19] DAUM, G. **Biochim. Biophys. Acta** 822, 1, 1985.
- [20] LIPOWSKI, R.; SACKMANN, E. **Handbook Of Biological Physics**, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [21] YASUI, K.; UEGAKI, M.; SHIRAKI, K.; ISHIMIZU, T., **Protein Science** 19 (3), 486, 2010.
- [22] SEKULA, S.; FUCHS, J.; WEG-REMERS, S.; NAGEL, P.; SCHUPPLER, S.; FRAGALA, J.; THEILACKER, N.; FRANUEB, M.; WINGREN, C.; ELLMARK, P.; BORREBAECK, C. A. K.; MIRKIN, C. A.; FUCHS, H.; LENHERT, S., **Small** 4 (10), 1785, 2008.
- [23] MARTIN, F.; LASIC, D. D. **Stealth Liposomes**, CRC Press, New York, 1995.
- [24] CAETANO, W.; FERREIRA, M.; TABAK, M.; MOSQUERA SANCHEZ, M. I.; OLIVEIRA JR., O.N.; KRUGER, P.; SCHALKE, M.; LOSCHE, M. **Biophysical Chemistry** 91, 21, 2001.
- [25] LASIC, D.D. **Structure And Dynamics Of Membranes**, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [26] GOTO, T. E.; LOPEZ, R. F.; OLIVEIRA, O. N.; CASELI, L., **Langmuir** 26 (13), 11135, 2010.
- [27] RAMOS, A. P.; PAVANI, C.; IAMAMOTO, Y.; ZANIQUELLI, M. E. D., **Journal of Colloid and Interface Science** 350 (1), 148, 2010.
- [28] CONDE, M. M.; CONDE, O.; TRILLO, J. M.; MINONES, J., **Journal of Physical Chemistry B** 114 (33), 10774, 2010.
- [29] JUNGHANS, A.; CHAMPAGNE, C.; CAYOT, P.; LOUPIAC, C.; KOPER, I., **Langmuir** 26 (14), 12049, 2010.
- [30] KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ, R. **Peptides** 29, 7, 2008.

-
- [31] CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA JR., O. N. **Journal Of Colloid And Interface Science** 319, 100, 2008.
- [32] CASELI, L.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JR., O. N. **Langmuir** 24, 4150, 2008.
- [33] GEORGIEV, G. A.; KUTSAROVA, E.; JORDANOVA, A.; KRASTEVA, R.; LALCHEV, Z., **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces** 78 (2), 317, 2010.
- [34] NAKAHARA, H.; LEE, S.; SHIBATA, O., **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes** 1798 (6), 1263, 2010.
- [35] COLDRICK, Z.; STEENSON, P.; MILLNER, P.; DAVIES, M.; NELSON, A., **Electrochimica Acta** 54 (22), 4954, 2009.
- [36] KAMILYA, T.; PAL, P.; MAHATO, M.; TALAPATRA, G. B., **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 9 (5), 2956, 2009.
- [37] ZHAO, L. Y.; FENG, S. S. **Journal Of Colloid And Interface Science** 285, 326, 2005.
- [38] ANTUNES, P. A.; OLIVEIRA JR., O. N.; AROCA, R. F.; CHIERICE, G. O.; C. J. L. CONSTANTINO, **Applied Surface Science** 246, 323, 2005.
- [39] BALOBANOV, V. A.; IL'INA, N. B.; KATINA, N. S.; KASHPAROV, I. A.; DOLGIKH, D. A.; BYCHKOVA, V. E., **Molecular Biology** 44 (4), 624, 2010.
- [40] NUSSIO, M. R.; VOELCKER, N. H.; MINERS, J. O.; LEWIS, B. C.; SYKES, M. J.; SHAPTER, J. G., **Chemistry and Physics of Lipids** 163 (2), 182, 2010.
- [41] WANG, Y. G.; WANG, R. Q.; LU, X. Y.; LU, W. L.; ZHANG, C. L.; LIANG, W., **Pharmaceutical Research** 27 (2), 361, 2010.
- [42] MASKARINEC, S. A.; HANNIG, J.; RAPHAEL, C. L.; LEE, C.; YEE, K. **Biophysical Journal** 82, 1453, 2002.
- [43] SCHROEDER, A.; KOST, J.; BARENHOLZ, Y., **Chemistry and Physics of Lipids** 162 (1-2), 1, 2009.
- [44] GUO, S. H.; SHI, X. L.; YANG, F.; CHEN, L. Q.; MEEHAN, E. J.; BIAN, C. B.; HUANG, M. D., **Biochemical Journal** 423, 23, 2009.
- [45]. OLIVEIRA JR., O.N.; TAYLOR, D.M. **Ciência Hoje** 12, 67, 1990.

-
- [46] LANGMUIR, I. **Journal of American Chemistry Society** 38, 2221, 1926.
- [47] LANGMUIR, I. **Journal of American Chemistry Society** 39, 1848, 1917.
- [48] PETTY, M.C. **Langmuir-Blodgett Films – an Introduction**, Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [49] PENG, J.B.; BARNES, G.T.; GENTLE, I.R. **Advanced in Colloidal and Interface Science** 91, 163, 2001.
- [50] BARROS, A.M. et al. **Thin Solid Film** 354, 215, 1999.
- [51]. PASQUINI, D. et al. **VI Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Guaratingueta, Brasil, 1999.
- [52]. OLIVEIRA JR., O.N. et al. **Cellulose Chemistry and Technology** 28, 514-549, 1994.
- [53]. RIUL JR., A. **Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de Polianilinas**, 1998, Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos/USP, São Carlos.
- [54] BLODGETT, K. B. **Journal of American Chemistry Society** 57, 1007, 1935.
- [55] LANGMUIR, I.; SCHAEFER, V. J., **Journal of American Chemistry Society** 58, 284, 1936.
- [56] LANGMUIR, I.; SCHAEFER, V. J., **Science** 85, 78, 1937.
- [57] CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JR. O. N. **Journal of colloid and interface science** 319, 100, 2008.
- [58] CASELI, L.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D. T.; OLIVEIRA JR., O. N. **Langmuir** 24, 4150, 2008.
- [59] JUNGHANS, A.; CHAMPAGNE, C.; CAYOT, P.; LOUPIAC, C.; KOPER, I. **Langmuir** 26(14), 12049, 2010.
- [60] NAKAHARA, H.; LEE, S.; SHIBATA, O. **Biochimica et Biophysica Acta** 1798, 1263–1271, 2010.
- [61] SANTOS, T. C. F.; O. L.; WANG, P. S. H.; OLIVEIRA JR., O. N.; CASELI, L. **Langmuir** 26(8), 5869–5875, 2010.

-
- [62] PICAS, L.; SUAREZ-GERMA, C.; MONTERO, M. T.; HERNANDEZ-BORRELL, J. J. **Phys. Chem. B** 114, 3543–3549, 2010.
- [63] ILER, R. **Journal of colloid and interface science** 21, 569, 1966.
- [64] MAOZ, R.; NETZER, L.; GUN, J.; SAGIV, J. J. **Chim. Phys** 83, 1059, 1988.
- [65] DECHER, G. **Science** 277, 1232, 1997.
- [66] PATERNO, G. L.; MATTOSO, C. H. L.; OLIVEIRA jr., O. N. **Química nova** 24, 228, 2001.
- [67] YANG, Y; XU, L.; XU, B.; DU, X.; GUO, W. **Mater. Lett.** 63, 608, 2009.
- [68] ALESSIO, P.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L.; SAEZ, J. A. D.; CONSTANTINO, C. J. L., **Physical Chemistry Chemical Physics** 12 (16), 3972, 2010.
- [69] IZQUIERDO, A.; ONO, S. S.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; DECHER, G., **Langmuir** 21 (16), 7558, 2005.
- [70] POPA, G.; BOULMEDAIS, F.; ZHAO, P.; HEMMERLE, J.; VIDAL, L.; MATHIEU, E.; FELIX, O.; SCHAAF, P.; DECHER, G.; VOEGEL, J. C., **Acs Nano** 4 (8), 4792, 2010.
- [71] SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, Toronto, Bookman, 2002.
- [72] NUSSENZVEIG, H.M. **Curso de Física Básica 4**, Rio de Janeiro, Edgard Blücher Ltda, 2002.
- [73] ATKINS, P.W. **Físico-Química**, Rio de Janeiro, Editora LTC; 1999.
- [74] VOLPATI, D. **Fabricação e Caracterização de Filmes Finos de Perileno: Arquitetura Molecular e Aplicações Sensoriais**. 2008. 119f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2008.
- [75] AROCA, R. **Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy**, New York, John Wiley & Sons, 2006.
- [76] ALBERTY, R. A.; SILBEY, R.J. **Physical Chemistry**, New York, 2º ed., John Wiley & Sons, 1996.

-
- [77] SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**, São Paulo, Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
- [78] LASERNA, J.J. **Modern Techniques in Raman Spectroscopy**, Toronto, John Wiley & Sons, 1996.
- [79] MCCREERY, R.L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**, Toronto, Wiley-Interscience, 2000.
- [80] SCHMID, G., **Nanoparticles. From theory to Applications**. Wiley-VCH Verlag: Essen, 2005.
- [81] CAMPELO, J. M.; LUNA, D.; LUQUE, R.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A., **Chemoschem** 2, 18, 2009.
- [82] KHLEBTSOV, N. G.; DYKMAN, L. A., **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer** 111, 1, 2010.
- [83] LIU, S. Q.; TANG, Z. Y., **Journal of Materials Chemistry** 20, 24, 2010.
- [84] NATAN, M. J.; LYON, L. A., **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications**. New York, 2002.
- [85] JEANMAIRE, D. L.; VANDUYNE, R. P., **Journal of Electroanalytical Chemistry** 84, 1, 1977.
- [86] MOSKOVITS, M., **Reviews of Modern Physics** 57 (3), 783, 1985.
- [87] NOGUEZ, C., **Journal of Physical Chemistry C** 111 (10), 3806, 2007.
- [88] FLEISCHMAN, M.; HENDRA, P.J.; MCQUILAN, A.J. **Chemical Physics Letters** 26, 163, 1974.
- [89] WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P., **Annual Review of Physical Chemistry** 58, 267, 2007.
- [90] ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A., **Journal of the American Chemical Society** 99, 5215, 1977.
- [91] LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G., **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (and related plasmonic effects)**. Elsevier: Amsterdam, 2009.
- [92] LIU, S. Q.; TANG, Z. Y., **Journal of Materials Chemistry** 20, 24, 2010.

-
- [93] BATTISTI, D.; AROCA, R., **Journal of Molecular Structure** 218, 351, 1990.
- [94] KIM, J. H.; COTTON, T. M.; UPHAUS, R. A.; MOEBIUS, D., **J. Phys. Chem.**, 93 (9), 3713, 1989.
- [95] MAITI, A. K.; AROCA, R.; NAGAO, Y., **Journal of Raman Spectroscopy** 24 (6), 351, 1993
- [96] BJERNELD, E. J.; FOELDES-PAPP, Z.; KAELL, M.; RIGLER, R., **Journal of Physical Chemistry B** 106 (6), 1213, 2002.
- [97] NATAN, M. J.; LYON, L. A., New York, 2002.
- [98] KNEIPP, J.; KNEIPP, H.; KNEIPP, K., **Chemical Society Reviews** 37, 1052, 2008.
- [99] GIORGETTI E.; MARGHERI, G.; SOTTINI, S.; Muniz-Miranda. M. **Synthetic Metals** 139, 929, 2003.
- [100] KOVACS, G. J.; LOUTFY, R. O.; VINCETT, P. S.; Jennings, C.; Aroca R., **Langmuir** 2, 689, 1986.
- [101] PIECZONKA, N. P. W.; MOULA, G.; AROCA, R. F. **Langmuir** 25(19), 11261, 2009.
- [102] PIECZONKA, N. P. W.; AROCA, R. F., **Chemical Society Reviews** 37 (5), 946 2008.
- [103] LAKOWICZ, J.R. **Principle of Fluorescence Spectroscopy** ,2^o ed., New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999.
- [104] LAMBERT, J.B. et al. **Organic Structural Spectroscopy**, Toronto, Prentice-Hall, 1998.
- [105] HORNYAK, G.L. et al. **Micron** 29, 183, 1998.
- [106] IKAI, A. **Surface Science Reports** 26, 261, 1996.
- [107] WITHERS, J.R.; ASTON D.E. **Advances in Colloid and Interface Science** 120, 57, 2006.
- [108] BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. **Physical Review Letters** 56, 930, 1986.

-
- [109] MACDONALD, J.R. **Impedance Spectroscopy**; New York; John Wiley & Sons; 1987.
- [110] RIUL Jr, A.; GALLARDO, A. M.; MELLO, S.V.; BONE, S.; TAYLOR, D. M.; MATTOSO, L.H.C. **Synthetic Metals** 2003, 132, 109.
- [111] TAYLOR, D.M.; MACDONALD, A.G. **Journal of Physics D: Applied Physics** 1987, 20, 1277.
- [112] RIUL Jr, A.; DOS SANTOS Jr., D.S.; WOHNATH, K.; DI TOMMAZO, R.; CARVALHO, A.C.P.L.F.; FONSECA, F.J.; OLIVEIRA Jr., O.N.; TAYLOR, D.M.; MATTOSO, L.H.C. **Langmuir** 2002, 18, 239.
- [113] JOHNSON, R.A.; WICHERN, D. **Applied multivariate statistical analysis**, New Jersey, Prentice-Hall, 1982.
- [114] MIÑONES JR., J.; DYNAROWICZ, P.; MIÑONES, J.; PATINO, J. M.; IRIBARNEGARAY, E., **Journal of Colloid and Interface Science** 2003, 265, 380.
- [115] BOGGS, J. M. **Biochimica et Biophysica Acta** 906, 353, 1987.
- [116] SAINZ, M.C.; CHANTRES, J.R.; ELORZA, B.; ELORZA, M.A. **International Journal of Pharmaceutics** 1993, 89, 183
- [117] LEE, P. C.; MEISEL, D. **J. Phys. Chem.** 86, 3391, 1982.
- [118] ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; ARCEO, E.; GOULET, P. J. G.; GARRIDO, J. J.; AROCA, R. F. **J. Phys. Chem. B** 109,3787, 2005.
- [119] KNEIPP, K.; FASSLER, D. **Chemical Physics Letters** 106, 498, 1984.
- [120] HILDEBRANDT, P.; STOCKBURGER, M. **J. Phys. Chem.** 88, 5935, 1984.
- [121] WANG, Y.; ESWARAMOORTHY, S. K.; SHERRY, L.J.; DIERINGER, J. A.; CAMDEN, J. P.; SCHATZ, G. C.; VAN DUYN, R. P.; L. D. MARKS, **Ultramicroscopy** 109, 1110, 2009.
- [122] ŠILEIKAITĖ, A.; PUIŠO, J.; PROSYČEVAS, I.; TAMULEVIČIUS, S. **Materials Science (Medžiagotyra)** 15, 21, 2009.
- [123] HUBNER, W.; MANTSCH, H.H.; KATES, M. **Biochimica et Biophysica Acta** 1066, 166, 1991.
- [124] CASAL, H. L.; MANTSCH, H. H. **Biochimica et Biophysica Acta** 779, 381, 1984.

-
- [125] HARRIS, J. J.; BRUENING, M. L. **Langmuir** 16, 2006, 2000.
- [126] BONAZZOLA, C.; CALVO, E. J.; NART, F. C. **Langmuir** 19, 5279, 2003.
- [127] AOKI, P. H. B.; VOLPATI, D.; RIUL JR., A.; CAETANO, W.; CONSTANTINO, C. J. L. **Langmuir** 25 (4), 2331, 2009
- [128] MANTSCH, H.H. **Journal of Molecular Structure** 113, 201, 1984.
- [129] YOU, H. X.; QI, X. Y.; GRABOWSKI, G. A.; YU, L. **Biophysical Journal** 84, 2043, 2003.
- [130] LUNELLI, L.; PASQUARDINI, L.; PEDERZOLLI, C.; VANZETTI, L.; ANDERLE, M. **Langmuir** 21, 8338, 2005.
- [131] TARASOVA, A.; GRIESSER, H. J.; MEAGHER, L. **Langmuir** 24, 7371, 2008.
- [132] FANG, Y.; YANG, J. **Biochimica et Biophysica Acta** 1324, 309, 1997.
- [133] VOLODKIN, D.; ARNTZ, Y.; SCHAAF, P.; MOEHWALD, H.; VOEGEL, J. C.; BALL, V. **Soft Matter** 4, 122, 2008.
- [134] ANGELOVA, M.; DIMITROV, D. S. **Faraday Discuss. Chem. Soc.** 81, 303, 1986.
- [135] REEVES, J.P.; DOWBEN, R.M. **Journal of Cellular Physiology** 73, 49, 1969.
- [136] RODRIGUEZ, N.; PINCET, F.; CRIBIER, S. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 42, 125, 2005.
- [137] AKASHI, K.; MIYATA, H.; ITOH, H.; KINOSITA, K. **Biophysical Journal** 71, 3242, 1996.
- [138] TOMSIE, N.; BABNIK, B.; LOMBARDO, D.; MAVCIC, B.; KANDUSER, M.; IGLIC, A.; KRALJ-IGLIC, V. **Journal of Chemical Information and Modeling** 45, 1676, 2005.
- [139] URBANIJA, J.; BABNIK, B.; FRANK., M.; TOMSIC, N.; ROZMAN, B.; KRALJ-IGLIC, V.; IGLIC, A. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters** 37, 1085, 2008.
- [140] PIECZONKA, N.P.W.; GOULET, P. J. G.; AROCA, R. F. **J. Am. Chem. Soc.** 128, 12626, 2006.

-
- [141] ZHANG, F.; SRINIVASAN, M. P. **Journal of Colloid and Interface Science** 319, 450, 2008.
- [142] GOULET, P.J.G.; DOS SANTOS JR., D.S.; ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; OLIVEIRA JR, O.N.; AROCA, R.F. **Langmuir** 21, 5576, 2005.
- [143] SHIRATORI, S. S.; RUBNER, M. F. **Macromolecules** 33, 3213, 2000.
- [144] DICKO, A.; BOURQUE, H.; PEZOLET, M. **Chemistry and Physics of Lipids** 96, 125, 1998.
- [145] MAO, G.; DESAI, J.; FLACH, C.R.; MENDELSON, R. **Langmuir** 24, 2025, 2008.
- [146] KWON, K. O.; KIM, M. J.; ABE, M.; ISHINOMORI, T.; OGINO, K. **Langmuir** 10, 1415, 1994.
- [147] TAYLOR, D. M.; MACDONALD, A. G. **J. Phys. D: Appl. Phys.** 20, 1277, 1987.
- [148] GORBAN, A., KEGL, B., WUNSCH, D., ZINOVYEV, A. **Principal Manifolds for Data Visualisation and Dimension Reduction**; Springer: Berlin, 2007.
- [149] NICOLAI, S. H. A.; RUBIM, J. C. **Langmuir** 19, 4291, 2003.
- [150] AROCA, R. F.; CONSTANTINO, C. J. L. **Langmuir** 16, 5425, 2000.
- [151] RIUL JR., A.; DOS SANTOS, D. S.; WOHNATH, K.; DI TOMMAZO, R.; CARVALHO, A. C. P. L. F.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR.; O. N.; TAYLOR, D. M.; MATTOSO, L. H. C. **Langmuir** 18, 239-245, 2002.
- [152] ROSEI, F. **Journal of Physics-Condensed Matter** 16, S1373-S1436, 2004.
- [153] SILVA, H. S.; MIRANDA, P. B. **Journal of Physical Chemistry B** 113, 10068, 2009.
- [154] AOKI, P. H. B.; ALESSIO, P.; RIUL Jr., A.; DE SAJA SAEZ, J. A.; CONSTANTINO, C. J. L., **Anal. Chem.** 82, 3537, 2010.
- [155] KOVACS, G. J.; LOUTFY, R. O.; VINCETT, P. S.; JENNINGS, C.; AROCA, R. F. **Langmuir** 2, 689, 1986.
- [156] CONSTANTINO, C. J. L.; DUFF, J.; AROCA, R. F. **Spectrochimica Acta Part A** 57, 1249, 2001.

-
- [157] NICOLAI, S. H. A.; RODRIGUES, P. R. P.; AGOSTINHO, S. M. L.; RUBIM, J. C. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 527, 103, 2002.
- [158] CONSTANTINO, C. J. L.; ANTUNES, P. A.; LEMMA, T.; AROCA, R. **Analytical Chemistry** 73, 3674, 2001.
- [159] CONSTANTINO, C. J. L.; LEMMA, T.; ANTUNES, P. A.; AROCA, R. **Spectrochimica Acta A** 58, 403, 2002.
- [160] CONSTANTINO, C.J.L.; LEMMA, T.; ANTUNES, P.A.; GOULET, P.; AROCA, R. **Applied Spectroscopy** 57, 649, 2003.
- [161] KNEIPP, K.; WANG, Y., KNEIPP, H.; PERELMAN, L.T.; ITZKAN, I. **Physical Review Letters** 78, 1667, 1997.
- [162] DELFINO, I.; BIZZARRI, A.R.; CANNISTRARO, S. **Biophysical Chemistry** 113, 41, 2005.
- [163] ZHANG, Z. L.; YIN, Y. F.; JIANG, J. W.; MO, Y. J. **Journal of Molecular Structure** 920, 297, 2009.
- [164] TOLAIEB, B.; CONSTANTINO, C. J. L.; AROCA, R. **Analyst** 129, 337, 2004.
- [165] TARCHA, P. J.; DE SAJA-GONZALEZ, J.; RODRIGUEZ-LLORENTE, S.; AROCA, R. F. **Applied Spectroscopy** 53, 43, 1999.
- [166] JOCKUSCH, S. N. J. TURRO, D. A. **Tomalia, Macromolecules** 28, 7416, 1995.
- [167] D. Severino, H. C. Junqueira, M. Gugliotti, D. S. Gabrielli, M. S. Baptista, *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 77(5): 459.
- [168] VARGA, O.; KUBINYI, M.; VIDÓCZY, T.; BARANYAI, P.; BITTER, I.; KÁLLAY, M. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 207, 167, 2009.
- [169] GOULET, P. J. G.; PIECZONKA, N. P. W.; AROCA, R. F. **J. Raman Spectrosc.** 36, 574, 2005.
- [170] ETCHEGOIN, P. G.; MEYER, M.; BLACKIE, E.; LE RU, E. C. **Anal. Chem.** 79, 8411, 2007.
- [171] GUPTA, R. R. **Phenothiazines and 1,4-Benzothiazines: Chemical and Biomedical Aspects**, Elsevier, Amsterdam, 1988.

[172] HENDRICH, A. B.; LICHACZ, L.; BUREK, A.; MICHALAK, K. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 7, 1081, 2002.

[173] SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. **Proc. Natl. Sci. USA** 71, 4457, 1974.

[174] MALHEIROS, S. V.; DE PAULA, E., **Biochim. Biophys. Acta** 1373, 332, 1998.

[175] LIEBER, M. R.; LANGE, Y.; WEINSTEIN, R. S.; STECK, T. L. **J. Biol. Chem.** 259, 9225, 1984.

[176] HOLMSEN, H.; RYGH, T. **Biochem. Pharmacol.** 40, 373, 1990.

[177] EVANS, E.; NEEDHAM, D.; **J. Phys. Chem.** 91, 4219, 1987.

[178] SCOTT, A. P.; RADOM, L. **J. Phys. Chem.** 100, 16502, 1996.

[179] SARKAR, S.; PANDE, S.; JANA, S.; SINHA, A. K.; PRADHAN, M.; BASU, M.; CHOWDHURY, J.; PAL, T. **J. Phys. Chem. C** 112, 17862, 2008.

[180] SOMANIA, P. R. R.; MARIMUTHUA, A.K.; VISWANATHA, S. **Polymer Degradation and Stability** 79, 77, 2003.