

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

**RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE  
APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE  
SISTEMAS ARBORESCENTES HEMOCOMPATÍVEIS**

Vanessa Moreira Giarola

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

**Itajubá, março de 2007.**

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

## **Dissertação de Mestrado**

# **Ressonância de Plásmons de Superfície Aplicada ao Desenvolvimento de Sistemas Arborescentes Hemocompatíveis**

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

Área de concentração: Biomateriais.

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

Itajubá, março de 2007.

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

G349r

Giarola, Vanessa Moreira

Ressonância de Plásmon de Superfície aplicada ao desenvol\_  
vimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis/ Vanessa  
Moreira Giarola. -- Itajubá, (MG) : UNIFEI. 2007.

150p. :il.

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

1. Plásmon de Superfície. 2. Hemocompatibilidade. 3. Poli\_  
glicerol Dendrítico. I. Queiroz, Álvaro Antônio Alencar de,  
orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

CDU 575. 133(043)

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando;

A certeza de que precisamos continuar e;

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da queda um passo de dança;

Do medo uma ponte do sonho, uma escada;

Da procura um encontro.

Só assim terá valido a pena existir."

Fernando Pessoa

## **Agradecimentos**

À Deus, cheio de bondade, que me deu saúde e força para vencer todos os meus obstáculos.

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

Ao meu namorado, Marcelo Vivas, pelo seu amor, carinho, companheirismo, amizade e apoio durante toda essa caminhada.

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

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

Aos professores Dr. Julio San Román Dal Barrio e Dr. Roberto Sastre do Instituto de Ciências e Tecnologia de Polímeros do Consejo Superior de Investigación Científica – ICTP/CSIC.

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

Aos funcionários da secretaria do ICE/UNIFEI, em especial à Edvandra, Marília e Roseli.

Às funcionárias da PPG/UNIFEI, em especial à Maria Alta e a Margareth.

Ao Kalu, técnico responsável pelos laboratórios didáticos de Física da UNIFEI.

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

A CAPES pelo suporte financeiro.

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

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
<b>CAPÍTULO 1 – APLICAÇÕES DE POLÍMEROS NA MEDICINA: ÁREA CARDIOVASCULAR.....</b>	<b>1</b>
1.1 – Introdução.....	1
1.2 – Stents, marcapassos e cateteres de uso prolongado.....	3
1.3 – Oxigenadores e máquinas de diálise.....	7
1.4 – O coração artificial.....	10
1.5 – Considerações parciais.....	12
1.6 – Referências bibliográficas.....	13
<b>CAPÍTULO 2 – POLÍMEROS E A CASCATA DA COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA.....</b>	<b>16</b>
2.1 – Polímeros sintéticos.....	16
2.2 – Fisiologia da coagulação.....	17
2.2.1 – A cascata de coagulação.....	21
2.2.2 – Mecanismo de inibição da coagulação sangüínea.....	22
2.3 – Considerações parciais.....	23
2.4 – Referências bibliográficas.....	24

<b>CAPÍTULO 3 – ASPECTOS FÍSICOS-QUÍMICOS DA HEMOCOMPATIBILIDADE.....</b>	<b>26</b>
3.1- Introdução.....	26
3.2 – Topologia e rugosidade de superfície.....	26
3.3 – Densidade superficial de carga.....	28
3.4 – Hipótese termodinâmica da hemocompatibilidade.....	30
3.5 – Interações intermoleculares.....	32
3.5.1 – Forças de van der Waals.....	32
3.5.2 – Ligações de hidrogênio.....	33
3.6 – As isotermas de adsorção.....	34
3.6.1 – A isoterma de adsorção de Langmuir.....	34
3.6.2 – A isoterma de adsorção de Freundlich.....	36
3.7 – Considerações parciais.....	37
3.8 – Referências bibliográficas.....	38
<b>CAPÍTULO 4 – FUNDAMENTOS SOBRE ESTRUTURAS POLIMÉRICAS ARBORESCENTES.....</b>	<b>41</b>
4.1 – Introdução.....	41
4.2 – Os dendrímeros e suas propriedades.....	43
4.3 – Síntese de dendrímeros.....	45
4.3.1 – Método divergente.....	45
4.3.2 – Método convergente.....	46
4.4 – Os dendrímeros e suas aplicações.....	47
4.5 – O poliglicerol dendrítico.....	48
4.6 – Considerações parciais.....	48
4.7 – Referências bibliográficas.....	49
<b>CAPÍTULO 5 – A INTERAÇÃO RADIAÇÃO-MATÉRIA COMO FERRAMENTA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA HEMOCOMPATIBILIDADE.....</b>	<b>51</b>
5.1 – Introdução.....	51
5.2 – Espectroscopia vibracional (FTIR).....	51

5.3 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	54
5.4 – Espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (RPS).....	55
5.5 – Considerações parciais.....	56
5.6 – Referências bibliográficas.....	57

## **CAPÍTULO 6 – FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE.....58**

6.1 – Reflexão interna total.....	58
6.2 – Princípios físicos da Ressonância de Plásmon.....	60
6.2.1 – Métodos práticos de excitação de plásmons de superfície.....	61
6.2.2 – Configuração de Kretschmann.....	61
6.2.3 – Configuração de Otto.....	62
6.2.4 – Aspectos físicos da configuração de Kretschmann.....	63
6.3 – Determinação dos parâmetros óticos para um sistema de cinco interfaces utilizando a aproximação lorentziana na configuração de Kretschmann.....	64
6.4 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e permissividade complexa do filme metálico.....	69
6.5 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e constante dielétrica da camada dendrítica e protéica.....	72
6.6 – Aplicações da espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície.....	73
6.6.1 – Caracterização de propriedades óticas e estruturais de filmes finos.....	73
6.6.2 – Análise em tempo real de reações imunológicas.....	74
6.7 – Considerações parciais.....	75
6.8 – Referências bibliográficas.....	76

## **CAPÍTULO 7 – OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO.....78**

7.1 – Introdução.....	78
7.2 – Objetivos.....	79



<b>CAPÍTULO 8 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
8.1 – Síntese do poliglicerol arborescente (PGLD).....	81
8.2 – Caracterização físico-química do dendrímero obtido.....	82
8.3– Síntese e caracterização do eletrodo.....	83
8.3.1 – Filmes finos de ouro evaporados sobre um substrato de vidro.....	83
8.3.2 – Deposição do dendrímero PGLD sobre o filme fino de ouro.....	84
8.3.3 – Estudo da adsorção da proteína BSA pelo PGLD.....	85
8.3.4 – Filmes de HFb adsorvidos sobre o filme de PGLD.....	85
8.3.5 – Ensaio de adesão plaquetária do dendrímero PGLD.....	86
8.3.6 – Formação de trombos na superfície do dendrímero PGLD.....	87
8.4 – Montagem do aparato experimental RPS: sistema de medida e aquisição de dados.....	88
8.5 – Determinação experimental do índice de refração do prisma.....	90
8.6 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes ultrafinos.....	91
8.6.1 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes finos metálicos.....	92
8.7 – Considerações parciais.....	95
8.8 – Referências bibliográficas.....	96
<b>CAPÍTULO 9 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
9.1 – Análise físico-química do poliglicerol dendrítico.....	97
9.1.1 – Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	99
9.1.2 – Caracterização espectroscópica (FTIR, <sup>13</sup> C-RMN, <sup>1</sup> H-RMN).....	104
9.1.3 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e comportamento reológico.....	108
9.2 – Influência dos parâmetros óticos de filmes de ouro depositados sobre substratos de vidro.....	110
9.3 – Caracterização do filme metálico por RPS.....	113
9.4 – Influência da polarização sobre o fenômeno RPS.....	114
9.5 – Estudo do comportamento da adsorção das proteínas séricas sobre o PGLD (isotermas de Langmuir e Freundlich).....	115
9.5.1 – Adsorção do dendrímero PGLD sobre a superfície do filme de ouro.....	115

9.5.2 – Adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PGLD.....	117
9.5.3 – Adsorção de HFb sobre a superfície do dendrímero PGLD.....	123
9.5.4 – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb.....	127
9.6 – Ensaio de adesão plaquetária.....	129
9.7 – Referências bibliográficas.....	133
<b>CAPÍTULO 10 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>CAPÍTULO 11 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>137</b>
<b>APÊNDICE A – CÁLCULO DA RELAÇÃO DE DISPERSÃO DOS PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE.....</b>	<b>139</b>
<b>APÊNDICE B – MÉTODO DAS CORREÇÕES DIFERENCIAIS.....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICE C – CÁLCULO DA REFLECTÂNCIA PARA UMA ESTRUTURA DE N-CAMADAS NA CONFIGURAÇÃO DE KRETSCHMANN.....</b>	<b>146</b>

## Lista de Figuras

---

Figura 1.1: Figura representativa de uma prótese endovascular, ou stents, aplicada sobre uma lesão na artéria coronariana.....	4
Figura 1.2: Figura ilustrativa de um marcapasso implantado.....	5
Figura 1.3: Cateter de longa permanência semi-implantável.....	6
Figura 1.4: Cateter de longa permanência totalmente implantável.....	7
Figura 1.5: (a) Cateter de longa permanência semi-implantável e (b) cateter de longa permanência totalmente implantável.....	7
Figura 1.6: (a) Fotografia de dois oxigenadores de membrana com tamanhos diferentes. (b) Fotografia de oxigenadores de bolha com três tamanhos diferentes. Todos esses oxigenadores são da marca Bentley.....	8
Figura 1.7: (a) Esquema representativo do circuito de hemodiálise. O sangue é retirado do paciente por um acesso venoso e impulsionado por uma bomba até o filtro sendo, então, devolvido ao paciente. (b) Fotografia de uma máquina de diálise.....	10
Figura 1.8: (a) Desenho esquemático do posicionamento anatômico de um CAA. (b) Componentes eletromecânicos do CAA.....	11
Figura 2.1: Componentes celulares do sangue.....	18
Figura 2.2: Representação em fitas da proteína sérica albumina.....	19
Figura 2.3: Representação tridimensional da imunoglobulina G. As duas cadeias de polipeptídeos com baixo peso molecular e alto peso molecular estão ilustradas em verde água e azul, respectivamente.....	19
Figura 2.4: Diagrama representativo da molécula de fibrinogênio. Ele é composto por duas subunidades idênticas cada uma composta por três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ , $\beta B$ e $\gamma$ ) as quais são interligadas por ligações de dissulfeto. A ação da trombina cliva a molécula de fibrinogênio em quatro pequenos peptídeos sendo dois fibrinopeptídeos A (FPA) e dois fibrinopeptídeos B (FPB).....	20
Figura 2.5: Diagrama representativo da cascata de coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias: extrínseca e intrínseca.....	22
Figura 3.1: Características de rugosidades em superfícies. (a) Rugosidade física. (b) Rugosidade química.....	27
Figura 3.2: Diagrama esquemático da formação de uma dupla camada metálica.....	29
Figura 3.3: Definição do ângulo de contato, $\Phi$ , entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal e as condições de molhabilidade desta superfície. Em (a) tem-se uma superfície super-hidrofílica ( $\Phi=0^\circ$ ), em (b) tem-se uma superfície	

com molhabilidade parcial ( $180^\circ > \Phi > 0^\circ$ ) e em (c) tem-se uma superfície super-hidrofóbica ( $\Phi=180^\circ$ ).....	31
Figura 3.4: Ilustração das forças intermoleculares de van der Waals. Em (a) temos a interação dipolo-dipolo, em (b) a interação dipolo permanente-dipolo induzido e em (c) a interação dipolo induzido-dipolo induzido.....	33
Figura 4.1: Número de artigos publicados sobre dendrímeros nos anos de 1992 a 2005.....	41
Figura 4.2: (a) Estruturas poliméricas clássicas. (b) Estruturas dendríticas.....	42
Figura 4.3: Figura representativa do crescimento em gerações no dendrímero poli(amido amina) (PAMAM).....	43
Figura 4.4: Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros.....	46
Figura 4.5: Representação esquemática de uma síntese dendrímica convergente.....	46
Figura 4.6: Estrutura do poliglicerol dendrítico de geração 4 (PGLD G4).....	48
Figura 5.1: Diagrama representativo do espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier.....	52
Figura 5.2: (a) Amostra de um interferograma e, em (b), o seu respectivo espectrograma.....	53
Figura 5.3: (a) Equipamento de RMN Bruker 300 MHz e (b) Bruker 500 MHz, ambos do ICTP/CSIC. Nota-se em (b) a introdução da amostra no equipamento de RMN.....	55
Figura 5.4: Em (a) tem-se a fotografia do computador utilizado para a aquisição de dados e, em (b), o equipamento de RPS montado no laboratório de Biomateriais da UNIFEL.....	56
Figura 6.1: Comportamento da reflectância em função do ângulo de incidência para uma interface prisma-ar. O ângulo crítico para o qual acontece o fenômeno RIT está representado na figura pela linha tracejada.....	58
Figura 6.2: Configuração de Kretschmann para excitação de PS.....	62
Figura 6.3: Configuração de Otto para excitação de PS.....	62
Figura 6.4: (a) Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma-metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que $k_{PS} = k_x$ . (b) Espectro RPS característico para uma interface prisma-metal e metal-ar.....	64
Figura 6.5: Diagrama representativo da estrutura de seis camadas para a estimativa dos parâmetros óticos de filmes ultrafinos utilizando a configuração de Kretschmann.....	65
Figura 6.6: (a) Curva de ressonância representada no espaço $k_x$ , (b) dependência angular da reflectância.....	68
Figura 8.1: (a) Foto digital da Evaporadora Balzer PLS500 do IPEN. (b) Lâminas de vidro com ouro evaporado em sua superfície.....	84
Figura 8.2: Diagrama representativo do procedimento experimental para a adsorção do dendrímero PGLD sobre substratos de ouro e, a adsorção de proteínas sobre a superfície dendrítica.....	85
Figura 8.3: Diagrama representativo do eletrodo para as análises por RPS.....	86

Figura 8.4: Diagrama representativo do sistema ótico utilizado no laboratório de Biomateriais na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) para análise de hemocompatibilidade de materiais poliméricos.....	88
Figura 8.5: Prisma reto ajustado para (a) o ângulo externo nulo e (b) um ângulo externo de $\theta_e$ graus.....	90
Figura 8.6: Fluxograma do procedimento de cálculo para obtenção da espessura e constantes óticas de filmes ultrafinos.....	92
Figura 8.7: Espectro RPS para um sistema de três interfaces obtidos através de simulação computacional.....	93
Figura 8.8: Espectro RPS para um sistema de três interfaces. A curva pontilhada em vermelho representa os dados de entrada e a curva em preto o cálculo teórico obtido através do modelo matemático e pelo método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram: $d=50,00nm$ , $\epsilon_{Au} = -10,99+1,50i$ , com o coeficiente de correlação igual a $R=1,00$ .....	95
Figura 9.1: Percentual de conversão da glicerina em poliglicerol oligomérico em função do tempo e sua influência no peso molecular.....	97
Figura 9.2: (a) Mecanismo de desprotonação, (b) propagação (c) e ciclização do glicidol.....	98
Figura 9.3: Cinética de polimerização do PGL para obtenção do PGLD.....	99
Figura 9.4: (a) Curva de calibração e (b) análise por GPC do PGLD obtido após 02 horas de processo.....	100
Figura 9.5: Estrutura esquemática do poliglicerol com estrutura dendrítica. $L_{14}$ , $L_{13}$ , D e T significam ligações lineares, estruturas dendríticas e grupos terminais, respectivamente.....	104
Figura 9.6: Espectro FTIR da glicerina (GL) e do PGLD sintetizado neste trabalho.....	105
Figura 9.7: Espectro RMN de carbono ( $^{13}C$ ) do PGLD sintetizado neste trabalho.....	106
Figura 9.8: Espectro RMN de próton ( $^1H$ ) do PGLD sintetizado neste trabalho.....	107
Figura 9.9: Curva DSC para o PGLD sintetizado neste trabalho.....	109
Figura 9.10: Comportamento reológico do PGLD.....	110
Figura 9.11: Simulação computacional da influência da espessura do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).....	111
Figura 9.12: Simulação computacional da influência da parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).....	112
Figura 9.13: Espectro RPS para um sistema de três interfaces. A curva pontilhada em vermelho representa o espectro RPS obtido experimentalmente e a curva em preto o ajuste de curva obtido através do método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram: $\epsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412)+1,32i(\pm 0,214)$ e $d = 77,8(\pm 1,21)nm$ , com um coeficiente de correlação igual a $R = 0,99355$ .....	114

- Figura 9.14: Espectros RPS obtidos experimentalmente. A curva em vermelho representa o espectro para a fonte de laser p-polarizada e a curva em preto para o feixe s-polarizado.....115
- Figura 9.15: Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro e a curva em vermelho representa o espectro RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e as curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.....116
- Figura 9.16: (a) Distribuição de cargas no dendrímero PGLD em solução PBS, pH 7,4, (b) superfície de ouro e, em (c) o dendrímero interagindo eletrostaticamente com a superfície do ouro. A cor vermelha representa a distribuição de cargas positivas e as azuis a distribuição de cargas negativas.....116
- Figura 9.17: Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína BSA sobre o filme de PGLD. As curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.....118
- Figura 9.18: Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do PGLD em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....118
- Figura 9.19: Curva de calibração da massa de BSA adsorvida na superfície do PGLD em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....120
- Figura 9.20: Isoterma de Langmuir para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....120
- Figura 9.21: Isoterma de Freundlich para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....121
- Figura 9.22: Modelo de interação entre a proteína sérica BSA e o dendrímero PGLD. Os círculos em cinza representam o dendrímero PGLD com os seus respectivos grupos hidroxilas terminais protonados (pH = 7,0) e os três círculos em branco representam os três domínios da proteína BSA.....122

- Figura 9.23: Diagrama representativo do empacotamento da proteína sérica BSA sobre a superfície do dendrímero PGLD. O retângulo em amarelo representa o substrato de ouro e as elipses de cor cinza e branca representam, respectivamente, a molécula do dendrímero PGLD e os domínios I, II e III que constituem a molécula da BSA.....123
- Figura 9.24: Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. A curva em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína HFb sobre o filme dendrítico. As curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.....124
- Figura 9.25: Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PGLD) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....124
- Figura 9.26: Curva de calibração da massa de HFb adsorvida na superfície do filme dendrítico de PGLD em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....125
- Figura 9.27: Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....126
- Figura 9.28: Isoterma de Freundlich para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....126
- Figura 9.29: Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PGLD. A curva em preto representa a cinética de adsorção da BSA e a curva em vermelho a adsorção do HFb. As curvas em vermelho e preto são curvas de tendência e não ajustes numéricos. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....128
- Figura 9.30: Micrografia do microscópio eletrônico de varredura dos substratos de vidro (a) e (b), e do vidro revestido com o dendrímero PGLD (c) e (d) após exposição ao plasma rico em plaquetas.....131
- Figura 9.31: Mapas de cores representativos de agregados plaquetários. Nas Figuras 9.30(a) e (c) foram realizadas um processamento de imagem utilizando um código original do software MATLAB 7.0 que permite uma melhor

visualização das micrografias. As Figuras 9.31 (a) e (b) correspondem às micrografias da Figura 9.30 (a) e (c), respectivamente. As barras de cores indicam a intensidade de agregados plaquetários.....	132
Figura 9.32: Cinética da formação de trombos na superfície do substrato de vidro e após o revestimento com o dendrímero PGLD. As barras indicam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.....	132
Figure A.1: Figura representativa das componentes do campo eletromagnético na interface entre um metal e um meio dielétrico transparente. $ E_{PS} $ é o módulo do campo eletromagnético gerado pelos plásmons de superfície.....	139
Figura A.2: Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma-metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que $k_{PS} = k_x$ .....	141
Figura C.1: Estrutura utilizada no cálculo do coeficiente de reflexão.....	147



## Lista de Tabelas

---

Tabela 01: Alguns tipos de biomateriais e suas aplicações na área cardiovascular.....	17
Tabela 02: Concentração das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo humano.....	18
Tabela 03: Análise do espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN para o PGLD sintetizado neste trabalho.....	107
Tabela 04: Parâmetros experimentais.....	117
Tabela 05: Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD através do ajuste de curva linear com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 280k.....	121
Tabela 06: Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.....	127

## Lista de Abreviaturas

---

- $^{13}\text{C}$ -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
 $^1\text{H}$ -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Próton  
ACD – Citrato-dextrose  
AT – Antitrombina  
BSA – Albumina do Soro Bovino  
CAA – Coração Artificial Auxiliar  
CSI – Cateter Semi-implantável  
CSTR – Reator Tipo Tanque Agitado  
CTI – Cateter Totalmente Implantável  
D – Estrutura Dendrítica  
DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde  
 $^d$ DMSO – Dimetilsulfóxido Deuterado  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial  
FPA – Fibrinopeptídeos A  
FPB – Fibrinopeptídeos B  
FT – Fator Tecidual  
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier  
G0 – Geração 0  
G4 – Geração 4  
G5 – Geração 5  
GL – Glicerina ou Glicidol  
GPC – Cromatografia de Permeação em Gel  
 $G_R$  – Grau de Ramificação  
He-Ne – Hélio-Neônio  
HFb – Fibrinogênio do Soro Humano  
HMWK – Cininogênio de Alto Peso Molecular  
HSA – Albumina do Soro Humano  
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio  
ICTP/CSIC – Instituto de Ciências e Tecnologia de polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica”  
ICP – Intervenção Coronariana Percutânea  
Ig – Imunoglobulina  
IP – Índice de Polidispersão  
IPEN – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares  
 $L_{14}$ ,  $L_{13}$  – Ligações Lineares

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
MT – Modo Magnético Transversal  
OHS – Oscilador Harmônico Simples  
OPS – Ondas de Plásmons de Superfície  
PA – Poliamida  
PAMAM – Poli(amido amina)  
PBS – Solução Tampão Fosfato  
PDMS – Polidimetilsiloxisano  
PE – Polietileno  
PEG – Poli(etileno glicol)  
PET – Politereftalato de Etileno  
PGL – Poliglicerol Oligomérico  
PGLD – Poliglicerol Dendrítico  
PGLD G4 – Poliglicerol Dendrítico de Geração 4  
PK – Pré-caliceína  
PP – Polipropileno  
PRP – Plasma Rico em Plaquetas  
PS – Plásmons de Superfície  
PSU – Polissulfona  
PTFE – Politetrafluoretileno  
PU – Poliuretano  
PVC – Policloreto de Vinila  
RIT – Reflexão Interna Total  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RPS – Ressonância de Plásmons de Superfície  
SI – Semi-implantável  
T – Grupos Terminais  
TFPI – Inibidor do Fator Tecidual  
 $T_g$  – Temperatura de Transição Vítrea  
TI – Totalmente Implantável  
UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá  
USP – Universidade de São Paulo

## Resumo

---

O alvo desse estudo foi avaliar o comportamento hemocompatível do dendrímero de poliglicerol (PGLD) através da técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície (RPS). O dendrímero de PGLD foi sintetizado pela abertura do anel do glicidol desprotonado usando o poliglicerol como um núcleo funcional em um processo de crescimento em etapas denominado de síntese divergente. A estrutura dendrítica do PGLD foi confirmada pelas técnicas de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons ( $^1\text{H}$ -RMN) e de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). O dendrímero sintetizado apresentou baixa dispersão no peso molecular ( $M_w/M_n = 1,05$ ) e um grau de ramificação igual a 0,80 o qual caracterizou a estrutura dendrítica do polímero. A temperatura de transição vítrea do dendrímero ( $T_g$ ) de  $-20,2^\circ\text{C}$  indicou que a macromolécula possui, em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), as características mecânicas apropriadas para sua utilização no revestimento tecnológico de próteses cardiovascular. A compatibilidade do dendrímero PGLD com o sangue foi avaliada por análises *in vitro* utilizando a técnica de Espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e cinética de formação de trombos. A adsorção das proteínas albumina do soro bovino (BSA) e fibrinogênio do soro humano (HFb) sobre a superfície do dendrímero PGLD revelaram um processo de adsorção espontânea e a formação de multicamadas heterogêneas obedecendo o modelo de adsorção da isoterma de Freundlich. Os valores obtidos para a energia livre de Gibbs de adsorção das proteínas sobre o dendrímero indicam uma melhor interação do PGLD com a albumina do que com o fibrinogênio. Os ensaios de adesão de plaquetas e a cinética de formação de trombos indicaram a característica hemocompatível do dendrímero de PGLD. Baseados em nossos estudos, possíveis aplicações de estruturas de PGLD arborescentes na área cardiovascular nos próximos anos poderão ser delineadas. A Espectroscopia RPS se revelou uma ferramenta promissora para a investigação das propriedades hemocompatíveis de sistemas nanoscópicos.

## Abstract

---

The aim of this study was to evaluate the haemocompatible behaviour of the polyglycerol dendrimer (PGLD) through the Surface Plasmon Resonance technique (SPR). The PGLD dendrimer was synthesized by the ring opening polymerization of deprotonated glycidol using polyglycerol as core functionality in a step-growth processes denominated divergent synthesis. The PGLD dendritic structure was confirmed by Gel Permeation Chromatography (GPC), Proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) and Carbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) Nuclear Magnetic Resonance, Differential Scanning Calorimetric (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques. The synthesized dendrimer presented low dispersion in molecular weights ( $M_w/M_n = 1.05$ ) and a degree of branching of 0.80 which characterized the polymer dendritic structure. The dendrimer glass transition temperature ( $T_g$ ) of  $-20,2^\circ\text{C}$  (DSC) indicated that the macromolecule possesses, at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ), appropriate mechanical properties which can be used in the coating technology of cardiovascular prosthesis. The blood compatibility of the PGLD was evaluated by *in vitro* assays using Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, Electronic Scanning Microscopy (MEV) and kinetics of thrombus formation. The adsorption of bovine serum albumin (BSA) and human serum fibrinogen (HFb) proteins onto PGLD dendrimer surface revealed a process of spontaneous adsorption and the formation of heterogeneous multilayers obeying the model of adsorption of the Freundlich isotherm. The values obtained for the Gibbs free energy of proteins adsorption onto dendrimer indicate a better interaction of the PGLD with the albumin than fibrinogen. The assays of platelet adhesion and the kinetic of thrombus formation indicate the haemocompatible characteristic of PGLD dendrimer. Based in our studies, possible applications of arborescent PGLD structure in the cardiovascular area in the next years could be delineated. RPS Spectroscopy revealed a promising tool for study of haemocompatible properties of nanoscopies systems.

## Capítulo 1 – Aplicações de Polímeros na Medicina: Área Cardiovascular

---

### 1.1 – Introdução

A pesquisa relacionada ao desenvolvimento de materiais poliméricos usados em implantes e dispositivos biomédicos vem crescendo acentuadamente nas últimas três décadas. Porém, embora esses dispositivos sejam amplamente empregados, existe sempre a necessidade de melhorar o seu desempenho.

De um modo geral, os biomateriais se caracterizam pela sua biocompatibilidade. Ou seja, eles não devem causar nenhum efeito nocivo ao organismo; devem desenvolver uma resposta tecidual adequada ao sistema hospedeiro e, também, devem possuir uma resistência mecânica e uma estabilidade química adequada, pois o meio fisiológico no qual estarão contidos é sempre extremamente agressivo podendo, assim, induzir algum tipo de degradação.

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

Os materiais que entram em contato com o fluido fisiológico sanguíneo e não são rejeitados pelo organismo, são conhecidos como materiais hemocompatíveis. Ou seja, um material hemocompatível é aquele que apresenta uma boa afinidade com o plasma sanguíneo [3].

Apesar dos mecanismos básicos de biocompatibilidade ainda não serem completamente entendidos, a biocompatibilidade de materiais poliméricos é extremamente importante em seus possíveis usos terapêuticos [4]. Estes biomateriais podem ser utilizados, por exemplo, como revestimento de dispositivos médicos a fim de aumentar a sua biocompatibilidade, como acontece nos corações artificiais, cateteres, próteses cardiovasculares, rins artificiais ou, então, para o encapsulamento de células como hormônios, antígenos ou algum outro tipo de droga. Por isso, a biocompatibilidade de materiais médicos representa uma resposta complexa que depende não apenas do material, mas também do ambiente no qual ele se encontra.

A compatibilidade do material com o sangue é determinada pela interação na interface material-sangue. Este processo envolve uma série de eventos incluindo adsorção de proteínas, a adesão e ativação de plaquetas e a estimulação da coagulação do plasma [4-6]. A adsorção de proteínas do plasma, como a albumina e o fibrinogênio, sobre os polímeros biomédicos é um fator importante para se determinar a biocompatibilidade de biomateriais. Afinal, a composição da camada protéica adsorvida sobre o polímero é importante para a adesão das plaquetas do sangue e, a ativação destas plaquetas aderidas serve como um fator condicionante para se determinar o grau de trombogenicidade do material polimérico.

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

Como a coagulação do sangue não é induzida em interfaces com polímeros antitrombogênicos, já que estes previnem a formação do coágulo por uso de mecanismos que controlam a chamada cascata de coagulação, os materiais compatíveis com o sangue devem ser primariamente não trombogênicos.

Do ponto de vista molecular, a biocompatibilidade dos materiais poliméricos e o grau de aceitabilidade do polímero estranho pelo organismo são determinados pela natureza dos grupos funcionais ao longo da cadeia e pelas possibilidades de interações com as moléculas do próprio organismo [7]. Os organismos são compostos em grande parte de biopolímeros como proteínas, polissacarídeos (açúcares) e polinucleotídeos (RNA, DNA).

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

No entanto, as macromoléculas dendríticas, que é uma nova classe de materiais poliméricos sintetizadas por Vögtle em 1978, surgem como uma alternativa na otimização de próteses cardiovasculares e dispositivos biomédicos devido a sua extraordinária capacidade mimetizante das proteínas globulares, como a albumina e o fibrinogênio. Suas propriedades bioquímicas como a imunogenicidade e o biomimetismo, aliadas à elevada funcionalidade superficial e microestrutura composta essencialmente de nanocavidades homogeneamente distribuídas pela macromolécula, fazem dos dendrímeros o centro da atenção na química macromolecular contemporânea [8]. Devido a estas características, os dendrímeros também são conhecidos como proteínas sintéticas.

## **1.2 – Stents, marcapassos e cateteres de uso prolongado**

O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo justamente porque uma grande parte dos pacientes não recebe o tratamento adequado, apesar dos avanços terapêuticos das últimas décadas [9-11]. Além disso, o diagnóstico do IAM, baseado em eletrocardiogramas e critérios clínicos, pode ser difícil de ser realizado no momento em que o paciente é admitido na sala de emergência. Apenas 41% a 56% dos pacientes com IAM que chegam à sala de emergência apresentam alterações que dão condições de se estabelecer o diagnóstico de imediato enquanto que os demais pacientes apresentam alterações não diagnosticadas [12].

Em 2003, do número total de óbitos no Brasil, cerca de 50% foram devido a cardiopatias. E, entre os sobreviventes do IAM, muitos acabam desenvolvendo como seqüela uma insuficiência cardíaca, o que gera uma piora na qualidade de vida destes pacientes e um enorme consumo de recursos do sistema de saúde [13].

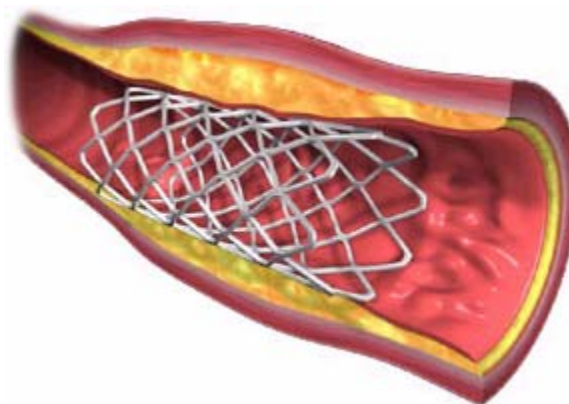
A insuficiência cardíaca é um mal epidêmico que afeta de 2 a 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e cerca de 15 milhões de pessoas ao redor do planeta. No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a insuficiência cardíaca gera mais de 400.000 internações por ano, sendo a quarta maior causa de internação hospitalar.

A eficácia e a segurança da intervenção coronariana percutânea (ICP), muito utilizada na revascularização miocárdica de pacientes portadores de algum tipo de doença arterial



coronariana, são limitadas devido à possibilidade de oclusão aguda não controlada do vaso em tratamento e a recorrência tardia da obstrução, denominada de reestenose coronariana [13,14].

O uso de próteses endovasculares, mais conhecidas como stents, nas ICP revolucionou os resultados até então obtidos com angioplastia por balão ao reduzir as complicações relacionadas ao procedimento e a reestenose das lesões abordadas. Os stents coronarianos são estruturas metálicas tubulares aplicadas sobre lesões que obstruem as artérias coronarianas por meio de técnicas de cateterismo cardíaco (Figura 1.1). Foram utilizados, pela primeira vez, em 1986 e sua aprovação nos Estados Unidos ocorreu em 1994 [15]. Ao longo da última década, vários aperfeiçoamentos técnicos nestes stents coronarianos melhoraram a sua aplicabilidade e manuseio no procedimento, com destaque para os stents recobertos com heparina e os stents com liberação controlada de fármacos. O foco no desenvolvimento dos fármacos visa interromper ou minimizar os processos biológicos que causam a reestenose.



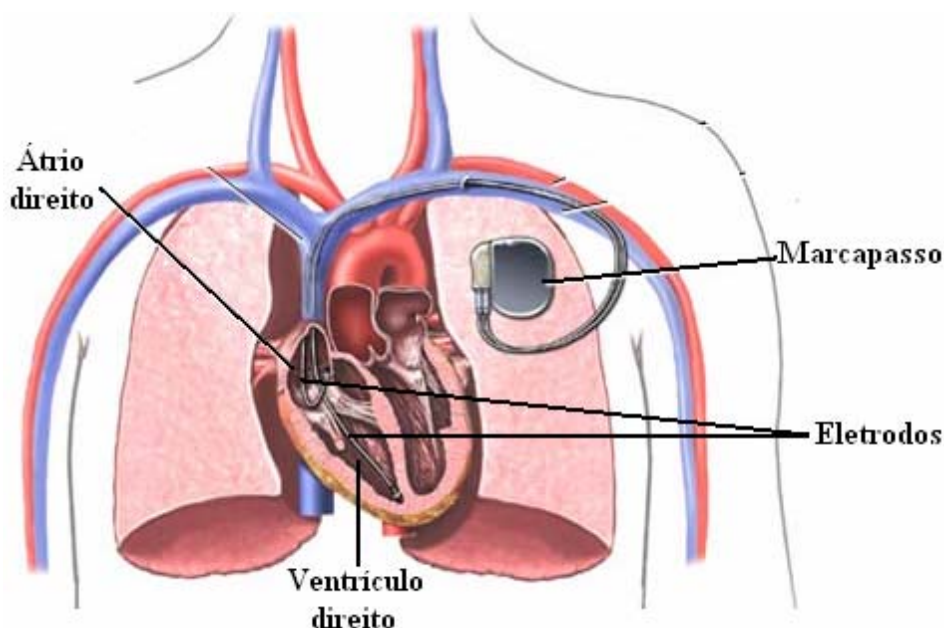
**Figura 1.1** – Figura representativa de uma prótese endovascular, ou stents, aplicada sobre uma lesão na artéria coronariana. Fonte: referência [16].

Dentre os outros tipos de recursos do sistema de saúde utilizados em pacientes com insuficiência cardíaca, encontram-se os marcapassos e os cateteres de uso prolongado.

O coração trabalha diariamente bombeando o sangue para que ele chegue a todas as partes do corpo através dos batimentos cardíacos. Cada batimento normal bombeia uma quantidade de sangue que varia de pessoa para pessoa. Por isso, cada um tem um número de batimentos diferente, que varia conforme as suas necessidades. Contudo, em determinadas situações, o coração pode perder a capacidade de gerar um número adequado de batimentos cardíacos, transformando-se em um coração lento por curtos períodos de tempo ou constantemente. Estas

situações podem provocar tonturas, cansaço, palpitações, desmaios ou, às vezes, nada provocar. Nestes casos, cabe ao médico avaliar os sintomas e indicar a necessidade do implante de marcapasso.

O marcapasso artificial é um aparelho que substitui o marcapasso natural permitindo, assim, que o coração volte a contar com um número de batimentos eficientes proporcionando o desaparecimento dos sintomas [17]. A Figura 1.2 mostra um marcapasso artificial implantado no corpo humano.



**Figura 1.2** – Figura ilustrativa de um marcapasso implantado. Fonte: referência [18].

De um modo geral, o marcapasso é um aparelho eletrônico composto de duas partes:

1. Um gerador que produz estímulos elétricos. Ele pode ficar localizado embaixo da pele, geralmente no peito, próximo ao ombro ou, menos frequentemente, na barriga ou abaixo da mama.
2. Um eletrodo que leva os estímulos elétricos ao coração para garantir os batimentos cardíacos. Este fio, que sai do gerador, pode chegar ao coração através de uma artéria e ser fixado na sua parede interna (endocárdico) ou pode ser levado por debaixo da pele e ser fixado no lado externo do coração (epicárdico). Para o marcapasso atrial, esta fixação ocorre na cavidade superior (ou átrio direito). Já para o marcapasso ventricular, a fixação

ocorre na cavidade inferior (ou ventrículo). E, no caso do marcapasso átrio-ventricular, a fixação ocorre em ambos os lugares.

Alguns tipos de marcapassos utilizam um único eletrodo e produzem sempre o mesmo número de batimentos cardíacos com uma frequência fixa. Já outros tipos empregam dois ou mais eletrodos de tal forma a proporcionar uma variação dos batimentos cardíacos conforme as necessidades do paciente.

Já o cateter de longa permanência é uma estrutura tubular, de diâmetro variado, confeccionado em silicone, e que tem por objetivo permitir e manter um acesso profundo no sistema vascular (venoso ou arterial) por longo período de tempo, recebendo periodicamente manuseios para aspiração sanguínea e administração de medicamentos [19]. Esses cateteres têm sido indicados em pacientes oncológicos, com distúrbios hidroeletrólíticos, desnutrição, insuficiência renal e síndrome de imunodeficiência adquirida [20]. Esses dispositivos se apresentam em dois tipos principais, os cateteres semi-implantáveis (CSI) e os totalmente implantáveis (CTI). A diferença entre eles está no ponto onde é realizada a manipulação.

Os cateteres do tipo SI são sistemas com três segmentos, um intravascular, um subcutâneo e um externo. A Figura 1.3 apresenta um cateter de longa permanência semi-implantável.



**Figura 1.3** – Cateter de longa permanência semi-implantável. Fonte: referência [20].

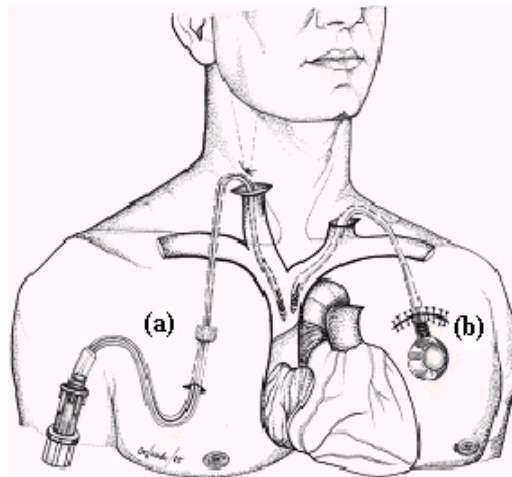
Os cateteres do tipo TI são sistemas que ficam totalmente embutidos no organismo humano e apresentam dois segmentos: um intravascular e o outro subcutâneo. A porção

subcutânea termina num reservatório fechado, sem comunicação com o meio externo e, para ser acessado, necessita de punção dérmica com agulhas próprias. A Figura 1.4 mostra um cateter de longa permanência totalmente implantável.



**Figura 1.4** – Cateter de longa permanência totalmente implantável. Fonte: referência [20].

A Figura 1.5 ilustra os dois tipos de cateteres de longa duração implantados no corpo humano.



**Figura 1.5** – (a) Cateter de longa permanência semi-implantável e (b) cateter de longa permanência totalmente implantável. Fonte: referência [19].

### 1.3 – Oxigenadores e máquinas de diálise

Os oxigenadores foram construídos com o intuito de auxiliar cirurgias cardíacas que necessitam utilizar o procedimento de circulação extracorpórea. Portanto, esses aparelhos devem

ser capazes de substituir as funções cardiopulmonares, ou seja, introduzir o oxigênio no sangue e eliminar o dióxido de carbono, produto final do metabolismo do organismo, para que haja a manutenção artificial da vida em um indivíduo [21]. Contudo, esses aparelhos não são tão eficazes, pois eles não conseguem desempenhar algumas funções que os pulmões exercem como, por exemplo, a neutralização de diversas substâncias e a participação em alguns mecanismos da imunidade [22].

Vários tipos de oxigenadores foram projetados e construídos para o uso clínico. A diferença entre eles está fundamentalmente na forma como o oxigênio é oferecido ao sangue para combinação com a hemoglobina. Devido a esse fator, eles podem ser classificados em:

1. Os oxigenadores em que ocorre o contato direto entre o gás e o sangue como no caso dos oxigenadores de película e os oxigenadores de bolha.
2. Os oxigenadores onde não há uma interface direta com o gás, pois há uma membrana que separa o sangue do gás utilizado para as trocas gasosas. Por isso, eles são conhecidos como os oxigenadores de membrana.

Apesar do oxigenador de bolha ter sido muito utilizado até pouco tempo atrás, atualmente apenas os oxigenadores de membrana são utilizados no procedimento de circulação extracorpórea. A Figura 1.6 apresenta uma fotografia de oxigenadores de membrana e de bolha da marca Bentley.



**Figura 1.6.** – (a) Fotografia de dois oxigenadores de membrana com tamanhos diferentes. (b) Fotografia de oxigenadores de bolha com três tamanhos diferentes. Todos esses oxigenadores são da marca Bentley. Fonte: referência [22].

Os principais critérios estabelecidos para se obter um oxigenador ideal são [22]:

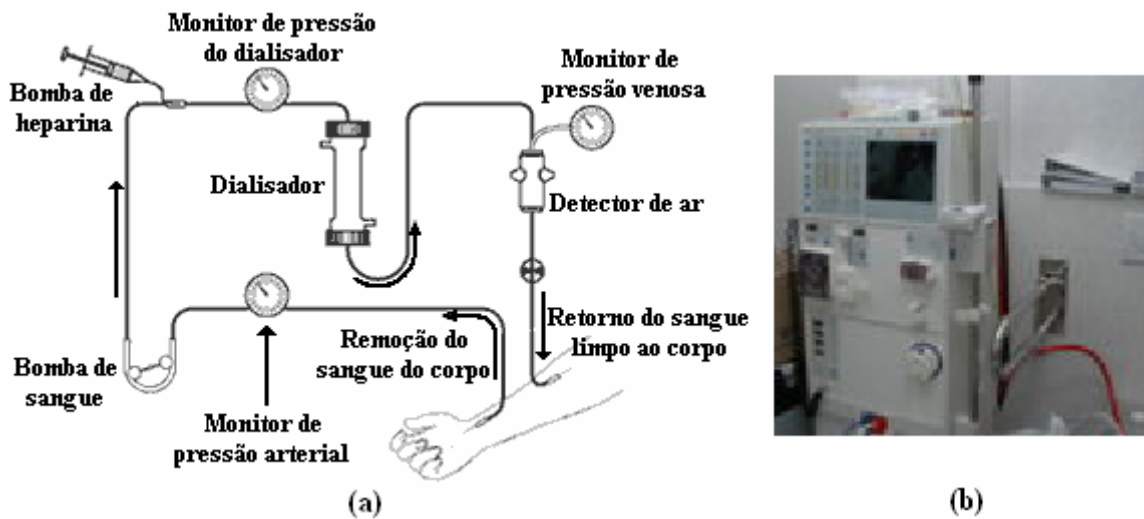
1. Eles devem ser capazes de oxigenar até 5 a 6 litros de sangue venoso por minuto.
2. Eles devem ser capazes de remover o CO<sub>2</sub> em quantidades apropriadas.
3. Eles devem ter uma grande capacidade de trocas gasosas.
4. Os fenômenos mecânicos para as trocas gasosas devem ser suficientemente delicados para evitar a destruição dos elementos figurados do sangue ou a desnaturação das proteínas plasmáticas.
5. Sua construção deve ser simples e segura permitindo, assim, a oxigenação adequada por longos períodos de tempo.
6. Eles devem ter uma tendência mínima ou nula para a formação de microêmbolos.
7. Eles devem ser de fácil manipulação e operação, além de serem o mais completo possível evitando, dessa forma, aparelhos adicionais ou acessórios para aprimorar as suas funções.
8. Eles devem ser construídos com materiais atóxicos, quimicamente inertes e biocompatíveis.

Já aqueles pacientes que são portadores de insuficiência renal crônica ou aguda, não conseguem eliminar algumas substâncias do organismo devido à falência dos mecanismos excretores renais. Por isso, essas pessoas devem passar pelo processo de hemodiálise onde ocorre à filtragem e a depuração de substâncias que, quando em excesso, trazem prejuízo ao corpo como, por exemplo, a uréia, o potássio e a água.

Na hemodiálise, o sangue humano chega a uma máquina de diálise através de um acesso vascular por meio de um cateter venoso central e ele é impulsionado por uma bomba até o filtro de diálise, também conhecido como dialisador. No dialisador, esse sangue passa pelo processo de filtragem onde as substâncias indesejáveis ao organismo são eliminadas. Neste momento, o sangue é exposto à solução de diálise, também chamada de dialisato, através de uma membrana semipermeável, permitindo assim, as trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato. Após ser retirado do paciente e passado através do dialisador, o sangue filtrado é, então, devolvido ao paciente pelo acesso vascular [23,24].

A Figura 1.7(a) apresenta um esquema representativo do procedimento da hemodiálise e, a Figura 1.7(b) mostra uma fotografia de uma máquina de diálise.





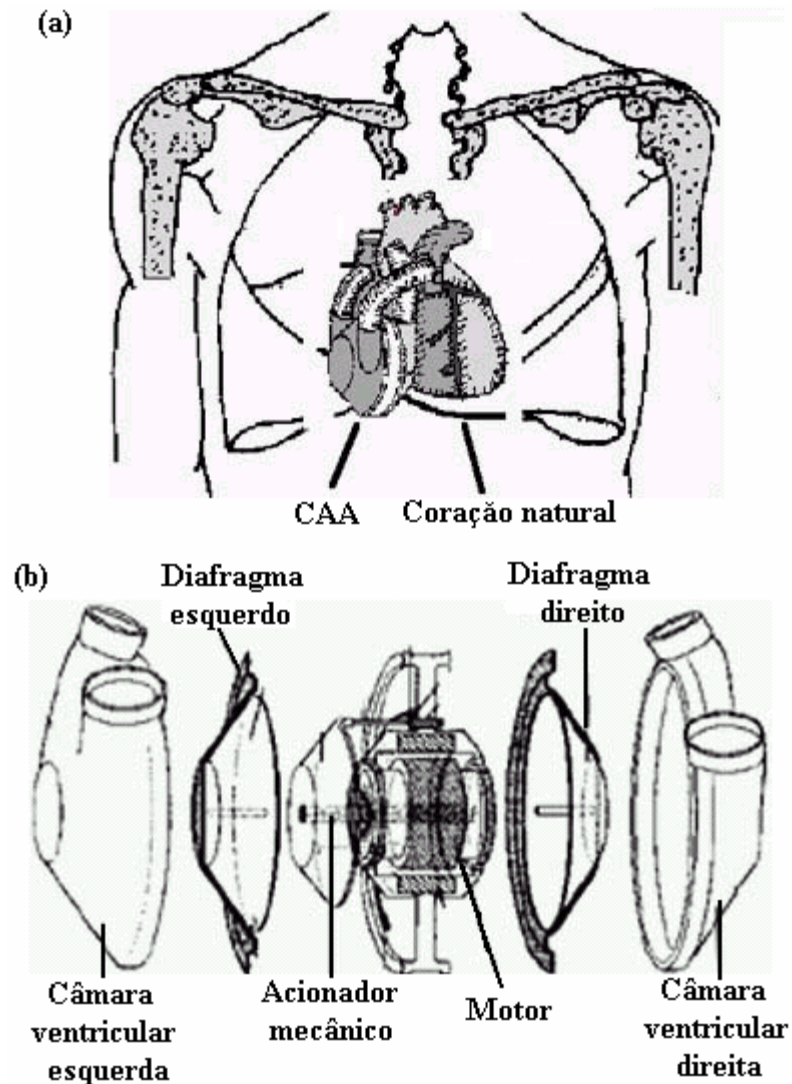
**Figura 1.7** – (a) Esquema representativo do circuito de hemodiálise. O sangue é retirado do paciente por um acesso venoso e impulsionado por uma bomba até o filtro sendo, então, devolvido ao paciente. (b) Fotografia de uma máquina de diálise. Fonte: referência [24].

## 1.4 – O coração artificial

O coração artificial auxiliar (CAA) foi desenvolvido para ser utilizado em pacientes com problemas cardíacos cuja única solução é o transplante de coração. Apesar dele ser implantado dentro do corpo humano, o CAA não substitui o órgão natural.

O coração artificial é um pouco maior que uma bola de tênis e ele é feito de poliuretano. Suas paredes internas são revestidas por colágeno, para que o sangue não entre em contato com o plástico e coagule. Essa peça é alimentada por um motor elétrico, localizado entre dois diafragmas que são feitos de membranas de silicone e que formam os dois ventrículos. Ele é ligado ao coração natural por válvulas biológicas de pericárdio bovino que é uma membrana que envolve a válvula artificial para evitar rejeição. Em geral, o ventrículo artificial direito auxilia seu equivalente natural bombeando o sangue com mais pressão para o pulmão. Já o ventrículo artificial esquerdo envia o sangue com mais força para a aorta, que o distribui pelo corpo. Assim, as limitações provocadas pelo coração doente diminuem e o paciente tem mais tempo para aguardar o transplante. Em casos de parada cardíaca, o coração auxiliar pode assumir por tempo limitado às funções do natural permitindo, assim, que o paciente seja socorrido a tempo [25,26].

A Figura 1.8 mostra um desenho esquemático do posicionamento anatômico do CAA e, também, as suas partes eletromecânicas.



**Figura 1.8** – (a) Desenho esquemático do posicionamento anatômico de um CAA. (b) Componentes eletromecânicos do CAA. Fonte: referência [27].

Atualmente, existem dois tipos de coração artificial, o temporário e o definitivo [26]. O coração artificial temporário é muito utilizado com o objetivo de manter os pacientes nas melhores condições possíveis enquanto eles aguardam a disponibilidade de doadores compatíveis para a realização dos transplantes. Em geral, os dispositivos para o uso temporário são constituídos por câmaras de impulsão pneumática e a fonte geradora de energia é externa. Já o coração artificial definitivo representa um importante progresso no tratamento de pacientes portadores de doenças cardíacas em estágio terminal, pois eles possuem o potencial de substituir permanentemente o coração natural. Eles podem ser implantados no espaço ocupado pelo coração nativo (implante ortotópico) ou, menos frequentemente, num local diferente do ocupado pelo



órgão natural (implante heterotópico). No caso do implante heterotópico, normalmente mantém-se o coração nativo e o CAA ocupa a posição superior da cavidade abdominal.

### **1.5 – Considerações parciais**

Normalmente, as pessoas que já tiveram algum tipo de doença cardiovascular ficam com algum trauma que prejudica a sua qualidade de vida. Por esta razão, houve a necessidade de serem desenvolvidos ao longo de várias décadas dispositivos biomédicos (como os stents, os marcapassos, os cateteres de uso prolongado e o coração artificial) que, além de melhorar a qualidade de vida desses pacientes, proporcionam um tempo de vida maior aos mesmos.

Esses dispositivos biomédicos são revestidos por materiais poliméricos e, a biocompatibilidade deste polímero é uma característica desejável para que estes dispositivos possam entrar em contato com o sangue durante o seu uso clínico. No entanto, embora um avanço significativo tenha sido atingido nas últimas três décadas quanto à produção de superfícies parcialmente hemocompatíveis, não foi possível até o presente momento se obter materiais com as características ideais. Atualmente os materiais poliméricos utilizados em revestimentos de marcapassos ou ainda, utilizados na fabricação de cateteres, oxigenadores entre outros, não são inteiramente compatíveis com o sangue e necessitam de anticoagulantes para minimizar a formação de trombos ocasionando efeitos colaterais graves.

Devido às suas características biomiméticas, as macromoléculas conhecidas como dendrímeros despontam no horizonte do mundo contemporâneo como uma nova alternativa para o desenvolvimento de novos materiais cujas propriedades bioquímicas poderão contribuir significativamente para a obtenção de revestimentos hemocompatíveis.

O próximo capítulo abordará essencialmente o mecanismo de coagulação sanguínea oriundo da interação entre um material sintético e o tecido sanguíneo bem como tal conhecimento vem contribuir para o desenvolvimento de polímeros para aplicações cardiovasculares.

## 1.6 – Referências bibliográficas

- [1] de Queiroz, A.A.A.; Gallardo, A.; Román, J.S. Hemocompatible properties of polymeric derivative of paracetamol. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 7 (6): 523-530, 1995.
- [2] Fernandes, E.G.R.; de Queiroz, A.A.A.; Abraham, G.A.; Román, J.S. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 17: 105-111, 2006.
- [3] Jozefowicz, M; Jozefonvicz, J. Antithrombogenic polymers. *Pure & Applied Chemistry*. 56 (10): 1335-1344, 1984.
- [4] Rihová, B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 21 (2): 157-176, 1996.
- [5] Alves, S.B.; de Queiroz, A.A.A.; Higa, O.Z. Digital image processing for biocompatibility studies of clinical implant materials. *Artificial Organs*. 27 (5): 444-446, 2003.
- [6] Gorbet, M.B.; Sefton, M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 25 (26): 5681-5703, 2004.
- [7] Griffith, L.G. Polymeric Biomaterials. *Acta Materialia*. 48 (1): 263-277, 2000.
- [8] Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (15): 2106-2129, 2005.
- [9] Disponível em  
<[www.clevelandclinicmeded.com/diseasemanagement/cardiology/acute/acute.htm](http://www.clevelandclinicmeded.com/diseasemanagement/cardiology/acute/acute.htm)>.  
Acesso em: 26 julho 2006.
- [10] Disponível em  
<[www.sespa.pa.gov.br/Atualiza%C3%A7%C3%A3o/Agravos/agravos\\_iam.htm](http://www.sespa.pa.gov.br/Atualiza%C3%A7%C3%A3o/Agravos/agravos_iam.htm)>. Acesso em: 26 julho 2006.
- [11] Oliveira, K.C.S. Fatores de risco em pacientes com infarto agudo do miocárdio em um hospital privado de Ribeirão Preto-SP. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto (USP/RP). 2004.

- [12] Cavalcanti, A.B.; Heinisch, R.H.; Albino, E.C.; Zunino, J.N. Diagnóstico do infarto agudo do miocárdio. Valor da dosagem de mioglobina sérica comparada com a creatinofosfoquinase e sua fração MB. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 70 (2): 75-80 1998.
- [13] Disponível em <[http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10\\_biomateriais.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10_biomateriais.pdf)>. Acesso em: 12 janeiro 2007.
- [14] Lima, V.C.; Mattos, L.A.P.; Caramori, P.R.A.; Perin, M.A.; Mangione, J.A.; Machado, B.M.; Coelho, W.M.C.; Bueno, R.R.L. Consenso de especialistas (SBC/SBHCI) sobre o uso de stents farmacológicos. Recomendações da Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hemodinâmica e Cardiologia Intervencionista ao sistema único de saúde. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 87 (4): 162-167 2006.
- [15] Disponível em <<http://www.ptca.org/des.html>>. Acesso em: 12 janeiro 2007.
- [16] Disponível em <<http://www.endovasc.com/images/graphics/>>. Acesso em: 15 janeiro 2007.
- [17] Disponível em <[http://www.incor.usp.br/marcapasso/orientacao\\_mp.html](http://www.incor.usp.br/marcapasso/orientacao_mp.html)>. Acesso em: 12 janeiro 2007.
- [18] Disponível em <<http://health.yahoo.com/topic/heart/treatment/article/healthwise/popup/zm2216>>. Acesso em 28 janeiro 2007.
- [19] Albuquerque, M.P. Cirurgia dos cateteres de longa permanência (CLP) nos centros de transplante de medula óssea. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 38 (2): 125-142 2005.
- [20] Disponível em <<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2039/pgs/materia%2009-39.html>>. Acesso em: 12 janeiro 2007.
- [21] Drummond, M.; Braile, D.M.; Lima-Oliveira, A.P.M.; Camim, A.S.; Oyama, R.S.K.; Sandoval, G.H. Technological evolution of membrane oxygenators. Technological evolution of membrane oxygenators. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 20 (4): 432-437, 2005.
- [22] Disponível em <[http://perflin.com/livro/download/Fdm\\_CEC\\_cap\\_09.pdf](http://perflin.com/livro/download/Fdm_CEC_cap_09.pdf)>. Acesso em: 15 janeiro 2007.
- [23] Disponível em <<http://en.wikipedia.org/wiki/Hemodialysis>>. Acesso em: 14 janeiro 2007.
- [24] Disponível em <<http://enciclopedia.tiosam.com/enciclopedia/enciclopedia.asp?title=Hemodi%C3%A1lise>>. Acesso em: 14 janeiro 2007.

- [25] Disponível em <[http://perflin.com/livro/download/Fdm\\_CEC\\_cap\\_45.pdf](http://perflin.com/livro/download/Fdm_CEC_cap_45.pdf)>. Acesso em: 15 janeiro 2007.
- [26] Disponível em <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3123>>. Acesso em: 15 janeiro 2007.
- [27] Andrade, A.; Ohashi, Y.; Lucchi, J.; Nicolosi, D.; Dinkhuysen, J.J.; Biscegli, J.; Arruda, A.C.F.; Cunha, W.C.; Nosé, Y. Testes *in vitro* e *in vivo* com o Coração Artificial Auxiliar (CAA): um novo modelo de coração artificial totalmente implantável e heterotópico. ***Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular***. 14 (2): 128-134, 1999.

## Capítulo 2 – Polímeros e a Cascata de Coagulação Sangüínea

---

### 2.1 – Polímeros sintéticos

A palavra polímero vem da junção de duas palavras gregas: poli, que significa muito, e mero, que significa partes. Portanto, um polímero é uma macromolécula formada pela repetição de pequenas e simples unidades químicas, chamadas de monômeros, ligadas covalentemente. Se somente uma espécie de monômero está presente na estrutura do polímero, este é chamado de homopolímero. Se espécies diferentes de monômeros são empregadas, o polímero recebe a denominação de copolímero.

Existem dois tipos de polímeros: os naturais (ou biológicos) e os sintéticos. Os polímeros naturais existem desde o surgimento da primeira célula na superfície da terra e, por isso, fundamentam a existência da vida. Ou seja, eles fazem parte da estrutura de todos os seres vivos, seja ele uma planta, uma bactéria ou um animal superior. Alguns dos principais representantes do grupo de biopolímeros são as fibras, a borracha, as proteínas, os polissacarídeos (açúcares), os ácidos nucléicos e a celulose. Já os polímeros sintéticos surgiram somente no século XIX.

Quando um ser humano sofre algum tipo de acidente ou desenvolve alguma doença que danifica a estrutura biológica de um órgão ou tecido, uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais desse paciente é repor o seu órgão ou tecido danificado com um implante, temporário ou permanente, confeccionado a partir de um biomaterial [1,3].

Um biomaterial deve englobar conceitos como biocompatibilidade e biofuncionalidade, além disso, ele não deve produzir qualquer resposta biológica adversa ao organismo humano, ou seja, ele deve ser atóxico, não-carcinogênico, não-mutagênico e antitrombogênico [2-4].

Um material biocompatível é aquele que, quando usado em aplicações específicas, desenvolve uma resposta tecidual adequada. Já a biofuncionalidade, ou bioatividade, é a capacidade que um material tem de desempenhar uma função desejada dadas as suas propriedades mecânicas, elétricas, óticas e químicas.

Atualmente, os polímeros sintéticos são aplicados em diversos campos da medicina como a ortopedia, cirurgia maxilofacial, odontologia, neurocirurgia, gastroenterologia,

cardiologia, entre outras áreas. A Tabela 01 indica alguns tipos de polímeros muito utilizados na área cardiovascular [1,2,4].

**Tabela 01** – Alguns tipos de biomateriais e suas aplicações na área cardiovascular.

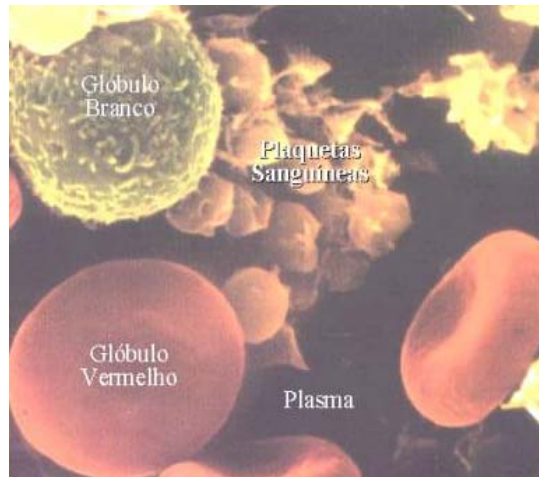
<b>Material sintético</b>	<b>Aplicação</b>
Dacron	Próteses cardiovasculares
Poliamida (PA)	Linha de sutura e próteses cardiovasculares
Policloreto de vinila (PVC)	Cateteres
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Cateteres e membranas de oxigenadores
Polietileno (PE)	Cateteres
Polipropileno (PP)	Linha de sutura
Polisulfona (PSU)	Membranas de hemodiálise
Politereftalato de etileno (PET)	Linha de sutura e próteses cardiovasculares
Politetrafluoretileno (PTFE)	Próteses cardiovasculares
Poliuretano (PU)	Coração artificial, cateteres e próteses cardiovasculares

Ao se examinar a fisiologia de coagulação do sangue e os seus mecanismos de controle, pode-se verificar como os polímeros sintéticos hemocompatíveis podem ser projetados a fim de serem bem tolerados pelo tecido sangüíneo.

## 2.2 – Fisiologia da coagulação

O sangue é um tecido conjuntivo líquido que circula pelo sistema vascular sangüíneo dos animais vertebrados e que tem como função à manutenção da vida do organismo. Ele é constituído por uma suspensão de células em uma solução eletrolítica [5].

As células que correspondem à parte sólida são as hemácias (ou eritrócitos ou glóbulos vermelhos), leucócitos (ou glóbulos brancos) e plaquetas (Figura 2.1). As hemácias são responsáveis pelo transporte de oxigênio, os leucócitos são as células de defesa do organismo e as plaquetas exercem uma função importante no processo de coagulação sangüínea. Já a solução salina, mais conhecida como plasma ou soro, é formada por 90% de água; 1% de substâncias inorgânicas tais como potássio, sódio, ferro e cálcio; 7% de proteínas plasmáticas e 1% de substâncias orgânicas não protéicas [2].



**Figura 2.1** – Componentes celulares do sangue. Fonte: referência [6].

As proteínas que constituem o plasma sanguíneo humano, denominadas proteínas séricas, são basicamente a albumina de soro humano (HSA), as imunoglobulinas (Ig) e o fibrinogênio humano (HFb). A Tabela 02 ilustra a concentração dessas proteínas presentes no plasma sanguíneo humano [5].

**Tabela 02** – Concentração das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo humano.

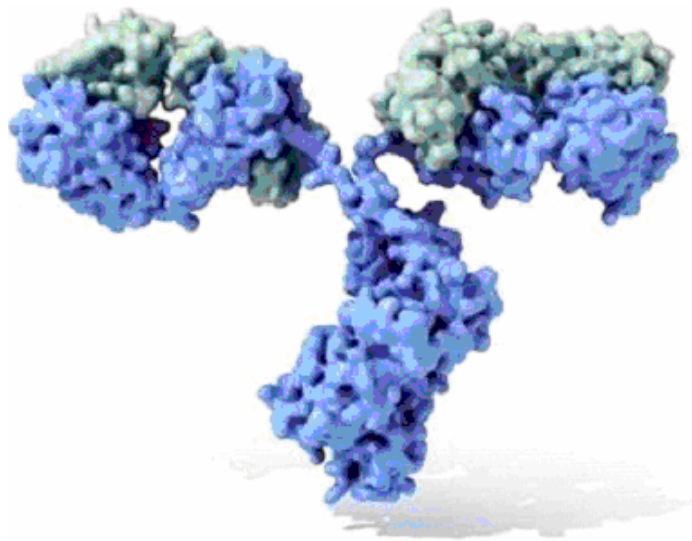
<b>Proteína</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Albumina	35 – 45
Fibrinogênio	2 – 4
Imunoglobulina G	9,2 - 14,8
Imunoglobulina A	1,4 - 2,6
Imunoglobulina M	0,9 - 1,8

Como pode ser observado na Tabela 02, a albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo. Dentre as suas inúmeras funções destaca-se a manutenção da pressão osmótica necessária para a distribuição adequada de fluídos corpóreos entre compartimentos intravasculares e tecidos corporais [7]. A Figura 2.2 apresenta uma estrutura em fita da albumina.



**Figura 2.2** – Representação em fitas da proteína sérica albumina. Fonte: referência [8].

As imunoglobulinas são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B presentes no plasma, tecidos e secreções que atacam proteínas estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando, assim, a defesa do organismo [9]. A Figura 2.3 ilustra uma estrutura tridimensional da imunoglobulina G.

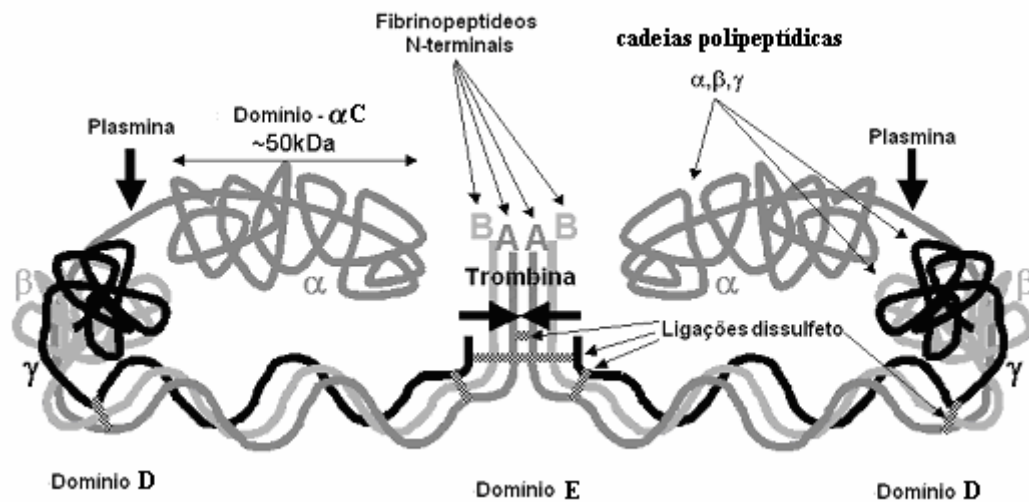


**Figura 2.3** – Representação tridimensional da imunoglobulina G. As duas cadeias de polipeptídeos com baixo peso molecular e alto peso molecular estão ilustradas em verde água e azul, respectivamente. Fonte: referência [10].

O fibrinogênio é um fator de coagulação sanguínea, por isso, grande parte dos infartos são ocasionados devido ao aumento da formação de fibrina, viscosidade plasmática e agregação plaquetária, os quais estão diretamente relacionados com o aumento da concentração de fibrinogênio no sangue [11]. De acordo com a Figura 2.4, a molécula de



fibrinogênio é composto por duas sub-unidades idênticas, cada uma contendo três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ ,  $\beta B$  e  $\gamma$ ) as quais são unidas por ligações dissulfeto [11]. Além disso, possui dois domínios carregados negativamente (domínios D e E) e um domínio carregado positivamente ( $\alpha C$ ).



**Figura 2.4** – Diagrama representativo da molécula de fibrinogênio. Ele é composto por duas subunidades idênticas cada uma composta por três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ ,  $\beta B$  e  $\gamma$ ) as quais são interligadas por ligações de dissulfeto. A ação da trombina cliva a molécula de fibrinogênio em quatro pequenos peptídeos sendo dois fibrinopeptídeos A (FPA) e dois fibrinopeptídeos B (FPB). Adaptado da referência [12].

O processo de interação entre o sangue e superfícies sintéticas pode ser dividido em duas etapas [2]:

1. A adsorção de proteínas na superfície do material sintético que se dá por meio de três fases: o transporte para a interface, à reação de adsorção e a modificação conformacional da proteína sobre essa superfície. As proteínas podem se ligar à superfície do material através de interação eletrostática entre os domínios das proteínas e superfícies carregadas com cargas opostas, por ligação de hidrogênio ou por interações hidrofóbicas.
2. A interação do material sintético com células do sangue. A adesão de células sobre a superfície sintética ocorre imediatamente após a adsorção de proteínas. Se o material sintético adsorver preferencialmente fibrinogênio em sua superfície, a adesão de plaquetas será maior do que se ele tivesse adsorvido preferencialmente albumina. Ou

seja, o fibrinogênio causa uma adesão maior de plaquetas na superfície do material sintético.

Portanto, a adsorção de proteínas e a adesão de células, como as plaquetas, são eventos essenciais para que uma seqüência de reações bioquímica ocorra dando início, assim, a chamada cascata de coagulação cujo evento final é a formação de coágulos.

### **2.2.1 – A cascata de coagulação**

A coagulação sangüínea ocorre por meio da ativação proteolítica que resulta na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina, conforme mostrado na Figura 2.5. O mecanismo de coagulação pode ser ativado por duas vias diferentes: a via intrínseca e a via extrínseca. Na ativação da via intrínseca tem-se, apenas, a participação de fatores circulantes da coagulação, enquanto que, a via extrínseca é desencadeada por um fator não circulante (o fator tecidual), proveniente da célula endotelial. Este fator tecidual (FT) é uma lipoproteína que faz parte das membranas celulares [2,5,13-16].

O sistema intrínseco de coagulação é ativado quando o fator XII do sangue entra em contato com a fibrila do colágeno sub-endotelial que fica exposta após alguma lesão do vaso sangüíneo. Ao se unir à fibrila, o fator XII forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e com a pré-caliceína (PK). Com a formação deste complexo, o fator XII é ativado. Sucessivamente, o Fator XIIa ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. Já, o fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subseqüentemente, a formação de fibrina.

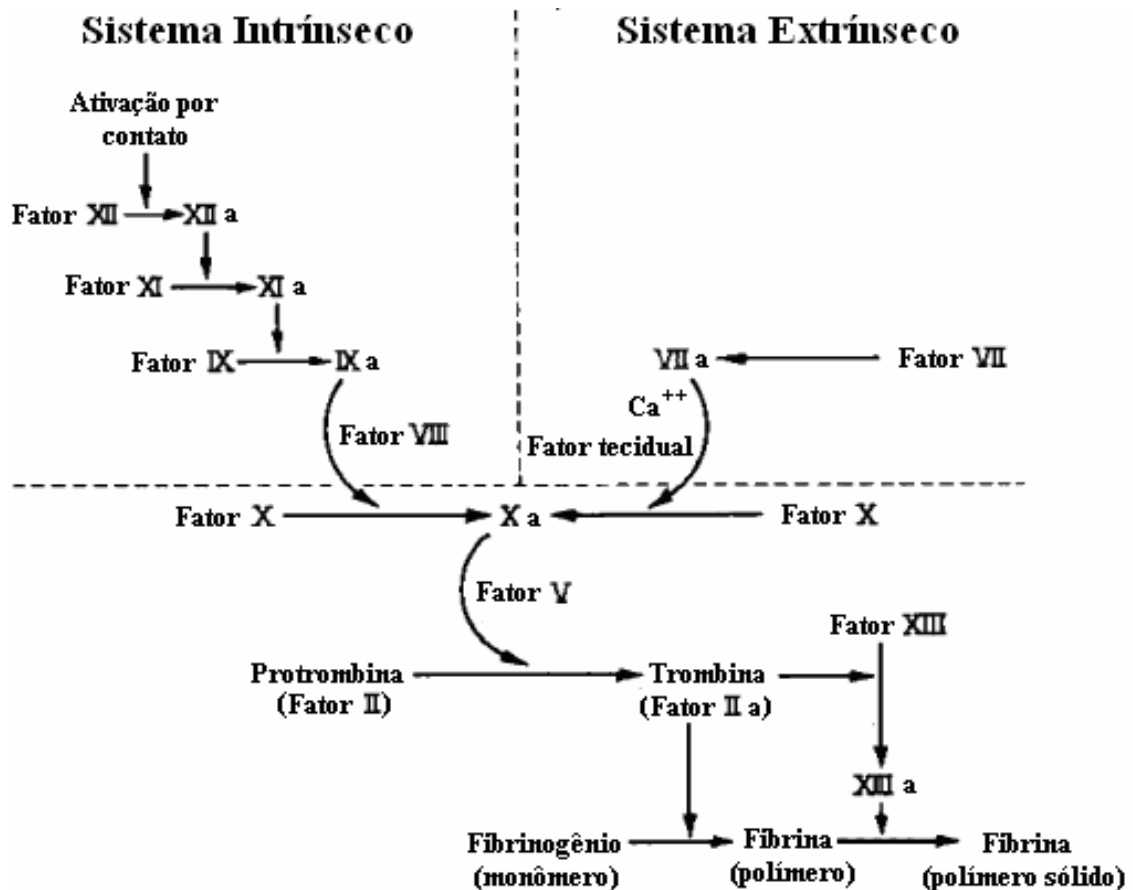
Na via extrínseca, o fator VII plasmático na presença do seu cofator (o fator tecidual ou tromboplastina) ativa diretamente o fator X.

No ponto de convergência das vias intrínseca e extrínseca, o fator VIIa e o fator XIa irão ativar os fatores IX e X com a participação do fator VIII. Nessa reação há a formação de um complexo onde os fatores IX e X estão ligados pelo cálcio a fosfolipídios de membrana celular. Desse modo, a geração do fator Xa é uma consequência da ativação das duas vias que iniciam a coagulação sangüínea.

A ação do fator Xa transforma a protrombina em trombina, com a participação do fator V. A trombina é o pivô da coagulação sangüínea com ação em múltiplos pontos no processo hemostático. Além da ativação das plaquetas no trombo hemostático, a trombina ativa os fatores V, VIII, XIII e atua sobre o fibrinogênio. Na ação sobre o fibrinogênio ocorre

a formação da fibrina. A atuação do fator XIIIa transforma a fibrina em uma fibrina sólida e estável.

Embora haja a tradição de se dividir o sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco, tal separação é atualmente entendida como inadequada do ponto de vista da fisiologia da coagulação, tendo em vista que essa divisão não ocorre em condições *in vivo* [16].



**Figura 2.5** – Diagrama representativo da cascata de coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias: extrínseca e intrínseca. Adaptado da referência [13].

### 2.2.2 – Mecanismo de inibição da coagulação sangüínea

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas de modo a evitar a ativação excessiva do sistema, a formação inadequada de fibrina e a oclusão vascular [16]. Dentre as inúmeras proteínas inibitórias da ativação da coagulação existem duas que são mais relevantes e que atuam em caminhos diferentes, a antitrombina (AT) e o TFPI (inibidor do fator tecidual).

A antitrombina (AT) é o inibidor primário da trombina, mas ela também exerce um efeito inibitório em outras enzimas incluindo os fatores IXa, Xa e XIa. Este inibidor atua formando o complexo enzima-inibidor que bloqueia o sítio ativo da enzima. A deficiência parcial da antitrombina é uma causa bastante comum de problemas trombogênicos. Tanto em ensaios clínicos quanto *in vivo* a ação da AT pode ser acelerada pela heparina, que é um outro anticoagulante. A heparina aumenta bastante a atividade intrínseca da antitrombina.

Já o TFPI reage com o fator Xa para formar o complexo TFPI-Xa o qual inibe o complexo TF-VIIa tornando, assim, inativa a formação de trombina e, conseqüentemente, da fibrina. A sua concentração no plasma sanguíneo é muito baixa. Contudo, ela pode ser liberada por células endoteliais e plaquetas, aumentando significativamente a sua concentração local sob várias condições de estimulação celular.

A fim de se obter superfícies poliméricas hemocompatíveis, ou com propriedades antitrombogênicas, várias metodologias tem sido desenvolvidas há pelo menos quatro décadas com a principal finalidade de se alterar as respostas bioquímicas indesejáveis do tecido sanguíneo frente a um material sintético. Neste caso, destaca-se o revestimento de superfícies hidrofóbicas com hidrogéis para a produção de microdomínios na superfície polimérica ou, a imobilização de compostos bioativos na superfície sintética [1-5].

Contudo, embora se tenha atingido um sucesso considerável quanto à obtenção de revestimentos com melhores propriedades hemocompatíveis, um polímero com estas propriedades bioquímicas ideais, em longo prazo, ainda não foi obtido e, a própria teoria da hemocompatibilidade de superfícies sintéticas continua sendo campo de estudo em aberto na ciência dos materiais.

### **2.3 – Considerações parciais**

Apesar dos polímeros sintéticos serem muito utilizados como revestimento de dispositivos biomédicos, tanto na área cardiovascular como em outras áreas da medicina, eles não são inteiramente compatíveis com o sangue e, como já foi mencionado anteriormente, eles necessitam de anticoagulantes para minimizar a formação de trombos, que ocasionam efeitos colaterais graves no organismo humano.

É fato já consolidado pela literatura que, quando o material sintético é colocado em contato com o tecido sanguíneo, as proteínas sorvidas na superfície polimérica desempenham um papel significativo na ativação da cascata de coagulação do sangue. Portanto, através da análise do processo de adsorção de proteínas séricas na interface da superfície sintética, é

possível determinar se um material sintético é compatível ou não com o sangue. Afinal, da literatura, sabe-se que se a superfície sintética adsorver uma maior concentração de albumina do que de fibrinogênio, este material poderia, num primeiro momento, ser considerado hemocompatível. Por outro lado, se a adsorção de fibrinogênio for maior, ele será incompatível com o sangue.

O capítulo seguinte abordará alguns dos principais aspectos físicos e químicos do processo de adsorção protéica e sua relação com a hemocompatibilidade.

## 2.4 – Referências bibliográficas

- [1] Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices. *Handbook of Materials for Medical Devices*. 1-11. Disponível em < <http://www.asminternational.org/pdf/spotlights/Biomaterials.pdf>>. Acesso em: 28 janeiro 2007.
- [2] *Blood-compatible materials*. Disponível em < [http://edoc.bib.ucl.ac.be:81/ETD-db/collection/available/BelnUcetd-11232005-103604/unrestricted/2-Part\\_A\\_Introduction.pdf](http://edoc.bib.ucl.ac.be:81/ETD-db/collection/available/BelnUcetd-11232005-103604/unrestricted/2-Part_A_Introduction.pdf)>. Acesso em: 01 fevereiro 2007.
- [3] Disponível em <[http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf\\_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf](http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf)>. Acesso em: 22 janeiro 2007.
- [4] Cohen, I. Biomaterials in Cardiology. 19-23. Disponível em < [http://www.weizmann.ac.il/ICS/booklet/22/pdf/ilana\\_cohen.pdf](http://www.weizmann.ac.il/ICS/booklet/22/pdf/ilana_cohen.pdf)>. Acesso em: 28 janeiro 2007.
- [5] Jozefowicz, M.; Jozefonvicz, J. Antithrombogenic polymers. *Pure & Applied Chemistry*. 56 (10): 1335-1344, 1984.
- [6] Disponível em < <http://www.geocities.com/leonelpereira/sangue.htm>>. Acesso em: 28 janeiro 2007.
- [7] Disponível em <<http://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation/III.D>>. Acesso em: 15 dezembro 2006.
- [8] Disponível em < <http://gl.wikipedia.org/wiki/Albumina>>. Acesso em 28 janeiro 2007.
- [9] Disponível em <<http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/imunoglobulinas.shtml>>. Acesso em: 15 dezembro 2006.
- [10] Disponível em < <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/igg;jsessionid=9D750995B5C43EAC4CBF2E6AF2CE0B66>>. Acesso em: 28 janeiro 2007

- [11] Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*. 12 (6): 439-446, 1999.
- [12] Disponível em <<http://www.well.ox.ac.uk/~fionag/fibrinogen.shtml>>. Acesso em: 28 janeiro 2007.
- [13] Gorbet, M.B.; Sefton, M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 25 (26): 5681-5703, 2004.
- [14] Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Hemostasia>>. Acesso em: 29 novembro 2006.
- [15] Disponível em <<http://www.surmodics.com/pdf/HemoCompWP.pdf>>. Acesso em: 30 novembro 2006.
- [16] Franco, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Hemostasia e Trombose*. 34: 229-237, 2001.

## Capítulo 3 – Aspectos Físico-Químicos da Hemocompatibilidade

---

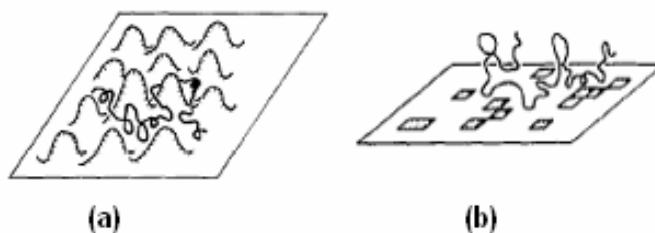
### 3.1 – Introdução

Um entendimento adequado sobre o fenômeno de adsorção de uma proteína sobre uma superfície sintética requer o conhecimento sobre a natureza química dos seus constituintes, a reologia do meio, a geometria de contato e as propriedades físico-químicas das superfícies envolvidas no processo [1]. Afinal, o fenômeno de adsorção ocorre devido a forças intermoleculares que atuam em uma interface e, por isto, este fenômeno também é conhecido como um fenômeno interfacial.

A fim de elucidar o processo de adsorção de proteínas séricas sobre um material sintético é necessário introduzir algumas considerações sobre a topologia e a rugosidade da superfície, densidade superficial de cargas das proteínas na interface, isoterma de adsorção, energia livre de superfície e sobre os tipos de interações intermoleculares que atuam na interface proteína-material sintético.

### 3.2 – Topologia e rugosidade de superfície

Tanto o fenômeno de adsorção de polímeros sintéticos sobre superfícies metálicas quanto o fenômeno de adsorção de proteínas séricas sobre superfícies de polímeros sintéticos, são amplamente utilizados na confecção de sensores, imunossensores e biossensores [2]. No entanto, durante estes processos há a formação de rugosidades que modulam a capacidade do material de interagir com outros compostos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. A origem dessa rugosidade pode ser química ou física, como mostrado na Figura 3.1. No caso da rugosidade física a curvatura da superfície é uma variável randômica de modo que a superfície pode ser modelada consistindo de picos e vales. Já as superfícies que apresentam rugosidade química possuem regiões com mais afinidade à proteína quando comparada com o resto da superfície [3].



**Figura 3.1** – Características de rugosidades em superfícies. (a) Rugosidade física. (b) Rugosidade química.  
Fonte: referência [3].

O princípio físico da adsorção de polímeros sobre um substrato metálico está relacionado com a competição entre o ganho de energia potencial obtido pelos monômeros ao se ligarem com a superfície atrativa do suporte e a perda na entropia da cadeia. Esta entropia está associada com a redução no número de possíveis configurações das cadeias quando elas se encontram no estado adsorvido. O mesmo ocorre quando proteínas são adsorvidas sobre uma superfície polimérica.

Quando a superfície apresenta certa rugosidade, como ilustrado na Figura 3.1, há três efeitos físicos principais que podem ocorrer [3]:

1. O espaço deixado para a cadeia assumir várias configurações é maior perto do topo do pico que o espaço deixado na parte inferior do vale. Neste caso, considerando apenas a entropia do sistema, a adsorção ocorreria preferencialmente perto do topo dos picos presentes no substrato.
2. O número de contatos por cadeia com a superfície será maior no vale do que no pico. Portanto, considerando apenas a energia potencial, a adsorção se daria preferencialmente na parte inferior dos vales.
3. A interação potencial entre os meros e o substrato metálico, ou a interação entre os meros da proteína e os meros da superfície sintética, é dependente da curvatura local que afeta as condições de contorno usadas para determinar o processo de adsorção característico.

Neste sentido, a rugosidade da superfície em que o polímero, ou a proteína, será adsorvido influencia na morfologia do filme polimérico ou do filme protéico formado que, por sua vez, pode alterar a resposta de um biossensor. Em síntese, quanto maior for a



rugosidade da superfície de um determinado substrato, maior é o favorecimento da adesão de partículas sobre ela [4].

### 3.3 – Densidade superficial de carga

Quase todos os materiais macroscópicos adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um meio polar. O potencial Zeta,  $\zeta$ , é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade do processo de adsorção protéica em superfícies sintéticas.

Estudos eletroquímicos onde há formação de interface entre metal e solução de eletrólitos representam uma aproximação do que ocorre no sistema partícula-meio aquoso e têm contribuído consideravelmente para o estudo das interfaces.

No presente trabalho, quando o dendrímero de poliglicerol (PGLD) é adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro, ocorre uma redistribuição de carga da macromolécula de PGLD de tal forma que, na superfície do eletrodo, acumula-se uma camada de íons negativos. Esta carga líquida afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície devido à presença de proteínas fracamente ionizadas com carga positiva (pH próximo a 7.4) presente na solução [5]. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface do dendrímero com a solução, como ilustrado na Figura 3.2. Segundo a teoria de Stern [6] essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons adsorvidos à superfície das partículas, chamada de camada de Stern, e uma região exterior, chamada de camada difusa, onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre as forças eletrostáticas e o movimento térmico (Figura 3.2). A parte da dupla camada entre o plano no qual o dendrímero está localizado e o plano de Stern, que passa pelos contra-íons, é considerado um condensador molecular, no qual o potencial de superfície,  $\psi_o$ , decresce linearmente com a distância da superfície para um valor  $\psi_\delta$  no plano de Stern [6]. A densidade de carga nas camadas de Stern,  $\sigma_1$ , é dada por:

$$\sigma_1 = \frac{N_1 z e}{1 + \frac{N_A \rho}{Mn} \exp\left[\frac{-(ze\psi_\delta + \phi)}{kT}\right]} \quad (3.1)$$

sendo  $N_1$  o número disponível de sítios, por  $cm^2$ , para adsorção de íons;  $N_A$  o número de Avogadro;  $M$  a massa molecular do solvente;  $n$  a concentração de íons ( $n = \text{moles}/L \cdot N_A$ );  $\rho$  é a densidade do solvente;  $\psi_\delta$  é o potencial elétrico no plano de Stern,  $\phi$  é o potencial de adsorção específica do contra-íon pelo colóide,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $z$  é a valência do íon e  $e$  é a carga elementar do elétron.

O potencial Zeta é o potencial elétrico na superfície de cisalhamento da dupla camada elétrica. Ele se reduz a partir da superfície da partícula, e se torna zero onde a concentração de cargas elétricas são iguais. O potencial Zeta aumenta à medida que diminui a distância em relação à superfície da partícula, e a sua redução se dá pelo ajuste do pH próximo do ponto isoelétrico (valor de pH para o qual o somatório das cargas parciais é igual a zero), onde a carga primária é zero não conseguindo, portanto, a dupla camada para produzir esse potencial.

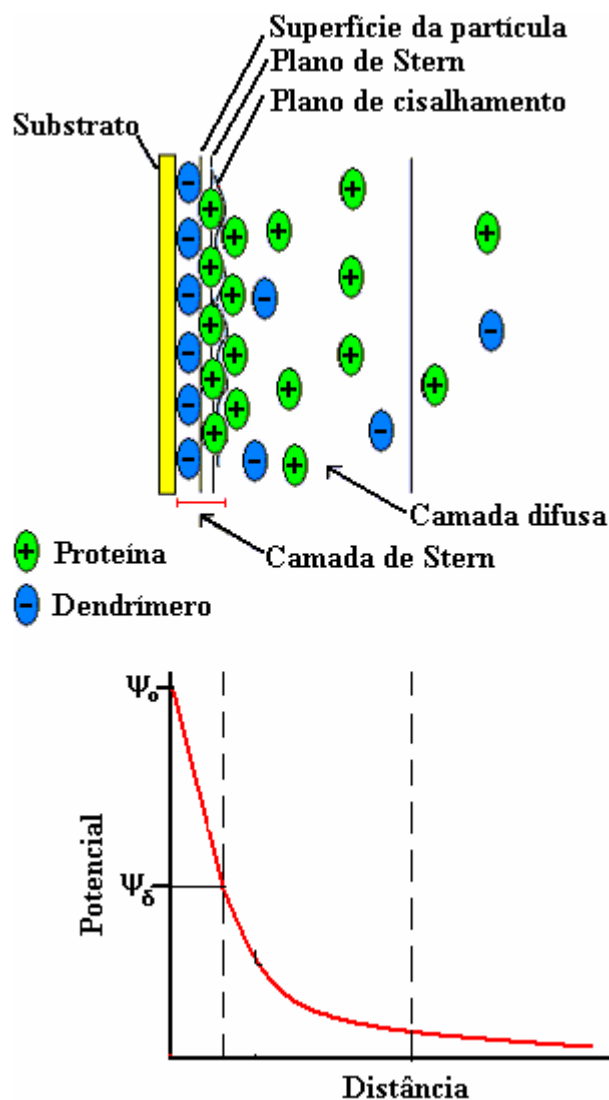


Figura 3.2 – Diagrama esquemático da formação de uma dupla camada elétrica.

### 3.4 – Hipótese termodinâmica da hemocompatibilidade

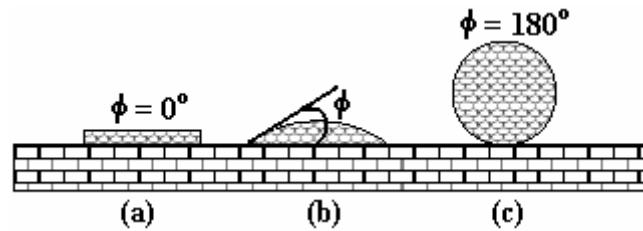
A propriedade de molhabilidade tem um papel fundamental na área biomédica, pois é através dela que se pode inferir sobre a adesão entre diferentes materiais [7]. A idéia de molhabilidade está associada à interação de um líquido com uma superfície sólida. Durante esta interação, o líquido pode se espalhar sobre a superfície ou penetrar nos poros do substrato ou, então, pode escoar sobre a superfície sólida na forma de gotas, ou seja, a molhabilidade é usualmente definida como uma tendência do fluido se espalhar ou aderir sobre a superfície sólida na presença de outro fluido [8,9].

Em 1805, a partir de conceitos da termodinâmica e equilíbrio de forças, Thomas Young obteve uma equação que associava parâmetros importantes com relação ao efeito de interação sólido-líquido [7-9]. Esse resultado é mostrado na equação (3.2), conhecida como a equação de Young:

$$\sigma_{LV} \cos \Phi = \sigma_{SV} - \sigma_{SL}, \quad (3.2)$$

sendo  $\Phi$  o ângulo de contato entre um líquido e uma superfície sólida e  $\sigma_{LV}$ ,  $\sigma_{SV}$ ,  $\sigma_{SL}$  são, respectivamente, as tensões superficiais líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido.

O ângulo de contato,  $\Phi$ , é definido no ponto de contato entre a tangente à superfície do líquido e a tangente a superfície horizontal que está sendo analisada, as duas tangentes pertencem a um plano de simetria da gota. A Figura 3.3 ilustra os tipos de ângulo de contato utilizados no estudo da molhabilidade de uma superfície. Para uma superfície de molhabilidade considerável,  $\Phi$  encontra-se abaixo de  $90^\circ$  e, esta superfície é chamada de hidrofílica. Se esse ângulo for igual a zero, a superfície fica completamente molhada e, para este caso, a superfície é chamada de super-hidrofílica. Contudo, quando  $\Phi$  for maior que  $90^\circ$  a superfície é conhecida como hidrofóbica, ou seja, ela não fica molhada. No entanto, se esse ângulo for maior que  $165^\circ$  ou igual a  $180^\circ$ , a superfície é chamada de super-hidrofóbica. Portanto, quanto menor for o ângulo de contato maior será a adsorção do fluido sobre a superfície do substrato.



**Figura 3.3** – Definição do ângulo de contato,  $\Phi$ , entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal e as condições de molhabilidade desta superfície. Em (a) tem-se uma superfície super-hidrofílica ( $\Phi = 0^\circ$ ), em (b) tem-se uma superfície com molhabilidade parcial ( $180^\circ > \Phi > 0^\circ$ ) e em (c) tem-se uma superfície super-hidrofóbica ( $\Phi = 180^\circ$ ). Fonte: referência [7].

O ângulo de contato está diretamente relacionado com a energia livre de superfície, também conhecida como tensão superficial [7].

O fenômeno de tensão superficial pode ser explicado a partir da hipótese de que a superfície externa de um líquido é formada por uma camada com espessura da ordem de algumas moléculas. As propriedades dessa camada diferem das propriedades das moléculas no interior deste líquido, portanto, pode-se dizer que existem duas fases em equilíbrio e que a superfície de um líquido comporta-se como uma membrana elástica. Ou seja, quando uma molécula da superfície é ligeiramente deslocada, as ligações moleculares entre ela e as moléculas vizinhas são alongadas, o que faz com que apareça uma força restauradora que tende a recolocar essa molécula deslocada de novo na superfície. Essa força é chamada de tensão superficial. Portanto, do ponto de vista termodinâmico, a tensão superficial pode ser interpretada em termos da energia das moléculas na região da superfície [8].

Na direção normal à interface sólido-líquido, as forças de interação, que atuam nessa região, promovem uma drenagem de moléculas para o interior do volume do líquido fazendo, assim, com que a densidade de moléculas seja menor na região interfacial. Ou seja, as partículas na superfície do material experimentam apenas forças dirigidas para dentro do líquido. Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia. E é justamente a diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material que se denomina energia de superfície ou tensão interfacial. A adesão de um material sobre outro será tanto melhor quanto maior for a energia das superfícies envolvida.

Portanto, do ponto de vista termodinâmico, pode-se dizer que as propriedades biocompatíveis de uma superfície sintética estão relacionadas com uma baixa energia livre de superfície e, conseqüentemente, com a molhabilidade desta superfície. Ou seja, após entrar em contato com o sangue, aquelas superfícies sintéticas que possuem uma baixa energia livre de superfície poderão exibir propriedades hemocompatíveis [10]. Deste modo, revestimentos

de baixa energia livre de superfície poderiam inibir os processos de adesão e ativação das plaquetas sangüíneas.

### **3.5 – Interações intermoleculares**

As forças fundamentais da natureza que unem átomos para formarem moléculas e as moléculas para formarem os líquidos ou sólidos, são responsáveis pela adesão de dois substratos quando, estas, atuam sobre eles. E, como já foi mencionado anteriormente, a formação de uma camada sobre o substrato está diretamente associada à sua capacidade de molhamento que é regulada pela energia livre de superfície. Por sua vez, a energia livre de superfície pode ser mensurada através do ângulo de contato e calculada por meio da equação de Young.

As interações intermoleculares, que atuam no processo de adsorção a aparecem na equação de Young, surgem devido às forças intermoleculares, que são essencialmente de natureza elétrica, e fazem com que uma molécula influencie o comportamento de outra molécula em suas proximidades [11]. Por isso, as forças de van der Waals e as ligações de hidrogênio desempenham um importante papel na relação adsorção protéica-hemocompatibilidade.

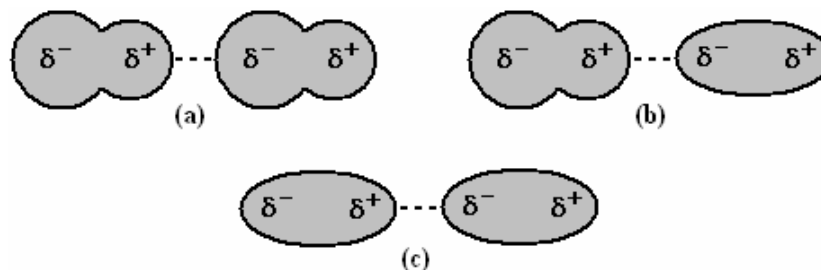
#### **3.5.1 – Forças de van der Waals**

As forças de van der Waals são forças que referenciam as interações intermoleculares fracas que aparecem devido à polarização das moléculas. Essas forças podem surgir a partir de três tipos de polarização [11,12]:

1. Interação dipolo-dipolo. Embora as moléculas de alguns materiais sejam eletricamente neutras, elas podem exibir um dipolo elétrico permanente. Isto porque uma molécula é composta por átomos que apresentam diferentes eletronegatividades de tal forma que, os átomos com menor eletronegatividade tendem a ficar com cargas parciais positivas e, os átomos com maior eletronegatividade tendem a ficar com cargas parciais negativas. Como resultado, ocorre uma polarização das ligações e a tendência destas moléculas é de se alinharem e interagirem umas com as outras por meio de atrações eletrostáticas entre os dipolos opostos.

2. Interações dipolo permanente-dipolo induzido. Aquelas moléculas que apresentam dipolos permanentes podem induzir um dipolo em uma segunda molécula que esteja localizada próxima no espaço. Estes dipolos induzidos tendem a se alinhar de várias maneiras com o dipolo permanente da primeira molécula.
3. Forças de dispersão ou forças de London. Estas forças explicam a atração entre moléculas apolares. Quando dois ou mais compostos apolares interagem o contato de uma molécula com a outra faz com que apareça uma força atrativa muito fraca que pode ser vista como uma interação dipolo induzido - dipolo induzido. Isto porque, uma molécula perturba a densidade eletrônica da outra, fazendo aparecer dipolos momentâneos que se orientam e originam este tipo de interação fraca.

A Figura 3.4 apresenta uma ilustração dos três tipos de forças de van der Waals que aparecem em interações intermoleculares devido à polarização das moléculas.



**Figura 3.4** – Ilustração das forças intermoleculares de van der Waals. Em (a) temos a interação dipolo-dipolo, em (b) a interação dipolo permanente-dipolo induzido e em (c) a interação dipolo induzido-dipolo induzido. Adaptado da referência [13].

### 3.5.2 – Ligações de hidrogênio [14]

As ligações de hidrogênio são interações que ocorrem quando átomos muito eletronegativos atraem átomos de hidrogênio que já estão ligados a um outro átomo eletronegativo. Este tipo de ligação pode ocorrer entre duas moléculas (interação intermolecular) ou entre átomos de uma mesma molécula (interação intramolecular) e ela é considerada mais forte que as forças intermoleculares de van der Waals, porém mais fraca que as ligações covalentes e iônicas.

Neste tipo de ligação, um átomo de hidrogênio unido a um átomo eletronegativo é considerado um doador de elétrons. Enquanto que, os átomos eletronegativos, como o flúor, o oxigênio e o nitrogênio, são considerados aceitadores de elétrons.

Nas ligações de hidrogênio que aparecem quando uma camada de proteína é adsorvida sobre um substrato, o átomo eletronegativo atrai a nuvem de elétrons em torno do núcleo do hidrogênio deixando-o com uma carga parcial positiva. Por causa do tamanho pequeno do hidrogênio a carga resultante, embora somente parcial, representa uma grande densidade de carga. Assim, a ligação do hidrogênio resulta quando esta forte densidade de carga positiva atrai um par de elétrons em um outro átomo.

Freqüentemente, a ligação do hidrogênio é descrita como uma interação eletrostática do tipo dipolo-dipolo. Contudo, ela também apresenta algumas características da ligação covalente como, por exemplo, ser uma ligação direcional e forte.

Embora a ligação de hidrogênio e a força de van der Waals sejam consideradas forças de interações fracas, elas regem o processo de adsorção das proteínas séricas sobre a superfície de um polímero sintético. Entretanto, a adsorção protéica envolve o acúmulo do material biológico na superfície sintética e, neste caso, as isotermas de adsorção contribuem para o entendimento da topologia da camada protéica adsorvida na interface fluido biológico-polímero sintético.

### **3.6 – As isotermas de adsorção**

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente através das isotermas. As isotermas derivadas teórica ou empiricamente podem, freqüentemente, ser representadas por equações simples que relacionam diretamente o volume adsorvido em função da pressão e/ou concentração do adsorvato. As isotermas mais utilizadas no estudo da adsorção são as seguintes: Langmuir, Freundlich, Henry, Temkin, Giles e Brunauer, Emmett, Teller (BET) [15]. As isotermas de Langmuir e Freundlich serão detalhadas uma vez que são as mais utilizadas na modelagem da adsorção proteínas séricas sobre superfícies sintéticas em função da homogeneidade/heterogeneidades superficiais.

#### **3.6.1 – A isoterma de adsorção de Langmuir**

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

1. O sistema é ideal;
2. As moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados, com adsorção em monocamada em superfície homogênea;
3. Cada sítio pode acomodar uma, e somente uma, entidade adsorvida;
4. A energia da entidade adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos, ou seja, apresenta interação desprezível entre as moléculas adsorvidas.

A isoterma de Langmuir é a mais frequentemente utilizada e pode ser expressa como [15,16]:

$$\frac{C}{m} = \frac{1}{bm_{\max}} + \frac{C}{m_{\max}}, \quad (3.3)$$

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

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

O parâmetro  $b$  está relacionado com a energia livre de Gibbs de adsorção,  $\Delta G_{ADS}$ , através da seguinte equação [16]:

$$b = \frac{1}{C_s} e^{\left(\frac{-\Delta G_{ADS}}{RT}\right)} \quad (3.4)$$

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

Além disso, existe uma relação linear entre o coeficiente de adsorção,  $b$ , e a constante de equilíbrio de Langmuir,  $K_e$ , descrito pela equação (3.5):

$$K_e = m_{\max}b. \quad (3.5)$$



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

$$K_e = Ae^{\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right)}, \quad (3.6)$$

sendo  $A$  uma constante empírica.

Vale ressaltar que valores da entalpia de adsorção,  $\Delta H$ , menores que  $10 \text{ kJ/mol}$  correspondem a um processo de adsorção física ao passo que valores superiores a  $200 \text{ kJ/mol}$  correspondem a um processo de adsorção química [17].

### 3.6.2 – A isoterma de adsorção de Freundlich

A isoterma de Freundlich considera a adsorção em multicamadas e é útil para descrever a adsorção em superfícies altamente heterogêneas e, em muitos casos, fornece uma representação do equilíbrio de adsorção de um único soluto melhor do que a isoterma de Langmuir [15]. Matematicamente, esta isoterma é descrita por:

$$m = k_F C^{1/n} \quad (3.7)$$

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

A equação (3.7) pode ser linearizada, a fim de se obter os parâmetros  $k_F$  e  $n$  os quais são extremamente importantes para a análise do processo de adsorção, considerando o logaritmo na base 10 em ambos os lados da equação:

$$\log(m) = \frac{1}{n} \log(C) + \log(k_F). \quad (3.8)$$

A equação de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logaritmicamente, à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo soluto, o que a diferencia da equação de Langmuir. O modelo de Freundlich pode ser derivado teoricamente ao se considerar que o

decréscimo na energia de adsorção com o aumento da superfície coberta pelo soluto é devido à heterogeneidade da superfície [18].

### 3.7 – Considerações parciais

Para que um material sintético seja hemocompatível, esta característica irá depender de aspectos como a topologia e a rugosidade da superfície, a densidade superficial de cargas das proteínas na interface, o ângulo de contato, a energia livre de superfície e os tipos de interações intermoleculares que atuam na interface proteína-material sintético. Por isso, a análise do processo de adsorção de proteínas séricas em superfícies sintéticas é de extrema importância para o desenvolvimento de novos materiais para revestimentos de dispositivos biomédicos e próteses cardiovasculares.

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

Nas últimas décadas, as ciências analíticas têm experimentado um grande avanço relacionado com a capacidade de obtenção de informações da química de superfície dos materiais sintéticos. Como resultado, essas informações têm proporcionado um desenvolvimento analítico bem como sua incorporação a outras áreas científicas e técnicas, de forma a resultar na automação, miniaturização e simplificação dos sistemas analíticos. Assim sendo, verifica-se um grande desenvolvimento e expansão das fronteiras analíticas clássicas bem como o desenvolvimento de sistemas analíticos como sensores químicos e biossensores. Neste contexto, os biossensores têm adquirido grande importância devido à possibilidade de aplicação destes sistemas para avaliação dos processos ocorridos na interface fluido biológico-material sintético bem como o entendimento destes processos.

O desenvolvimento de dispositivos sensores tem como premissa básica à avaliação de processos interfaciais e superficiais, uma vez que estes processos são de fundamental importância no entendimento dos mecanismos de interação entre o material biológico e a superfície sintética. Além disso, o estudo de processos interfaciais e superficiais é de grande relevância para a escolha de um biomaterial adequado para aplicações cardiovasculares bem como a avaliação dos problemas associados à adsorção de uma proteína indesejável. Assim, o estudo destes processos pode auxiliar na escolha do melhor material para uma aplicação cardiovascular específica.

Uma nova técnica para o estudo da interação dos elementos sanguíneos e a superfície sintética tem se mostrado particularmente interessante como ferramenta analítica para a caracterização de biomateriais: a espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (RPS).

Onda de Plásmons de Superfície (OPS) são ondas eletromagnéticas longitudinais, que se propagam na interface entre um metal e um meio dielétrico. Estas ondas têm sido exploradas pela técnica RPS, pois podem receber energia de uma onda evanescente que se propaga pela interface. Neste caso, as curvas de reflectância são sensíveis à mudança de composição química na interface o que confere à técnica RPS sensibilidade em escala nanométrica e a possibilidade de se estudar *in situ* a fenomenologia da adsorção protéica.

Entretanto, existem ainda poucos trabalhos científicos baseados no fenômeno RPS para a quantificação da adsorção de proteínas séricas sobre a superfície de macromoléculas sintéticas. Uma vez que a adsorção é um fenômeno de interface, a RPS parece ser uma técnica interessante para o estudo das características de hemocompatibilidade de sistemas macromoleculares arborescentes.

O grupo de pesquisa de Polímeros Bioativos e Biomiméticos tem se dedicado nos últimos dois anos à síntese de macromoléculas arborescentes denominadas dendrímeros. Como já citado anteriormente, os dendrímeros possuem estruturas supramoleculares interessantes para o projeto de revestimentos hemocompatíveis e ou antitrombogênicos. Um dendrímero particularmente interessante é o dendrímero de poliglicerol (PGLD).

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

### 3.8 – Referências bibliográficas

- [1] Disponível em <[http://www.quimica.com.br/revista/qd393/adesivo\\_tec1.htm](http://www.quimica.com.br/revista/qd393/adesivo_tec1.htm)>. Acesso em: 18 janeiro 2007.
- [2] Rodriguez-Mozaz, S.; Maria-Pilar M.; de Alda, M. J. L.; Barceló, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure & Applied Chemistry*. 76 (4): 723-752, 2004.

- [3] Baumgartner, A.; Muthukumar, M. Effects of surface roughness on adsorbed polymer. *Journal Chemistry Physics*. 94 (5): 4062-4070, 1991.
- [4] Silva, W.J. Efeito da Nistatina, Fluconazol e do Extrato Etanólico de Própolis de *Apis mellifera* sobre propriedades de superfície de resina acrílica. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas/Piracicaba (UNICAMP/Pi). 2005.
- [5] Klajnert, B.; Stanislwska, L.; Bryszewska, M.; Palecz, B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 1648 (1-2): 115-126, 2003.
- [6] Aleoni, L. R. F, Camargo, O.A. Modelos de dupla camada difusa de gouy-chapman e stern aplicados a latossolos ácidos paulistas. *Scientia Agricola*. 51 (2): 315-320, 1994.
- [7] Teixeira, A.P.G.C. Caracterização topográfica e estrutural de filmes poliméricos provenientes de acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) depositados a plasma sobre substratos lisos e rugosos. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita/Guaratinguetá (UNESP/GUAR). 2003.
- [8] Burkarter, E. Construção de imagens por padrões hidrofóbico/hidrofílico. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná/Curitiba (UFPR). 2006.
- [9] Silva, R.C.R. Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via *core-flow*. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas/Campinas (UNICAMP). 2003.
- [10] de Queiroz, A.A.A. Thermodynamic analysis of the surface of biomaterials. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. 394 (2): 271-79, 1997.
- [11] Rocha, W.R. Interações intermoleculares. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 24 (4): 31-36 ,2001.
- [12] Disponível em:  
<[http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/forcas\\_intermoleculares.html](http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/forcas_intermoleculares.html)>. Acesso em 19 janeiro 2007.
- [13] Disponível em < [http://www.geocities.com/vienna/choir/9201/ligacoes\\_quimicas2.htm](http://www.geocities.com/vienna/choir/9201/ligacoes_quimicas2.htm)>. Acesso em 22 janeiro 2007.
- [14] Disponível em <[http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen\\_bond](http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_bond)>. Acesso em 22 janeiro 2007.
- [15] Bhattacharyya, K. G.; Sharma, A. Kinetics and thermodynamics of Methylene Blue adsorption on Neem (*Azadirachta indica*) leaf powder. *Dyes and Pigments*. 65 (1): 51-59, 2005.

- [16] Smiechowski, F. S.; Lvovich, V. F.; Roy, A.; Fleischman, A.; Fissell, W. H.; Riga, A. T. Electrochemical detection and characterization of Proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 22 (5): 670-677, 2006.
- [17] Disponível em  
<<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qf2/QF2/AulasPraticas2/Protocolos/ProtocoloAds.PDF>>. Acesso em: 15 janeiro 2007.
- [18] Alleoni, L.R.F; Camargo, O.A.; Casagrande, J.C. Isothermas de langmuir e de freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*. 55 (3): 379-387, 1998.

## Capítulo 4 – Fundamentos sobre Estruturas Poliméricas Arborescentes

---

### 4.1 – Introdução

Uma das áreas da química que tem demonstrado um grande desenvolvimento é a síntese de polímeros em cascata, também conhecidos como arboróis, ou dendrímeros, ou polímeros altamente ramificados. Eles foram descobertos acidentalmente em 1978 por Vögtle e, durante alguns anos, eles foram vistos apenas como uma curiosidade química [1-3]. De acordo com a Figura 4.1, somente depois de algum tempo é que eles passaram a ser investigados e, dessa forma, começaram a surgir as suas primeiras aplicações.

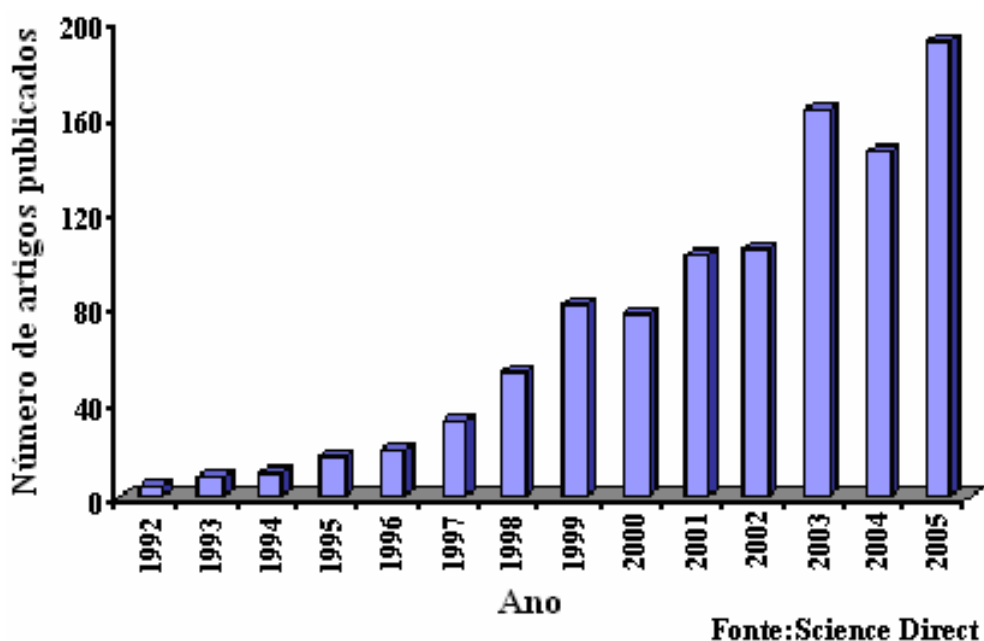
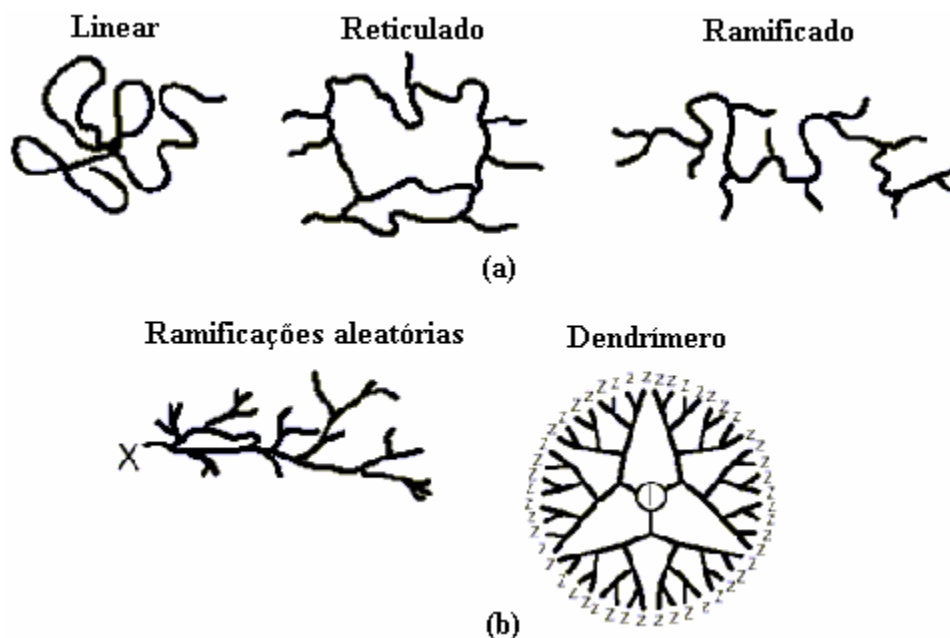


Figura 4.1 – Número de artigos publicados sobre dendrímeros nos anos de 1992 a 2005.

A Figura 4.2 ilustra uma comparação entre a estrutura de polímeros clássicos e a estrutura de um dendrímero. Pela figura percebe-se que os dendrímeros possuem uma estrutura bem definida com um alto grau de simetria e altamente organizada, apresentam um núcleo central e possuem muitos grupos funcionais periféricos. Além disso, são macromoléculas sintéticas, monodispersas, com elevado peso molecular, elevada área superficial e tamanho nanométrico, ao contrário dos polímeros lineares. Este tipo de molécula

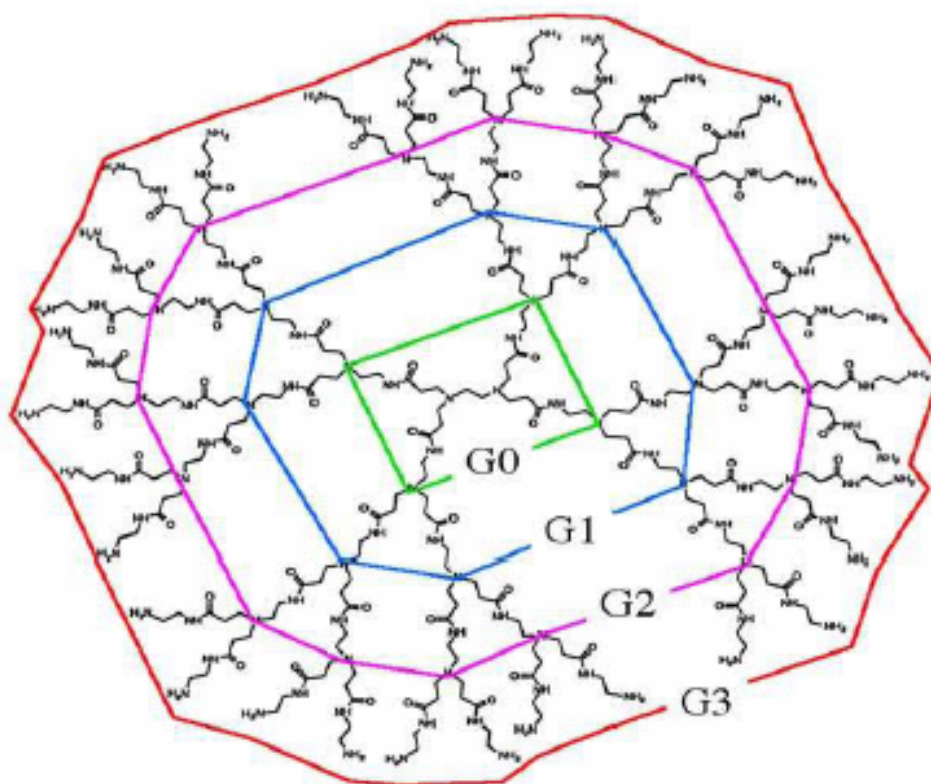
possui superfícies e interfaces altamente controladas e apresenta cavidades internas, o que permite, por exemplo, o encapsulamento de moléculas hospedeiras bioativas [1-9].



**Figura 4.2** – (a) Estruturas poliméricas clássicas. (b) Estruturas dendríticas. Fonte: referência [10].

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

Essas macromoléculas tridimensionais possuem pontos de ramificação em cada unidade monomérica que é capaz de conduzir a estruturas com definidos números de geração e grupos funcionais terminais. Estas moléculas crescem a partir de um núcleo, designado de Geração 0 (G0) e, cada conjunto de unidades monoméricas adicionadas torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter uma densa estrutura globular, como é ilustrado na Figura 4.3 [2].



**Figura 4.3** – Figura representativa do crescimento em gerações no dendrímero poli(amido amina) (PAMAM).  
Fonte: referência [2].

#### 4.2 – Os dendrímeros e suas propriedades [3]

Por causa da sua arquitetura molecular, os dendrímeros mostram uma melhora significativa nas suas propriedades físicas e químicas quando comparados aos polímeros lineares tradicionais. Esta propriedade possui um grande impacto sobre as suas propriedades reológicas.

Dentre as propriedades dos dendrímeros, podemos mencionar que:

1. Em solução, os polímeros de cadeias lineares são flexíveis enquanto que os dendrímeros formam esferas concêntricas.
2. Soluções de dendrímeros possuem uma viscosidade significativamente menor que os polímeros lineares e, esta, é uma das propriedades mais importantes dessas macromoléculas. A viscosidade aumenta com o aumento do número de monômeros, mas a partir de uma certa geração (em geral, a partir da geração 4), a viscosidade volta a diminuir, de tal forma que os dendrímeros de geração mais alta apresentam mais grupos terminais, porém menor viscosidade que os dendrímeros de geração mais



baixa. Este comportamento é diferente dos polímeros lineares. Afinal, para polímeros clássicos a viscosidade intrínseca aumenta continuamente com a massa molecular.

3. O número de grupos funcionais na superfície da macromolécula determina a geração do dendrímero.
4. A presença de muitas cadeias terminais é responsável por uma alta solubilidade, micibilidade e reatividade dos dendrímeros. A sua solubilidade é fortemente influenciada pela natureza dos grupos da superfície. Os dendrímeros terminais em grupos hidrofílicos são solúveis em solventes polares enquanto os dendrímeros terminais com grupos hidrofóbicos são solúveis em solventes apolares.
5. A massa molar,  $M$ , dos dendrímeros pode ser predita pela seguinte relação matemática:

$$M = M_c + n_c \left[ M_m \left( \frac{n_m^G - 1}{n_m - 1} \right) + M_t n_m^G \right] \quad (4.1)$$

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

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

$$Z = n_c \cdot n_m^G. \quad (4.2)$$

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

7. O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros muito importantes para a determinação e explicação do comportamento físico desses sistemas macromoleculares. Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente apresentam uma menor área superficial, o que é indesejável para o projeto de biossensores. Já as macromoléculas de peso molecular muito elevado são pouco solúveis e, por isso, geralmente não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.

8. A capacidade de encapsulamento de moléculas na macromolécula interior é uma das propriedades únicas que os dendrímeros apresentam devido a sua forma globular e a presença de cavidades internas.

### **4.3 – Síntese de dendrímeros**

A síntese de macromoléculas com estrutura dendrítica envolve uma reação de policondensação controlada que utiliza uma estratégia sintética repetitiva [4-5]. Desta maneira é possível um controle do peso molecular e do tamanho da macromolécula, o que produz polímeros isomoleculares.

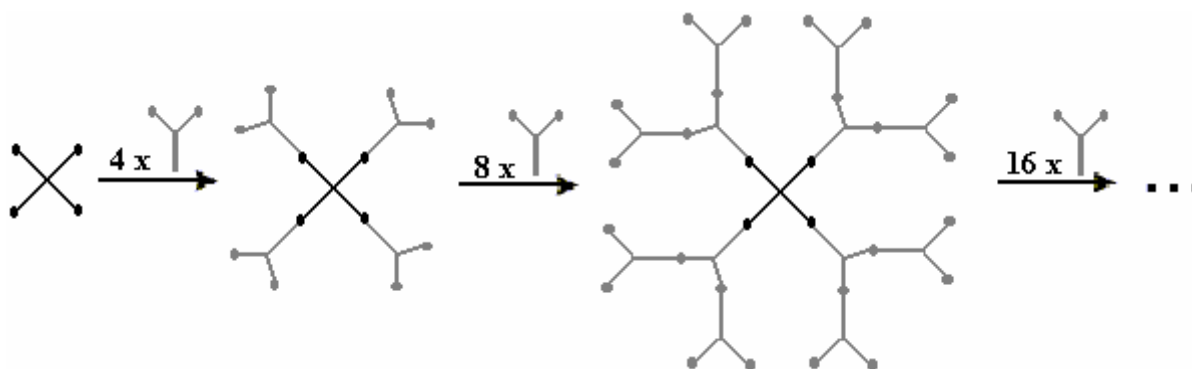
Os dendrímeros são preparados por uma síntese tridimensional repetitiva e bem controlada através de dois métodos: o método divergente e o método convergente. Essas técnicas permitem a formação de estruturas tridimensionais cujas ramificações estendem-se concentricamente, o que conduz a uma molécula altamente simétrica, hiper-ramificada e com elevado grau de funcionalização terminal. Além disso, a síntese repetitiva permite um controle do peso molecular e do tamanho, o que leva a formação de macromoléculas monodispersas [4-6].

#### **4.3.1 – Método divergente**

O método divergente foi desenvolvido por Vögtle em 1978, sendo considerado a primeira técnica a partir da qual foi possível sintetizar dendrímeros [7].

Este método envolve o crescimento de um núcleo central, onde as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas; ou seja, começa-se com o núcleo e vão se adicionando sucessivas camadas de monômeros até se obter o dendrímero desejado. Ele é caracterizado por reações que ocorrem por um aumento do número de sítios, como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora. As camadas externas passam a constituir a estrutura interna do dendrímero. Uma característica deste método é que há um rápido aumento do número de grupos terminais reativos. Entretanto, quanto mais a molécula cresce, maiores imperfeições e falhas ocorrem. Isto se deve ao fato de que reações incompletas dos grupos terminais podem ser observadas [1-7].

O procedimento geral da técnica divergente para a síntese de dendrímeros é ilustrado na Figura 4.4.

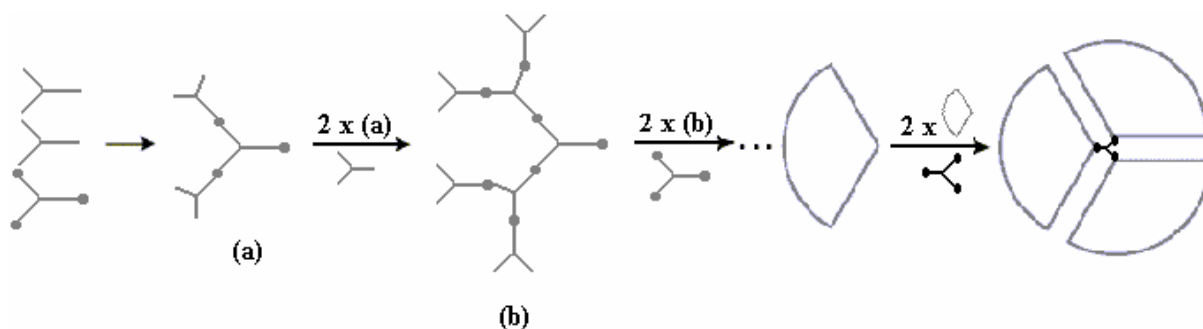


**Figura 4.4** – Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros. Fonte: referência [3].

Embora seja comumente utilizado para a obtenção de grandes quantidades de dendrímeros, o método de síntese divergente apresenta como principais inconvenientes às reações incompletas dos grupos terminais que introduzem defeitos na macromolécula. Para impedir a formação de defeitos, normalmente utiliza-se de grandes quantidades de precursores, o que dificulta a purificação do produto final.

### 4.3.2 – Método Convergente

De acordo com a referência [8], os pioneiros do método convergente foram Hawker e Fréchet. Essa síntese começa pelo que se tornará a periferia do dendrímero, ou seja, fazendo-se os ramos e só depois juntando-se o núcleo para produzir o dendrímero. O princípio básico do método convergente envolve a construção de pequenos fragmentos denominados dendrons que sofrem policondensação e constituem o núcleo central e, conseqüentemente, que evoluem para a formação final do dendrímero [1-7]. A Figura 4.5 ilustra o procedimento geral dessa técnica.



**Figura 4.5** – Representação esquemática de uma síntese dendrímica convergente. Fonte: referência [3].

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

#### 4.4 – Os dendrímeros e suas aplicações

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

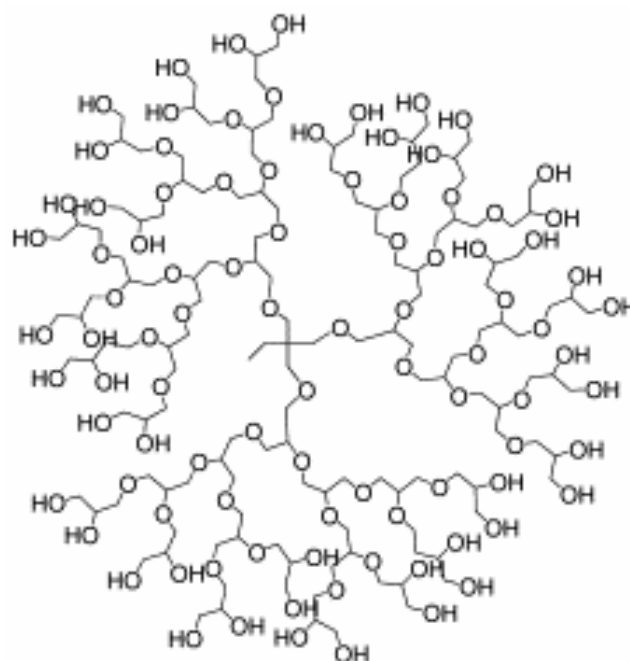
Dentre as aplicações de dendrímeros, pode-se citar, na indústria farmacêutica, o seu uso na cosmética. Existem empresas que utilizam compostos já conhecidos associados a dendrímeros de alta geração, de modo a maximizar a concentração local destes compostos sem aumentar a viscosidade da solução [2].

Na área médica, os dendrímeros são empregados como captadores seletivos e como transportadores macromoleculares [2]. São utilizados como captadores seletivos devido ao controle preciso que se consegue obter sobre o tamanho, funcionalidade e a flexibilidade de dendrímeros, sendo possível a construção de um dendrímero capaz de selecionar as moléculas de interesse com alta seletividade. E, como transportadores macromoleculares de drogas, os dendrímeros apresentam uma alta capacidade de entrega, baixa toxicidade e uma boa solubilidade aquosa.

O dendrímero poliglicerol super-ramificado, por exemplo, é utilizado no processo de encapsulamento e transporte de hospedeiros polares (tais como corantes e drogas) e, também, na criação de microambientes especiais no seu núcleo. Através desta arquitetura núcleo-casca, o transporte seletivo e a liberação dos hospedeiros encapsulados são possíveis tanto no meio hidrofílico quanto no meio hidrofóbico. Além disso, as nanocapsulas de poliglicerol super-ramificado podem ser empregadas como moldes para a preparação de nanopartículas de metais de transição. Desde que o complexo dendrímero-prata seja preparado em uma base cujo molde seja o dendrímero, observou-se que existe um sinergismo na atividade antimicrobiana após testes *in vitro* de várias bactérias. Se o dendrímero não penetrar através da membrana, essas nanocapsulas podem ser úteis para tratamento antibacteriano de queimaduras [11].

#### 4.5 – O poliglicerol dendrítico

O poliglicerol dendrítico (PGLD) pode ser preparado através de uma síntese bem controlada, ele é caracterizado pela combinação de uma arquitetura dendrítica bem definida, estável, compacta e por possuir elevada funcionalidade dos grupos terminais; o que leva a uma baixa dispersão do peso molecular. Ele é altamente solúvel em água e em solventes orgânicos polares e, em temperatura ambiente, ele é altamente viscoso. Além disso, o PGLD que possui uma baixa temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), apresenta também uma alta densidade de grupos hidroxilas (-OH) locais. Esses grupos funcionais podem ser modificados em uma segunda etapa sintética e usados como sítio para imobilização de compostos bioativos. Dessa forma, esses sistemas macromoleculares podem ser utilizados em aplicações biomédicas bastante interessantes como, por exemplo, no projeto de revestimentos com propriedades antitrombogênicas [9,11-15]. A Figura 4.6 ilustra o PGLD de geração 4 (G4).



**Figura 4.6** – Estrutura do poliglicerol dendrítico de geração 4 (PGLD G4). Fonte: referência [16].

#### 4.6 – Considerações parciais

Os dendrímeros têm se tornado um importante campo interdisciplinar na atual ciência dos polímeros. Afinal, a síntese de dendrímeros permite gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos e, devido a isso, essas macromoléculas são

conhecidas como proteínas artificiais. Por isso, as propriedades biológicas dos dendrímeros são de extrema importância para aplicações biomédicas.

Muitas aplicações potenciais de dendrímeros são baseadas em sua uniformidade molecular não paralela, superfície multifuncional e presença de cavidades internas. Essas propriedades específicas tornam os dendrímeros apropriados para uma variedade de alta tecnologia, incluindo aplicações biomédicas e industriais.

O poliglicerol dendrítico faz parte dessa classe de materiais versáteis e, por isso, apresenta um futuro promissor na área de aplicações biomédicas. Devido à presença de grupos hidroxilas periféricos, o dendrímero de PGLD pode ser aplicado como revestimentos biocompatíveis para minimizar a adsorção de proteínas do plasma sanguíneo humano. Ao mesmo tempo, podem promover a adsorção de HSA, uma proteína sérica que favorece as características hemocompatíveis das superfícies sintéticas. Obviamente, está intimamente ligado ao projeto de um biomaterial com propriedades específicas um ferramental analítico que, no caso de dendrímeros, torna-se necessário que a técnica analítica permita uma avaliação *in situ* do biomaterial em questão.

O capítulo seguinte abordará algumas técnicas espectroscópicas que são utilizadas tanto na análise química de estruturas orgânicas e inorgânicas como na análise da cinética de adsorção de proteínas sobre superfícies sintéticas.

#### 4.7 – Referências bibliográficas

- [1] Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chemical Reviews*. 99 (7): 1665-1688, 1999.
- [2] Disponível em <[www.ciencia.com-palavras.com/download/review-dendrimeros-Alexandre.pdf](http://www.ciencia.com-palavras.com/download/review-dendrimeros-Alexandre.pdf)>. Acesso em: 01 agosto 2006.
- [3] Klajnert, B.; Bryszewska, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*. 48 (1): 199-208, 2001.
- [4] Newkome, G.R.; Moorefield, C.N.; Vogtle, F. Dendrimers and dendrons: concepts, synthesis, applications. New York, *Wiley-VCH*, 2001.
- [5] Tomalia, D.A. Dendrimer molecules. *Scientific American*. 272 (5): 62-66, 1995.
- [6] Montanari, M.L.C.; Montanari, C.A.; Piló-Veloso, D. Sistemas transportadores de drogas. *Química Nova*. 21 (4): 470-476, 1998.
- [7] Vögtle, F.; Gestermann, S.; Hesse, R.; Schwierz, H.; Windisch, B. Functional dendrimers. *Progress in Polymer Science*. 25 (7): 987-1041, 2000.

- [8] Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (15): 2106-2129, 2005.
- [9] de Queiroz, A.A.A.; Abraham, G.A.; Román, J.S. Polyglycerol dendrimers: a new approach to design fibrinolytic coatings. *III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. 1, 184-184, 2004.
- [10] Vieira, N.C.S. Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). 2006.
- [11] Haag, R.; Frey, H. Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 90 (3): 257-267, 2002.
- [12] Fernandes, E.G.R.; de Queiroz, A.A.A.; Abraham, G.A.; Román, J.S. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 17 (2): 105-111, 2006.
- [13] de Queiroz, A.A.A.; Abraham, G.A.; Camillo, M.A.P.; Higa, O.Z.; Silva, G.S.; Fernández, M.D.M.; Román, J.S. Physicochemical and antimicrobial properties of boron-complexed polyglycerol-chitosan dendrimers. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*. 1-19, 2006.
- [14] Sunder, A.; Krämer, M.; Mülhaupt, R.; Frey, H. Molecular nanocapsules based on amphiphilic hyperbranched polyglycerols. *Angewandte Chemie*. 111 (23): 3758-3761, 1999.
- [15] Sunder, A.; Quincy, M.F.; Mülhaupt, R.; Frey, H. Hyperbranched polyether polyols with liquid crystalline properties. *Angewandte Chemie*. 111 (19): 3107-3110, 1999.
- [16] Ooya, T.; Huh, K.M.; Saitoh, M.; Tamiya, E.; Park, K. Self-assembly of cholesterol-hydrotropic dendrimer conjugates into micelle-like structure: preparation and hydrotropic solubilization of paclitaxel. *Science and Technology of Advanced Materials*. 6 (5): 452–456, 2005.

## Capítulo 5 – A Interação Radiação-Matéria como Ferramenta Analítica para o Estudo da Hemocompatibilidade

---

### 5.1 – Introdução

A espectroscopia é uma técnica que permite analisar tanto compostos inorgânicos quanto os orgânicos através da radiação eletromagnética. E, as análises resultantes da interação radiação-matéria fornecem dados sobre a estrutura da amostra, tais como a geometria de ligação, o comprimento das ligações químicas e os átomos que a constitui.

Dentre as técnicas de espectroscopia, será ressaltado as espectroscopias vibracional, de ressonância magnética nuclear e de ressonância de plásmons de superfície.

### 5.2 – Espectroscopia vibracional (FTIR)

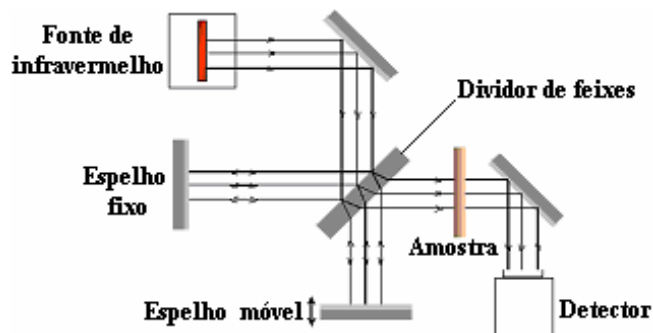
A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma poderosa ferramenta analítica usada para a detecção de espectros vibracionais e rotacionais de macromoléculas orgânicas [1,2]. Esta técnica se baseia no fato de que as ligações químicas das moléculas possuem frequências vibracionais específicas. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular e das massas dos átomos. Se as moléculas presentes na amostra interagirem com a radiação, esta radiação será absorvida. Para que uma vibração apareça no espectro FTIR, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração [3,4]. Essas vibrações moleculares são aproximadas pelo modelo do oscilador harmônico simples (OHS) e, a frequência fundamental da ligação é dada pela Lei de Hooke de acordo com a expressão (5.1):

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}}, \quad (5.1)$$

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



O sistema óptico, conhecido como espectrofotômetro FTIR, utilizado para quantificar os espectros vibracionais de uma molécula baseia-se no interferômetro de Michelson, conforme ilustrado na Figura 5.1. O interferômetro consiste em uma fonte de radiação na região espectral do infravermelho, um divisor de feixes, de espelhos e de um fotodetector. A luz proveniente da fonte de radiação, depois de colimada por um espelho, incide no divisor de feixes e é separada em dois feixes, que são novamente refletidos, um deles pelo espelho fixo e o outro pelo espelho móvel, em direção ao divisor de feixes. Quando estas duas partes se recombinam, ocorre uma interferência. O resultado desta interferência dependerá da diferença entre os caminhos ópticos percorridos por cada feixe, que é determinada pela distância dos espelhos móvel e fixo ao divisor de feixes. À medida que o caminho óptico varia, devido ao movimento do espelho, a intensidade da interferência também varia. Após a radiação passar pelo sistema ótico, ela é direcionada para a amostra e a luz transmitida pelo material é focalizada sobre um detector, onde é convertida em um sinal analógico. Um diagrama da intensidade da radiação em função da diferença de caminho óptico entre os espelhos móvel e fixo, é chamado de interferograma. O espectro infravermelho é obtido a partir da transformada de Fourier do interferograma.



**Figura 5.1** – Diagrama representativo do espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.

No interferômetro de Michelson, o padrão de interferência,  $I$ , é dado por [5]:

$$I = 2I_o [1 + \cos(kx)] \quad (5.2)$$

sendo  $k = 2\pi/\lambda$  o número de onda. Como há um intervalo contínuo de valores de  $k$  na fonte, o padrão de interferência pode ser interpretado como um grupo de intensidades por unidade de  $k$ ,  $I(k)$ , o que resulta em uma intensidade integrada sobre todos os números de onda:

$$I = \int_0^{\infty} I(k) dk = 2 \int_0^{\infty} I_o(k) dk + 2 \int_0^{\infty} I_o(k) \cos(kx) dk . \quad (5.3)$$

O primeiro termo da expressão (5.3) comporta-se como um termo de referência, enquanto o segundo termo é o de interferência. Flutuações na intensidade em torno do termo de referência compreendem a distribuição espectral em função da diferença de caminho óptico. Essas flutuações, chamada de interferograma, são dadas pela seguinte expressão matemática:

$$I(x) = \int_0^{\infty} I(k) \cos(kx) dk \quad (5.4)$$

que é a transformada de Fourier do espectrograma:

$$I(k) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} I(x) \cos(kx) dx . \quad (5.5)$$

A Figura 5.2 ilustra um modelo de um interferograma e seu respectivo espectro FTIR.

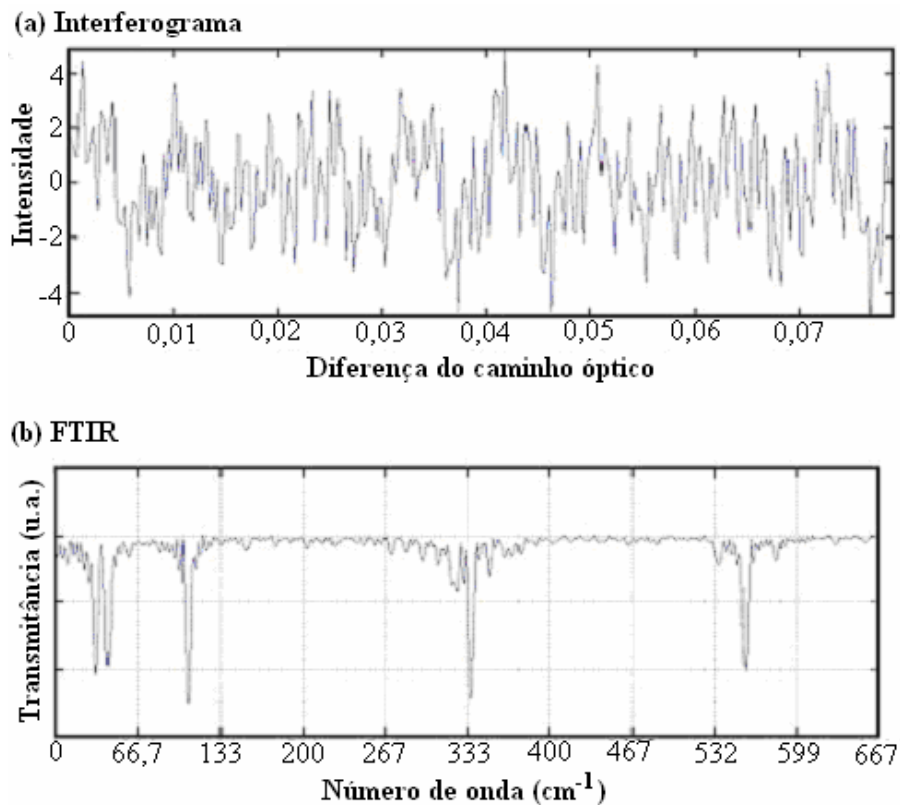


Figura 5.2 – (a) Amostra de um interferograma e, em (b), o seu respectivo espectrograma.

Portanto, como a espectroscopia vibracional permite obter informações a cerca da estrutura molecular do material que está sendo analisado, esta técnica será utilizada neste trabalho para caracterizar a presença dos grupos hidroxilas (-OH) terminais presentes no dendrímero PGLD.

### 5.3 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser considerada a técnica mais importante para a investigação a nível molecular, pois ela permite obter informações sobre a estrutura da amostra em qualquer estado da matéria [5,6]. Além do mais, como os átomos de carbono e hidrogênio aparecem abundantemente nos materiais orgânicos, a ressonância magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou prótons ( $^1\text{H}$ -RMN) é muito utilizada na caracterização desses materiais. A técnica se baseia no fato dos núcleos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  possuírem momentos magnéticos diferentes de zero. Os momentos magnéticos dos átomos podem se orientar em campos magnéticos sendo, esta orientação, dependente da energia dos núcleos bem como do campo magnético externo. Dessa forma, uma dada amostra vai apresentar absorção em vários valores de frequência, cada valor correspondendo a certo tipo de átomo ao qual está ligado o hidrogênio. Apesar da técnica de  $^{13}\text{C}$ -RMN ser mais informativa que a técnica de  $^1\text{H}$ -RMN, a análise por átomos de  $^1\text{H}$  é mais facilmente obtida do que a por átomos de  $^{13}\text{C}$ , pois, nos materiais orgânicos, os núcleos de hidrogênio são mais abundantes do que os núcleos de carbono [5,6].

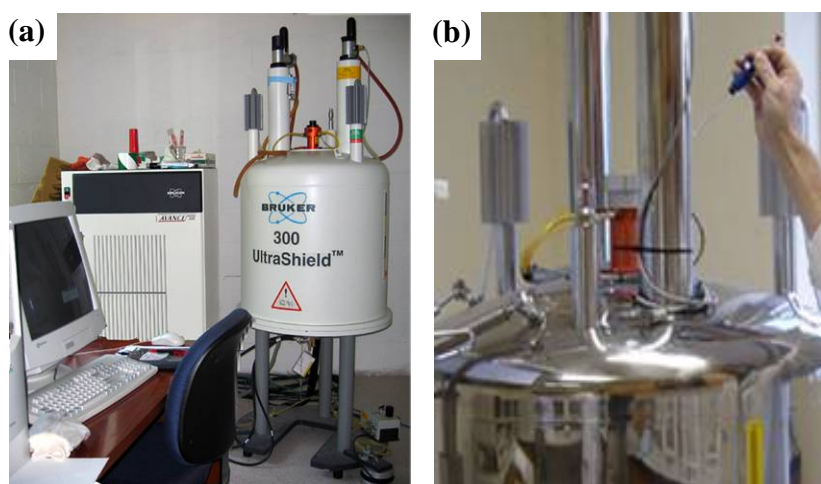
As seguintes informações podem ser obtidas num espectro de  $^1\text{H}$ -NMR:

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

Já a fórmula molecular, estrutural e espacial da molécula analisada pode ser determinada através da análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN associada com a análise de espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Portanto, assim como a espectroscopia vibracional, a espectroscopia de RMN também permite obter informações a cerca da estrutura molecular do material analisado, sendo possível identificar os carbonos secundários e terciários além dos grupos hidroxilas terminais presentes na estrutura dendrítica.

Neste trabalho, o dendrímero de poliglicerol foi caracterizado por espectroscopia de RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) e prótons ( $^1\text{H}$ -NMR) utilizando-se um equipamento Bruker 500 MHz do Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica” – ICTP/CSIC-Madri/Espanha, instituto este onde o orientador desta dissertação, prof. Alvaro A.A. de Queiroz é pesquisador visitante. A Figura 5.3 ilustra os equipamentos de RMN utilizados neste trabalho.



**Figura 5.3** – (a) Equipamento de RMN Bruker 300 MHz e (b) Bruker 500 MHz, ambos do ICTP/CSIC. Nota-se em (b) a introdução da amostra no equipamento de RMN.

#### 5.4 – Espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (RPS)

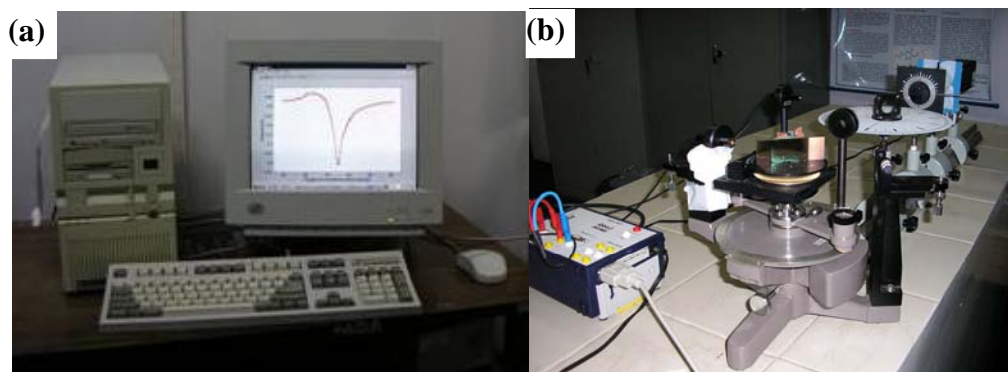
A espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (RPS) é uma ferramenta analítica que, além de ser muito explorada por diversos pesquisadores no desenvolvimento de sistemas de microscopia óptica, dispositivos ópticos e biosensores óticos, vem sendo utilizada para o estudo de interações biomoleculares e, conseqüentemente, para a caracterização de biomateriais.

As ondas de plásmons de superfície (OPS) são oscilações eletromagnéticas que encontram-se confinadas em uma interface metal-dielétrico e, por isso, suas características são fortemente dependentes dos parâmetros ópticos dos dois meios, bem como da estrutura da interface [7-10].

Esta interface metal-dielétrico é extremamente sensível a pequenas mudanças nas suas propriedades óticas durante um processo de adsorção protéica sobre um material sintético, o que confere a técnica RPS uma sensibilidade em escala nanométrica e a possibilidade de se estudar *in situ* a fenomenologia da adsorção protéica.

Como a adsorção protéica é um fenômeno de interface, a espectroscopia RPS demonstra ser uma técnica muito interessante para o estudo das características de hemocompatibilidade de sistemas macromoleculares arborescentes. Por isso, neste trabalho, esta técnica será utilizada para se estudar e entender os processos de adsorção de albumina e fibrinogênio sobre a superfície do PGLD.

Neste trabalho, o filme de ouro evaporado sobre a superfície de vidro, o dendrímero de poliglicerol adsorvido sobre o filme de ouro e as proteínas séricas adsorvidas sobre o filme de PGLD foram caracterizados por espectroscopia de RPS através do aparato experimental montado no laboratório de Biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (Figura 5.4).



**Figura 5.4** – Em (a) tem-se a fotografia do computador utilizado para a aquisição de dados e, em (b), o equipamento de RPS montado no laboratório de Biomateriais da UNIFEI.

### 5.5 – Considerações parciais

O efeito da interação da radiação eletromagnética com a matéria é um dos meios mais poderosos para se obter informações sobre a estrutura microscópica da matéria. Por exemplo, a espectroscopia vibracional e a de RMN permitem obter informações a cerca da caracterização e comprovação da estrutura do material a ser utilizado no revestimento de

dispositivos biomédicos. A espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície está atualmente sendo utilizada no preparo de biossensores para análise de interações biomoleculares. A técnica RPS permite quantificar adsorções de materiais biológicos ou sintéticos sobre superfícies poliméricas através de variações diminutas nas propriedades óticas da interface entre um metal e um meio dielétrico. Uma vez que esta dissertação utilizará essencialmente a RPS como ferramenta analítica para o estudo das propriedades biocompatíveis do dendrímero PGLD, o próximo capítulo abordará minuciosamente os princípios físicos e as principais aplicações biotecnológicas da técnica RPS.

## 5.6 – Referências bibliográficas

- [1] Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy)>. Acesso em: 12 dezembro 2006.
- [2] Coates, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 12, 10815-10837, 2000.
- [3] Tager, A. Physical chemistry of polymers. *Moscow, Mir Publishers*. p.130-34, 1972.
- [4] Alcantara, P. Espectroscopia molecular. *Universidade Federal do Pará (UFPA)*. Curso de Física Moderna II. 2002.
- [5] Disponível em <<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>>. Acesso em: 12 dezembro 2006).
- [6] Akitt, J.W.; Mann, B.E. NMR and Chemistry. *Stanley Thornes*. 265-273, 2000.
- [7] Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B*. 54 (1): 3-15, 1999.
- [8] Zayats, A. V.; Smolyaninov, I. I.; Maradudin, A. A. Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Physics Reports*. 408 (3-4): 131-314; 2005.
- [9] Jackson, J. D. Classical Electrodynamics. *New York: John Wiley*. 641 p., 1963.
- [10] Roy, D. Optical characterization of multi-layer thin films using the surface plasmon resonance method: a six-phase model based on the Kretschmann formalism. *Optics Communications*. 200 (1-6): 119-130, 2001.

## Capítulo 6 – Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície

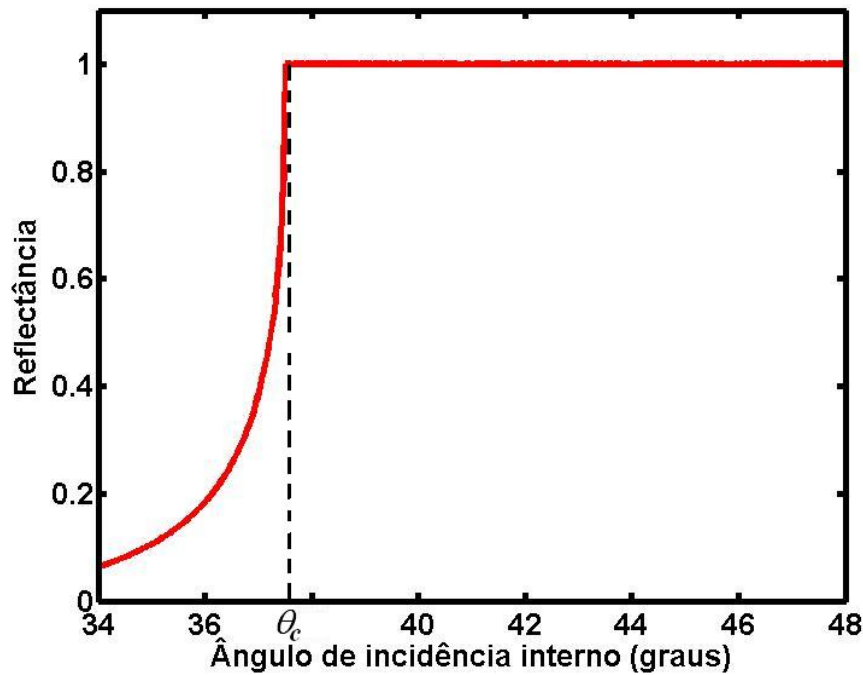
---

### 6.1 – Reflexão interna total

Quando um feixe de luz propagando através de um meio com alto índice de refração,  $n_1$  (prisma de vidro ou quartzo) encontra uma interface com um segundo meio que apresenta baixo índice de refração,  $n_2$ , o feixe de luz será totalmente refletido internamente para todos os ângulos incidentes maiores que um ângulo crítico,  $\theta_c$  (Figura 6.1):

$$\theta_c = \arcsen\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (6.1)$$

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



**Figura 6.1** – Comportamento da reflectância em função do ângulo de incidência para uma interface prisma-ar. O ângulo crítico para o qual acontece o fenômeno RIT está representado pela linha tracejada.

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

$$I(z) = I_o e^{-z/d} \quad (6.2)$$

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

$$d = \left( \frac{\lambda_o}{4\pi} \right) [n_1^2 \text{sen}^2(\theta) - n_2^2], \quad (6.3)$$

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

$$I_o^{//} = \frac{I^{//} \{4 \cos^2(\theta) [2 \text{sen}^2(\theta) - n^2]\}}{n^4 \cos(\theta) + \text{sen}^2(\theta) - n^2}. \quad (6.4)$$

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

$$I_o^\perp = \frac{I^\perp \{4 \cos^2(\theta)\}}{1 - n^2}. \quad (6.5)$$



As grandezas  $I^{\parallel}$  e  $I^{\perp}$  são as intensidades dos feixes de luz incidente polarizados paralelamente e perpendicularmente ao plano da interface, respectivamente, e  $n = \left(\frac{n_2}{n_1}\right) < 1$ .

Portanto, as duas maiores características de ondas evanescentes são:

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

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

## 6.2 – Princípios físicos da Ressonância de Plásmon

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

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

A condição de ressonância associada à excitação de PS implica que, sob condições ideais de acoplamento, toda a energia do feixe de luz incidente na superfície metálica é transferida para a oscilação (Figura 6.4(b)). Sendo essa uma onda confinada à interface metálica, isso implica que toda a energia inicialmente contida no feixe de luz incidente fica confinada a uma distância de aproximadamente um comprimento de onda, em relação à superfície. Essa característica traz conseqüências interessantes. Uma delas é o grande aumento na amplitude de campo elétrico na superfície em relação à amplitude de campo do feixe de luz incidente. Uma segunda conseqüência é a alta sensibilidade do efeito a variações diminutas nas propriedades óticas na vizinhança da interface metálica. Essas propriedades têm sido

frequentemente exploradas por diversos pesquisadores no desenvolvimento de sistemas de microscopia óptica, dispositivos ópticos e biosensores óticos.

### **6.2.1 – Métodos Práticos de Excitação de Plásmom de Superfície**

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

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

### **6.2.2 – Configuração de Kretschmann [6]**

A configuração de Kretschmann é composta de um prisma de vidro com uma das faces em contato óptico com um filme fino metálico. A estrutura do filme define duas interfaces, ou seja, a interface prisma-metal e metal-ar, como mostrado na Figura 6.2. Essa configuração permite a determinação das constantes ópticas e espessura de filmes metálicos cuja espessura é da ordem de algumas dezenas de nanômetros.

Normalmente o filme metálico, utilizado nesse tipo de configuração não é depositado diretamente na face do prisma, para evitar danos à superfície. Substratos de vidro são utilizados para a deposição dos filmes e um líquido casador de índices de refração é

empregado na região de ar formada entre substrato e prisma, para evitar reflexão interna total devido a não uniformidade das duas superfícies.

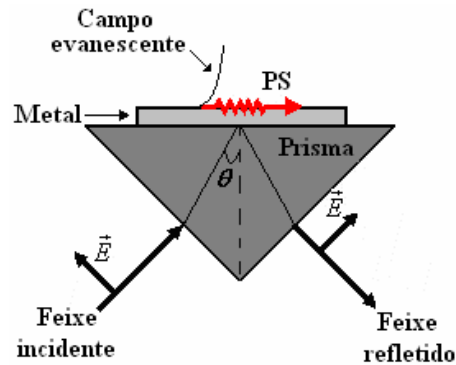


Figura 6.2 – Configuração de Kretschmann para excitação de PS.

### 6.2.3 – Configuração de Otto

A configuração de Otto para o acoplamento de luz ao PS utiliza o esquema ilustrado na Figura 6.3. Como pode ser observado, a superfície metálica fica posicionada a uma certa distância da face do prisma. Para que haja possibilidade de acoplamento de um feixe de luz iluminando a base do prisma é necessário que o meio de separação tenha índice de refração inferior àquele do prisma, permitindo assim que se atinja a condição de reflexão interna total necessária ao acoplamento da luz com o PS.

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

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

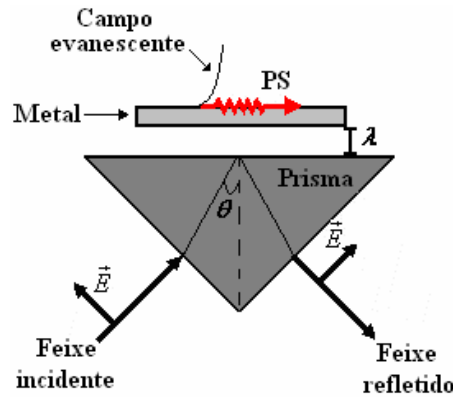


Figura 6.3 – Configuração de Otto para excitação de PS.

### 6.2.4 – Aspectos físicos da configuração de Krestchmann

Plásmons de Superfície (PS) em uma superfície plana metálica são modos eletromagnéticos não radiativos e, como tal, não podem ser excitados pela iluminação direta da superfície [7]. Uma forma possível de excitar PS em uma interface plana é a partir de um prisma de acoplamento, com uma das faces coberta com um filme metálico de espessura apropriada, de forma que um feixe de luz injetado em uma segunda face do prisma seja refletido na face metalizada, sob condição de reflexão interna total. Para uma determinada faixa de ângulos de incidência, acima da condição de reflexão interna total, parte da luz refletida é absorvida pelo PS (Figura 6.4).

A configuração mais popular é a configuração proposta por Krestchmann em 1971, na qual a onda eletromagnética proveniente da fonte de laser é acoplada aos PS por meio de um prisma de vidro (Figura 6.4). Nesta configuração, a relação de dispersão dos PS é obtida resolvendo-se as equações de Maxwell em cada meio e as suas respectivas condições de contorno, como apresentado no Apêndice A, e é matematicamente descrita por:

$$k_{PS} = \left( \frac{\omega}{c} \right) \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}}, \tag{6.6}$$

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

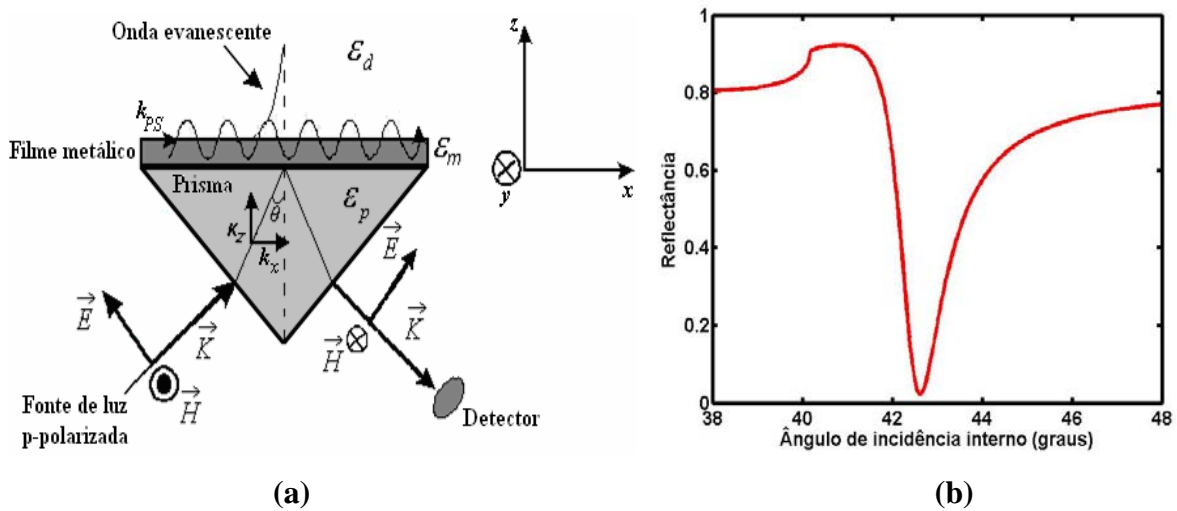
Através de uma relação trigonométrica elementar a componente  $x$  do vetor de onda proveniente da radiação incidente pode ser obtida como dado pela equação (6.7):

$$k_x = \left(\frac{\omega}{c}\right) \sqrt{\epsilon_d} \sin \theta, \tag{6.7}$$

sendo  $\theta$  o ângulo da radiação incidente e  $\epsilon_p$  é a constante dielétrica do prisma. Quando o vetor de onda da radiação incidente for de igual magnitude do vetor de onda ( $k_{PS}$ ) dos PS ocorre o fenômeno de RPS (Figura 6.4(b)). Matematicamente, descrito por:

$$\theta_R = \arcsen \left( \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{(\epsilon_d + \epsilon_m) \epsilon_d}} \right), \tag{6.8}$$

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

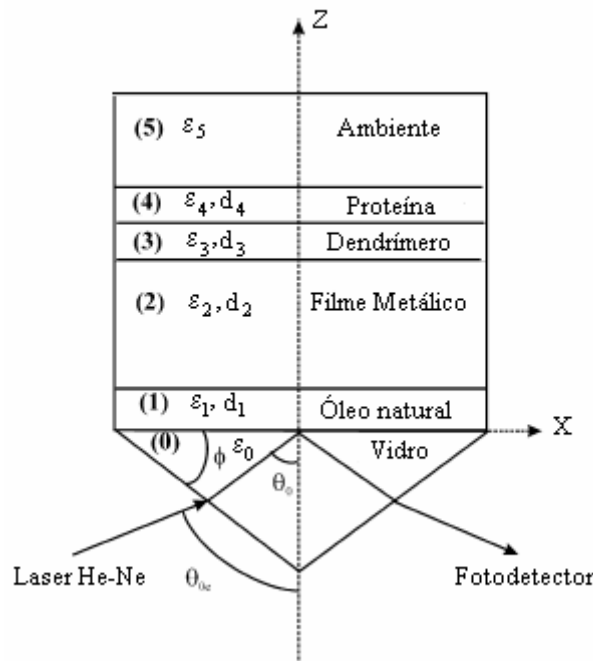


**Figura 6.4** – (a) Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma-metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que  $k_{PS} = k_x$ . (b) Espectro RPS característico para uma interface prisma-metal e metal-ar.

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

A estrutura geométrica considerada está ilustrada na Figura 6.5, sendo composta dos meios (0), (1), (2), (3), (4) e (5) que correspondem, respectivamente, as camadas de vidro, óleo natural com índice de refração próximo ao do vidro, filme metálico (Au, Ag, Cr),

dendrímero (PGLD), proteína e o ambiente. A propagação do feixe de luz monocromático plano-polarizado no sistema de multicamadas é descrito através do sistema cartesiano como mostrado na Figura 6.5. Os feixes de luz incidente e refletido estão contidos no plano  $xz$ , sendo  $\phi$  o ângulo da base do prisma. O ângulo de incidência externo,  $\theta_e$ , está relacionado com o ângulo de incidência interno,  $\theta_o$ , do prisma por  $\theta_e = \phi + \arcsen\left[\sqrt{\varepsilon_o} \sen(\theta_o - \phi)\right]$ . A constante dielétrica ( $\varepsilon_j$ ) e a espessura ( $d_j$ ,  $j=0,1,2,3,4,5$ ) de cada camada estão indicadas na Figura 6.5.



**Figura 6.5** – Diagrama representativo da estrutura de seis camadas para a estimativa dos parâmetros óticos de filmes ultrafinos utilizando a configuração de Kretschmann (Adaptado da referência [4]).

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

$$R(012345) \approx \left| r_{02}^o \right| \left[ 1 - \frac{4K_0'' K_1''}{\left[ (k_x - K')^2 + K''^2 \right]} \right], \tag{6.9}$$

com

$$k_x = \tilde{\omega} \sqrt{\varepsilon_o} \text{sen}(\theta_o), \quad (6.10)$$

$$r_{02}^o = \frac{\varepsilon_2 k_{0x} - \varepsilon_0 k_{2x}}{\varepsilon_2 k_{0x} + \varepsilon_0 k_{2x}}, \quad (6.11)$$

$$k_{mz} = \sqrt{\tilde{\omega}^2 \varepsilon_m - k_o^x}, \text{ para } m = 0, 2, \text{ e} \quad (6.11(a))$$

$$k_o^x = \tilde{\omega} \left( \frac{\varepsilon_2 \varepsilon_4}{\varepsilon_2 + \varepsilon_4} \right)^{1/2}. \quad (6.11(b))$$

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

$$K = K' + iK'' = k_x^o + \Delta k_x^{(2)} + \Delta k_x^{(3)} + \Delta k_x^{(4)}, \quad (6.12)$$

com

$$\Delta k_x^{(2)} = \frac{2\tilde{\omega} r_{02}^o}{|\varepsilon_2'| + \varepsilon_4} \left( \frac{|\varepsilon_2'| \varepsilon_4}{|\varepsilon_2'| - \varepsilon_4} \right)^{3/2} \exp(\alpha), \quad (6.13)$$

$$\alpha = \frac{-2\tilde{\omega} d_2 |\varepsilon_2'|}{\left( |\varepsilon_2'| - \varepsilon_5 \right)^{1/2}}, \quad (6.13(a))$$

$$\Delta k_x^{(3)} = \frac{i(\tilde{\omega}^2 d_3)(\varepsilon_2 - \varepsilon_3)(\varepsilon_3 - \varepsilon_5)}{\rho_{25} \varepsilon_3}, \quad (6.14)$$

$$\Delta k_x^{(4)} = \frac{i(\tilde{\omega}^2 d_4)(\varepsilon_2 - \varepsilon_5)(\varepsilon_3 - \varepsilon_5)}{\rho_{25} \varepsilon_4} \text{ e} \quad (6.15)$$

$$\rho_{25} = \frac{(\varepsilon_2^2 - \varepsilon_5^2)(\varepsilon_2 + \varepsilon_5)}{(\varepsilon_2 \varepsilon_5)^{3/2}}. \quad (6.16)$$

Sendo  $K''$  o vetor de onda correspondente as perdas associadas à dissipação de energia no metal e da radiação dos PS de volta para o meio 0;  $K'$  a componente paralela do vetor de

onda dos PS;  $k_o^x$  o vetor de onda complexo dos PS na interface metal-ambiente na ausência do prisma;  $\Delta k_x^{(2)}$ ,  $\Delta k_x^{(3)}$  e  $\Delta k_x^{(4)}$  representam a correção devido as perturbações causadas por todas as demais camadas entre a interface primária dos meios 2 e 5. Os símbolos ' e '' representam as partes real e imaginária das quantidades em questão.

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

$$k_o'^x = \tilde{\omega} \left( \frac{\varepsilon_2 \varepsilon_5}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right)^{1/2} \quad (6.17)$$

e

$$k_o''^x = k_o'^x \frac{\varepsilon_2'' \varepsilon_5''}{2\varepsilon_2' (\varepsilon_2' + \varepsilon_5')}. \quad (6.18)$$

Como mostrado por Chen e Chen [8], em uma aproximação Lorentziana, o vetor de onda complexo dos PS,  $K$ , pode ser descrito na forma:

$$K = K_o + K_1, \quad (6.19)$$

com

$$K_o = K_o' + iK_o'' = k_o^x + \Delta k_x^{(3)} + \Delta k_x^{(4)} \quad (6.20)$$

e

$$K_1 = K_1' + iK_1'' = \Delta k_x^{(2)}. \quad (6.21)$$

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

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



$$R_{min}(12345) \approx |r_{02}^o|^2 \left[ 1 - \frac{4\eta}{(\eta+1)^2} \right], \quad (6.22)$$

com,

$$\eta = \frac{K_o''}{K_1''} \quad (6.23)$$

definido como o coeficiente de acoplamento dos PS conforme descrito por [8]. Para um ângulo de incidência tal que  $k_x = K' \pm |K''|$ , obtêm-se:

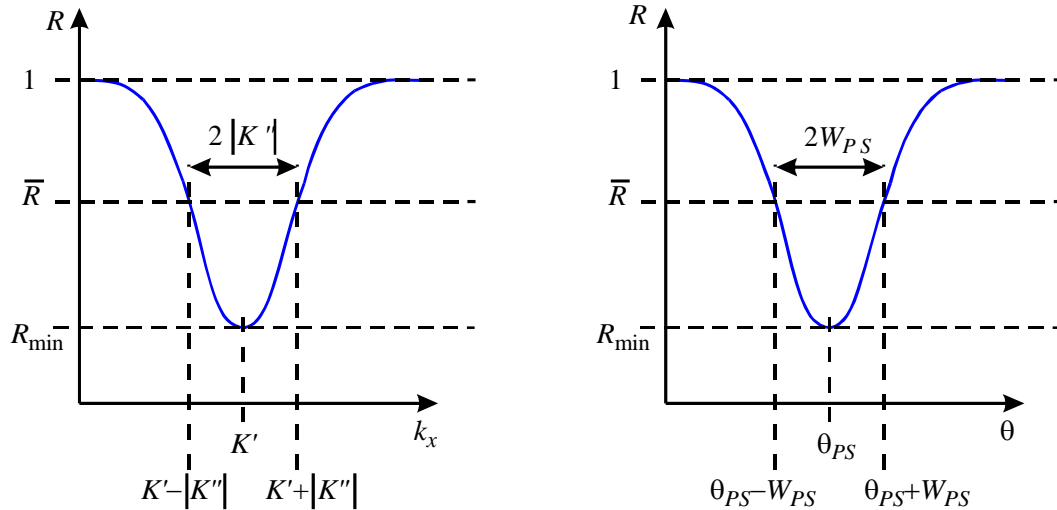
$$R = \bar{R} = |r_{02}^o|^2 \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{4K_o''K_1''}{K''^2} \right]. \quad (6.24)$$

Substituindo a equação (6.22) em (6.24), o parâmetro  $\bar{R}$  pode ser expresso como:

$$\bar{R} = \frac{1}{2}(1 + R_{min}). \quad (6.25)$$

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

A Figura 6.6(a) apresenta a curva de ressonância representada no espaço  $k_x$ , já em (b), a dependência angular da reflectância.



**Figura 6.6** – (a) Curva de ressonância representada no espaço  $k_x$ , (b) dependência angular da reflectância.

Observa-se, a partir das relações acima e da Figura 6.6(a), que a largura da linha de ressonância é dada por  $2|K''|$  e, portanto, o parâmetro  $|K''|$  representa a meia largura de linha da ressonância como já havia sido descrito [4,8]. A Figura 6.6(b) mostra a representação típica da reflectância obtida em experimentos de RPS. Esta é geralmente representada como função do ângulo de incidência. O mínimo da ressonância ocorre no ângulo  $\theta_{PS}$  e a largura de linha angular, medida entre os pontos de inflexão da curva, é dada por  $2W_{PS}$ , com  $W_{PS}$  representando a meia largura.

Uma comparação direta das curvas mostradas na Figura 6.6 permite estabelecer a correspondência entre os parâmetros referentes ao vetor de onda do PS e as variáveis angulares. Com base na equação (6.10), obtém-se a seguinte relação:

$$K' = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon_o} \sin \theta_{PS}. \quad (6.26)$$

Dessa última expressão, considerando-se o caso em que  $2W_{PS} \ll \theta_{PS}$ , a meia largura angular da curva da Figura 6.7(b) fica diretamente relacionada ao parâmetro  $|K''|$  pela expressão:

$$|K''| \approx \frac{2\pi\sqrt{\epsilon_o}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS}. \quad (6.27)$$

Neste caso, utilizou-se a aproximação  $\text{sen}(\theta_{PS} + W_{PS}) - \text{sen}(\theta_{PS} - W_{PS}) \approx 2W_{PS} \cos(\theta_{PS})$ , válida para  $2W_{PS} \ll \theta_{PS}$ . É importante salientar que a equação (6.27) corrige um erro obtido pelos autores da referência [8] e corrigido por Fontana [9].

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

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

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

$$K_o = K_o' + iK_o'' = k_o^x. \quad (6.28)$$

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

1. Uma vez que o efeito dominante da espessura finita do filme é aumentar o grau de perdas do sistema e tendo esse efeito pouca influência na estimativa da condição de ressonância, as equações (6.17) e (6.26) podem ser utilizadas para obtenção da estimativa inicial do parâmetro  $\varepsilon_2'$ :

$$\varepsilon_2' = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_5 [\text{sen}(\theta_{PS})]^2}{\varepsilon_0 [\text{sen}(\theta_{PS})]^2 - \varepsilon_5}. \quad (6.29)$$

2. Para estimar os valores de espessura e parte imaginária da permissividade do filme metálico, determinam-se inicialmente as duas soluções para o coeficiente de

acoplamento, a partir do parâmetro  $R_{min}$ . Essas são as soluções, diretamente obtidas da equação de segundo grau correspondente à equação (6.22), ou seja,

$$\eta_{a,b} = \frac{|r_{02}^o|^2}{1 - R_{min}} \left[ (1 + R_{min}) \pm 2\sqrt{R_{min}} \right]. \quad (6.30)$$

3. Para calcular a relação entre os amortecimentos intrínseco e da radiação com as variáveis angulares ( $\theta_{PS}, W_{SP}$ ) faz uso da parte imaginária da equação (6.19) junto com as equações (6.23) e (6.27). Assim,

$$K_0'' = \frac{\eta}{\eta + 1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS} \quad (6.31)$$

e

$$K_1'' = \frac{1}{\eta + 1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS}. \quad (6.32)$$

Ressalta-se que existem duas soluções para cada uma das duas expressões anteriores dada pela equação 6.30. Esta ambigüidade na obtenção do coeficiente de acoplamento dos PS foi primeiro atacado por Chen e Chen [8] que sugeriram que uma forma para se contornar essa ambigüidade seria realizar duas medidas em comprimentos de onda distintos. Sob essas condições, sugerem os autores, a espessura deveria ser a mesma em ambas as medidas, e a solução correta do problema poderia ser obtida. No entanto, Robertson e Fullerton [10] também discutiram este problema considerando esta questão do ponto de vista das perdas de dissipação do metal e chegaram à conclusão de que era necessário uma terceira medição em um terceiro comprimento de onda para levantar a ambigüidade no valor da espessura. Ao realizar estes experimentos os autores chegaram à conclusão que a solução **a** era a solução correta para o problema. Contudo Fontana e Neto [11], baseados nestes relatos, chegaram a conclusão de que medidas de apenas um único comprimento de onda é suficiente para a obtenção dos parâmetros do filme desde que a faixa angular de medição seja maior do que aquela em que ocorre o efeito de ressonância.

Tomando a parte imaginária da equação (6.28) e inserindo as expressões (6.18) e (6.31) a parte imaginária da permissividade complexa do filme metálico fica descrita como:

$$\varepsilon_2'' = \frac{2\varepsilon_2'(\varepsilon_2' + \varepsilon_5)}{K_0'\varepsilon_5} \frac{\eta}{\eta+1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos(\theta_{PS}). \quad (6.33)$$

Combinando a parte imaginária da expressão (6.13) em conjunto com o parâmetro obtido na equação (6.32), a espessura do filme metálico pode ser explicitada na seguinte forma:

$$d_2 = \frac{\lambda}{4\pi} \frac{(|\varepsilon_2'| - \varepsilon_5)^{1/2}}{|\varepsilon_2'|} \ln \left\{ \frac{(\eta+1)\lambda}{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}W_{PS}\cos\theta_{PS}} \left| \operatorname{Im} \left[ K_0 \left( \frac{2}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right) \left( \frac{\varepsilon_2\varepsilon_5}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right)^{3/2} \right] \right| \right\}. \quad (6.34)$$

As equações (6.29), (6.33) e (6.34), com o auxílio da equação (6.30), são as expressões que serão utilizadas na estimativa inicial da espessura e permissividade complexa do filmes metálicos, necessários para a implementação do algoritmo de ajuste de curvas descrito na seção (8.6).

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

No presente formalismo, a espessura da camada protéica adsorvida sobre o filme metálico foi explicitada combinando a parte imaginária da expressão (6.20) junto com a equação (6.31):

$$d_4(\theta_{PS}, R_{min}, W_{PS}) = \left[ K_0''(\eta) - (k_o''^x + \Delta k_x''^{(3)}) \right] \cdot \delta, \quad (6.35)$$

com

$$\delta = \operatorname{Im} \left[ \frac{\varepsilon_3 \rho_{25}}{i\tilde{\omega}^2 (\varepsilon_2 - \varepsilon_4)(\varepsilon_3 - \varepsilon_4)} \right] \quad (6.35(a))$$

e

$$\eta = \left[ \frac{\left( |r_{02}^o|^2 + R_{min} \right) + 2|r_{02}^o| \sqrt{R_{min}}}{|r_{02}^o|^2 - R_{min}} \right]. \quad (6.36)$$

Para calcular a camada dendrítica adsorvida sobre o filme de ouro basta apenas negligenciar o parâmetro  $\Delta k_x^{(3)}$  e trocar  $d_3$  e  $\varepsilon_3$  por  $d_4$  e  $\varepsilon_4$ , respectivamente. Note que esta nova expressão para calcular a espessura das camadas (3) e (4) depende de todas as variáveis angulares da curva de ressonância. Além disso, através deste formalismo proposto não é necessário uma curva de referência para estimar a espessura destas camadas ao contrário dos modelos vigentes na literatura [12]. As variáveis angulares podem ser obtidas através de um procedimento numérico iterativo conforme será apresentado na seção (8.6).

É necessário salientar que para um sistema de quatro ou cinco interfaces não é possível obter separadamente a espessura e a constante dielétrica da camada a ser analisada. Neste caso, o índice de refração do dendrímero PGLD e das proteínas serão inicializadas no algoritmo apresentado na seção (8.6) com os valores obtidos experimentalmente através de um refratômetro de Abbe. A partir do índice de refração e da relação de Lorentz-Lorenz, dada pela equação (6.37), pode-se estimar o valor da constante dielétrica tanto do dendrímero quanto das proteínas considerando-os como substâncias semi-polares.

$$\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}. \quad (6.37)$$

Além disso, será utilizado o método das correções diferenciais, apresentado no Apêndice B, para minimizar o erro quadrático médio entre as curvas teórica e experimental a fim de se obter a estimativa mais precisa do filme dendrítico adsorvido na superfície do metal e das proteínas adsorvidas na superfície deste filme.

## 6.6 – Aplicações da espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície

### 6.6.1 – Caracterização de propriedades ópticas e estruturais de filmes finos

Kretschmann [13] em 1972 investigou a dependência angular da luz espalhada de filmes finos ligeiramente rugosos sob condição de excitação ressonante de PS. A característica de alta intensidade de campo, associada à oscilação, foi utilizada para detectar, com relativa facilidade, a distribuição de luz espalhada e a partir daí inferir valores aproximados para as dimensões típicas das irregularidades nas superfícies estudadas. No

entanto, o modelo teórico que utilizava uma aproximação em primeira ordem para o efeito das irregularidades não podia explicar satisfatoriamente as dependências angulares da luz espalhada e da reflexão especular da superfície.

A partir dos resultados de Kretschmann [13], vários trabalhos foram então desenvolvidos com o objetivo de utilização de RPS na determinação de rugosidade de filmes metálicos, podendo-se destacar aqueles de Braundmeier and Tomascheke [14] (1975), Simon e Guha [15] (1976), no aspecto experimental e no aspecto teórico, os trabalhos de Toigo e outros [16]; e Fontana e Pantell [17], no desenvolvimento de formulação teórica para modelar a influência da rugosidade na dispersão de plásmons de superfície.

Chen e Chen [8] em 1991 analisaram o problema de determinação simultânea das constantes ópticas e espessura de filmes finos a partir de experimentos de RPS na configuração de Kretschmann, e desenvolveram um modelo teórico, a partir do qual esses parâmetros poderiam ser determinados através de um procedimento de ajuste numérico. Fontana [21], utilizando os princípios delineados nas referências [8] e [17], desenvolveu o protótipo de um sistema óptico operando no comprimento de onda de 670 nanômetros com o objetivo de determinar simultaneamente espessura, constantes ópticas e parâmetros de rugosidade de superfícies de filmes de ouro e prata. Observações das topografias das superfícies, com o emprego de um microscópio de força atômica, confirmaram os valores das dimensões típicas de irregularidades medidas pelo sistema óptico [22].

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

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

Quando uma camada de antígenos é formada na superfície metálica, e exposta a um fluido biológico contendo o anticorpo correspondente, ocorre uma reação imunológica altamente específica na superfície. O efeito resultante dessa reação é o crescimento de um filme orgânico que afeta a condição de ressonância e que pode ser detectado com alta

sensibilidade pelas variações do sinal refletido da superfície. Esse foi o princípio básico proposto por Liedberg e outros [23] e Flanagan e Pantell [24] no início da década de 80 para o desenvolvimento de uma nova classe de sistemas ópticos que possibilitassem não só a detecção de reações imunológicas sem o emprego de marcadores fluorescentes ou radioativos, como também a possibilidade de uso da técnica para a caracterização em tempo real da reação. Esse último aspecto é de vital importância, uma vez que a caracterização da cinética da reação é uma ferramenta frequentemente utilizada para a otimização dos processos de sintetização, em laboratório, de reagentes biológicos e de novas drogas na indústria farmacêutica.

A partir dos trabalhos contidos nas referências [23] e [24] teve início uma intensa investigação por diversos grupos de pesquisa para o aprimoramento da técnica e otimização da interface metal-filme orgânico. Este aprimoramento permitiu a eliminação do efeito de componentes não específicos da reação e melhoria do limite de detecção, o que possibilitou o emprego de RPS na detecção específica de macromoléculas em uma mistura biológica mais complexa. Como fruto dessa intensa investigação, foi lançado em 1990 o primeiro sistema comercial de tempo real para caracterização de reações imunológicas, baseado em RPS. O sistema batizado com a sigla BIACORE, foi desenvolvido por pesquisadores da multinacional Pharmacia, com um investimento estimado da ordem de US\$ 1 bilhão.

Uma tendência natural que surgiu a partir do fenômeno de RPS para análises de interações biomoleculares foi à possibilidade de miniaturização do elemento óptico responsável pelo acoplamento entre luz polarizada e o filme metálico. Em 1989 [21] foram propostas duas configurações em fibra óptica capazes de permitir a excitação de PS em filmes metálicos. Nessas configurações o papel do prisma de acoplamento, convencionalmente utilizado em experimentos de RPS, seria desempenhado pela fibra óptica, cujas propriedades de guiamento óptico sob condição de reflexão interna total são equivalentes àsquelas do prisma.

Dentre os diversos trabalhos podem-se citar aqueles de Fontana [21,25,26] no desenvolvimento teórico e experimental de uma fibra monomodo tendo uma das extremidades cortada em um ângulo particular, na qual o filme metálico deveria ser depositado.

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

## 6.7 – Considerações Parciais



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

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

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

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

## 6.8 – Referências bibliográficas

- [1] Carvalho Gomes, P. A. SPR as a tool in the functional analysis of an immunodominant site in FMDV. *Tese de Doutorado*. Universidade de Barcelona, 2000.
- [2] Zayats, A. V.; Smolyaninov, I. I.; Maradudin, A. A. Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Physics Reports*. 408 (3-4): 131-314; 2005.
- [3] Jackson, J. D. Classical Electrodynamics. *New York: John Wiley*. 1963; 641 p.
- [4] Roy, D. Optical characterization of multi-layer thin films using the surface plasmon resonance method: a six-phase model based on the Kretschmann formalism. *Optics Communications*. 200 (1-6): 119-130, 2001.
- [5] Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B*. 54 (1-2): 3-15, 1999.
- [6] Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*. 241(4): 313-324, 1971.
- [7] Disponível em: <<http://physics.mtsu.edu/~wmr/wmr.html>>. Acesso em 01 dezembro 2006.

- [8] Chen, W. P.; Chen, J. M. Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films. *Journal of the Optical Society of America A*. 71: 189-191, 1981.
- [9] Fontana, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*. 45 (29): 7632-7642, 2006.
- [10] Robertson, W. M.; Fullerton, E. Reexamination of the surface-plasma-wave technique for determining the dielectric constant and thickness of metal films. *Journal of the Optical Society of America B*. 6 (8): 1584-1589, 1989.
- [11] Fontana, E.; Neto, J. O. M. Sobre a ambigüidade na determinação de parâmetros de filmes finos em experimentos de RPS. *IX Simpósio Brasileiro de Microondas e Optoeletrônica (João Pessoa, Brasil)*, 2000.
- [12] de Bruijin, H. E.; Altenburg, B. S. F. Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using Surface Plasmon Resonance. *Optics Communications*. 82 (5-6): 425-432, 1991.
- [13] Kretschmann, E. The angular dependence and the polarisation of light emitted by surface plasmons on metals due to roughness. *Optics Communications*. 5 (5): 331-336, 1972.
- [14] Braundmeier, A. J.; Tomascheke, H. E. Observation of the simultaneous emission of roughness-coupled and optical-coupled surface plasmon radiation from silver. *Optics Communications*. 14 (1): 99-103, 1975.
- [15] Simon, H. J.; Guha, J. K. Directional surface plasmon scattering from silver films. *Optics Communications*. 18 (3): 391-394, 1976.
- [16] Toigo, F.; Marvin, A.; Celli, V.; Hill, N. R. Optical properties of rough surfaces: general theory and the small roughness limit. *Physical Review B*. 15 (12): 5618-5626; 1977.
- [17] Fontana, E., Pantell, R. H. Characterization of multilayer rough surfaces by use of surface-plasmon spectroscopy. *Physical Review B*. 37 (7): 3164-3182, 1988.
- [21] Fontana, E.; Pantell, R. H.; Strober, S. Surface plasmon immunoassay. *Applied Optics*. 29 (31): 4694-4704, 1990.
- [22] Fontana, E. Analysis of optical surfaces by means of surface plasmon spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 45 (2): 399-405, 1996.
- [23] Liedberg, B.; Nylander, C.; Lündstrom, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators B*. 4 (2): 299-304, 1983.
- [24] Flanagan, M. T.; Pantell, R. H. Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electronics Letters*. 20 (23): 968-970, 1984.

- [25] Fontana, E. A theoretical analysis of the coupling of light to surface plasmon oscillations at the edge of a slab waveguide. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*. 46 (3): 234-241, 1998.
- [26] Fontana, E.; Dulman, H. D.; Doggett, D. E.; Pantell, R. H. Surface plasmon resonance on a single mode optical fiber. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 47 (1): 168-173, 1998.

## Capítulo 7 – Objetivos da Dissertação

---

### 7.1 – Introdução

Há quase meio século o ser humano vem utilizando macromoléculas sintéticas para a fabricação de biomateriais como, por exemplo, os polímeros que são projetados para serem utilizados em contato com o organismo biológico.

De origem petroquímica, os polímeros sintéticos afetaram não somente as engenharias, mas, principalmente, a medicina, a biotecnologia e a área farmacêutica. Esses novos materiais poliméricos, que interagem favoravelmente com o organismo biológico tornando possível a substituição de órgãos lesados irreversivelmente, promovem a qualidade de vida do paciente.

Na área médica, cabe ressaltar a fabricação de dispositivos como oxigenadores cardiopulmonar, válvulas cardíacas, membranas para hemodiálise, cateteres, próteses, suturas cirúrgicas, marcapasso, coração artificial, entre outros.

Já a área da biotecnologia sofreu profundas modificações no que se refere às áreas de biocatálise e processos de separação. Nas últimas três décadas uma grande ênfase foi dada às técnicas de imobilização de enzimas em suportes poliméricos e a utilização de polímeros para a purificação de princípios ativos animais e vegetais. O desenvolvimento da técnica de imobilização de enzimas em membranas poliméricas influenciou na redução das etapas de operações unitárias dos processos bioquímicos e, conseqüentemente, no custo do produto final. Tais membranas com biocatalisadores imobilizados também tiveram um papel muito importante no desenvolvimento dos biossensores de enzimas imobilizadas utilizados nas áreas de controle e automação de processos fermentativos, bem como na bioquímica clínica.

O impacto nas ciências farmacêuticas não foi menor quando comparado à medicina e a biotecnologia. A síntese de polímeros solúveis em água via polimerização radicalar como, por exemplo, a poli(vinilpirrolidona), o poli(etilenoglicol), o poli(ácido acrílico) e o poli(ácido láctico), tornou possível a síntese de agentes expansores de plasma, géis para ultra-sonografia, sistemas com propriedades antimicrobianas, cosméticos, membranas para o tratamento de queimaduras, revestimentos de cápsulas e comprimidos, entre outros materiais já comercializados pela indústria farmacêutica.

Embora houvesse uma verdadeira explosão com relação aos processos de síntese e uma grande evolução nas técnicas de caracterização de polímeros na década de 60, há somente três décadas um controle preciso dos processos de polimerização foi atingido de modo a se obter materiais microestruturalmente projetados para, assim, se atingir os objetivos altamente específicos das áreas médica e farmacêutica.

No final do século XX surgiram os polímeros de microestrutura digitalizada (*imprinting polymers*) e macromoléculas altamente ramificadas denominadas de dendrímeros. Tais sistemas macromoleculares causaram uma verdadeira revolução nas áreas médica e farmacêutica, uma vez que mimetizam proteínas, agem como receptores artificiais de anticorpos, alavancam a síntese quiral por possuírem capacidade para a separação de enantiômeros entre várias outras propriedades características desses materiais projetados.

Os dendrímeros são considerados atualmente como um dos blocos fundamentais da química nanoscópica. Tais compostos isomoleculares possuem um elevado nível de organização estrutural e marcam o início de uma nova era na ciência macromolecular: a era da química nanoscópica. A elevada densidade de grupos funcionais na superfície dos dendrímeros torna estes compostos bem interessantes para o projeto de próteses cardiovasculares. Neste sentido, a aplicação de dendrímeros do tipo poligliceróis densamente ramificados com propriedades biocompatíveis, parece ser uma alternativa promissora para a obtenção de revestimentos hemocompatíveis de aplicação imediata na área cardiovascular, ainda não devidamente explorado pela literatura.

## 7.2 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a interação entre o dendrímero de poliglicerol (PGLD) e os elementos constituintes do tecido sanguíneo em condições *in vitro*. A grande complexidade deste tipo de estudo, nos levou a utilizar a técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície (RPS) a fim de melhor compreender a interação do PGLD com as proteínas séricas (albumina e fibrinogênio) que governam a cascata de coagulação do sangue.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Sintetizar e caracterizar o dendrímero PGLD;
2. Desenvolver a configuração de um aparato experimental no laboratório de Biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) baseado na configuração

de Kretschmann capaz de excitar plásmons de superfície interfaciado com um software (PHYWE) para armazenamento dos dados;

3. Estudar a hemocompatibilidade de filmes finos do dendrímero PGLD através de espectroscopia RPS e compará-la com ensaios de adesão plaquetária a fim de complementar os resultados obtidos através da técnica RPS;
4. Compreender os mecanismos de interação e o processo de adsorção entre proteínas séricas e o dendrímero de poliglicerol.

## Capítulo 8 – Materiais e Métodos

---

### 8.1 – Síntese do poliglicerol arborescente (PGLD)

Neste trabalho é descrita a obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) a partir da polimerização por abertura de anel do 2,3-epoxi-1-propanol (glicidol) utilizando-se a síntese divergente e um núcleo oligomérico de poliglicerol. A escolha do glicidol se deve à sua elevada reatividade em condições brandas de polimerização (baixa temperatura e pressão) e a propriedade de gerar poliéteres com elevada densidade de hidroxilas na superfície da macromolécula.

Inicialmente, um núcleo de poliglicerol oligomérico (PGL) foi preparado a partir da reação de eterificação da glicerina a  $230^{\circ}\text{C}$  utilizando-se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $0.34\%m/m$ ) em atmosfera de nitrogênio e  $50\text{mmHg}$  de pressão. A água reacional foi destilada em um equipamento Dean-Stark.

O PGL obtido foi purificado destilando-se a glicerina não reagida sob pressão reduzida (o ponto de ebulição da glicerina a  $10\text{mmHg}$  é de  $160,8^{\circ}\text{C}$ ). Após 23 horas de reação o rendimento do processo foi de  $70,8\%$ .

Após transferência do PGL para um reator tipo tanque agitado (CSTR) em aço inox 316 NL provido de um agitador tipo âncora ( $400\text{rpm}$ ), o sistema foi mantido sob vácuo a  $100^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para remoção da umidade residual ( $<0,01\%m/m$ , avaliada por Karl Fischer). O sistema reacional foi alimentado lentamente (vazão  $0,1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com glicidol ( $50\text{mL}$ ) parcialmente desprotonado com metilato de potássio ( $3,7\text{M}$ , Fluka). A temperatura do sistema reacional foi mantida em  $90^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas de processo. Após conversão total, o poliglicerol dendrítico (PGLD) foi dissolvido em metanol e neutralizado após filtração em coluna trocadora de íons tipo catiônica. O PGLD obtido foi seco em seguida sob vácuo por 15 h a  $80^{\circ}\text{C}$  ( $10\text{mmHg}$ ). O rendimento do processo para obtenção do PGLD foi de  $95\%$ .

A taxa de conversão para a obtenção do dendrímero pode ser escrito como:

$$\% \text{Conversão} = \left( 1 - \frac{[M]}{[M]_0} \right) \cdot 100 \quad (8.1)$$

sendo  $[M]$  e  $[M]_0$  a concentração de glicidol no tempo  $t$  e  $t = 0$ , respectivamente.

## 8.2 – Caracterização físico-química do dendrímero obtido

A estrutura dendrítica do PGLD obtido foi caracterizada utilizando-se técnicas reológicas e espectroscópicas (FTIR,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ ).

A ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H-RMN}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C-RMN}$ ) foi efetuada em um espectrômetro Bruker 500MHz utilizando-se como solvente o dimetilsulfóxido deuterado ( $^d\text{DMSO}$ ).

As características reológicas do PGLD foram determinadas em um viscosímetro de placas rotatórias (reômetro Reologica Stresstech, duas placas de 20mm) a 100°C.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PGLD foi determinada utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um equipamento Perkin-Elmer DSC 7 em atmosfera de nitrogênio (40mmHg) e velocidade de aquecimento de 5K.min<sup>-1</sup>. O intervalo de temperaturas explorado foi de -110°C a 80°C. A amostra foi aquecida de -110°C até 80°C e em seguida resfriada rapidamente até -110°C. Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriadas até -110°C. Uma última corrida foi então efetuada, até a temperatura de 80°C, e registrada.

O peso molecular e a polidispersividade do PGLD foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC). Na análise por GPC, dimetilformamida com 0,2 % LiBr (*m/m*) foi utilizado como eluente (fluxo 1,0mL.min<sup>-1</sup>, pressão 550psi). Poli(etileno glicol) (PEG) de pesos moleculares 194, 960, 4.250, 18.600, 64.700 e 450.000 g/mol foram utilizados para construção da curva de calibração. O sistema analítico consistiu de um cromatógrafo HPLC 510 da Waters equipado com detector 2414 (índice de refração). Foram utilizadas colunas PLgel acoplada em série (10.000Å+1000Å+100Å, tamanho de partícula de 5µm). O volume de injeção da amostra foi de 20µL. A aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados com software SW da Waters Breeze 3.3.

A função de calibração foi calculada como sendo de 3ª ordem e a aplicação do método dos quadrados mínimos log(Peso Molecular) versus o tempo de retenção forneceu um coeficiente de correlação igual a 0,9990.

Os pesos moleculares numérico ( $M_n$ ) e ponderal ( $M_w$ ) foram calculados por [1]:



$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{s(Mp/s)_i^t}} \text{ e } M_w = \frac{E \sum h_i s(Mp/s)_i^t}{\sum h_i}. \quad (8.2)$$

O termo  $(Mp/s)_i$  representa o peso molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por  $h_i$  e  $i$ , respectivamente. Os termos  $s$  e  $t$  são constantes.

O índice de polidispersão ( $IP$ ) é definido como:

$$IP = \frac{M_w}{M_n}. \quad (8.3)$$

O índice de hidroxila ( $N_{OH}$ ) do políglicerol dendrítico (PGLD) foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6g) com 10mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos a solução resultante foi titulada com NaOH 1,0M utilizando-se fenolftaleína como indicador.

O  $N_{OH}$  foi calculado de acordo com [2]:

$$N_{OH} = \frac{(V_2 - V_1) \times 56,11}{m} \quad (8.4)$$

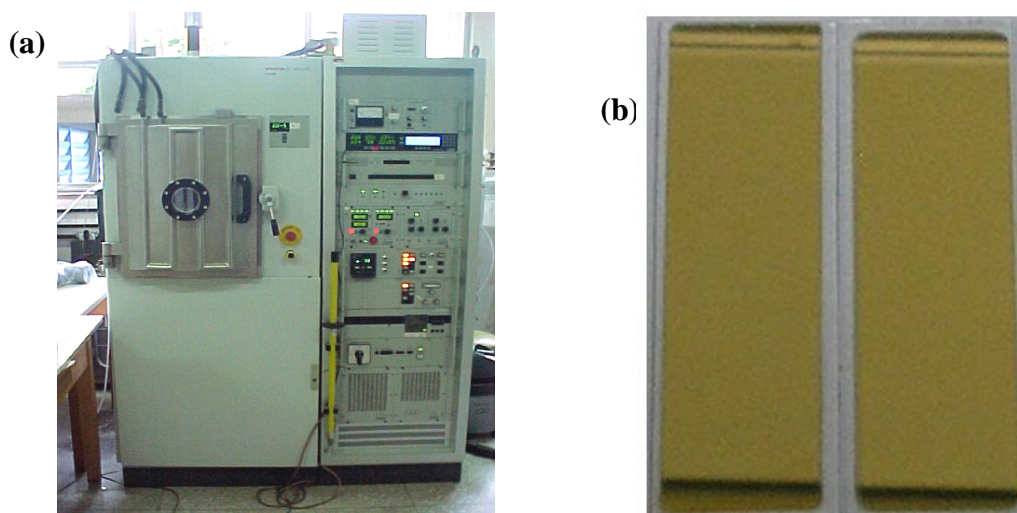
sendo  $V_1$  o volume de NaOH utilizado na titulação de um branco,  $V_2$  o volume de NaOH utilizado na titulação da amostra e  $m$  a massa de PGLD empregada.

### 8.3 – Síntese e caracterização do eletrodo

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

Neste trabalho foram evaporados filmes finos de ouro sobre um substrato de vidro utilizando uma Evaporadora Balzer PLS500 (Figura 8.1(a)) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo (USP). Os filmes de ouro foram evaporados em uma atmosfera de argônio sob uma pressão de  $4 \times 10^{-4}$  mbar. Foi utilizada uma camada extremamente fina de aproximadamente 2-5 nanômetros do isolante

$Y_2O_3$  (óxido de ítrio) como uma camada ligante a fim de proporcionar uma maior adesão do filme de ouro no substrato de vidro. A Figura 8.1(b) apresenta uma fotografia dos filmes finos de ouro evaporados na superfície do substrato obtidos neste trabalho.



**Figura 8.1** – (a) Foto digital da Evaporadora Balzer PLS500 do IPEN. (b) Lâminas de vidro com ouro evaporado em sua superfície.

As propriedades óticas dos filmes fino de ouro evaporados foram caracterizadas através de espectroscopia RPS.

### 8.3.2 – Deposição do dendrímero PGLD sobre o filme fino de ouro

O substrato de vidro com o filme fino de ouro depositado em sua superfície foi imerso em uma solução de poliglicerol dendrítico diluído em água destilada por 5 minutos. A concentração da solução de PGLD utilizada foi de  $68,5\text{mg/mL}$ . A Figura 8.2 ilustra o procedimento experimental utilizado para a deposição de filmes finos de PGLD sobre substratos de ouro.

Após a adsorção do PGLD sobre o filme de ouro, o substrato foi seco a temperatura e atmosfera ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ,  $90,66\text{kPa}$ ) e, em seguida, as propriedades óticas do filme adsorvido foram caracterizadas por espectroscopia RPS.

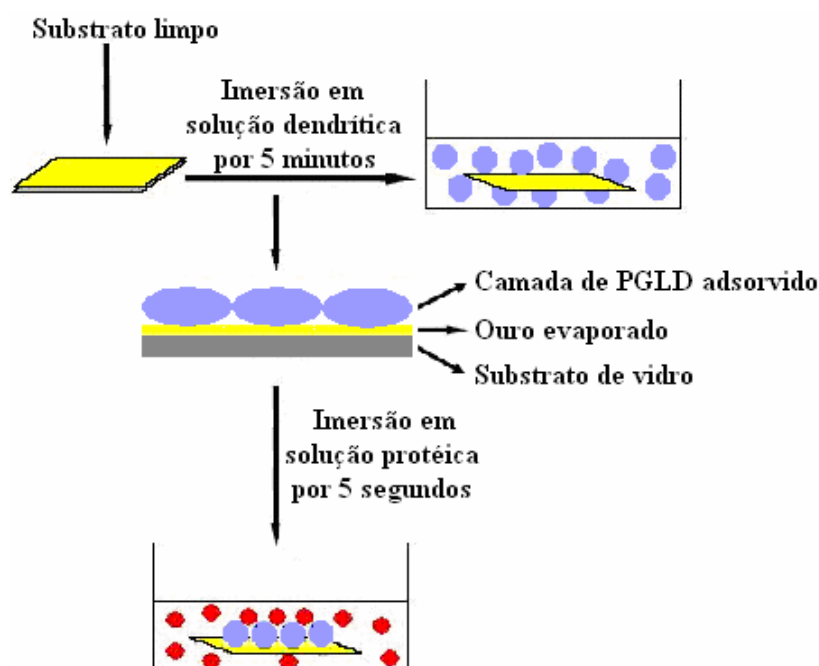
### 8.3.3 – Estudo da adsorção da proteína BSA pelo PGLD

O substrato com o filme de PGLD adsorvido sobre o filme fino de ouro foi imerso em soluções de albumina de soro bovino (BSA) diluídas em soro fisiológico. As concentrações das soluções de BSA utilizadas foram de 1,40, 2,80, 4,20 e 5,60  $mg/mL$ .

Para a construção da curva de calibração, o substrato ficou imerso por um período de 5 segundos em cada solução de BSA. Já para a curva de adsorção de albumina em função do tempo, o substrato foi imerso na solução de BSA com concentração de 2,80 $mg/mL$  em intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 segundos.

Após a adsorção da BSA sobre o filme de PGLD, o eletrodo foi seco a temperatura e atmosfera ambiente (25°C, 90,66kPa) para que, em seguida, as propriedades óticas dos filmes adsorvidos fossem caracterizadas através do método de espectroscopia RPS.

A Figura 8.2 ilustra esquematicamente o processo de deposição do PGLD sobre o substrato de ouro bem como o processo de adsorção protéica.



**Figura 8.2** – Diagrama representativo do procedimento experimental para a adsorção do dendrímero PGLD sobre substratos de ouro e, a adsorção de proteínas sobre a superfície dendrítica.

### 8.3.4 – Filmes de HFb adsorvidos sobre o filme de PGLD

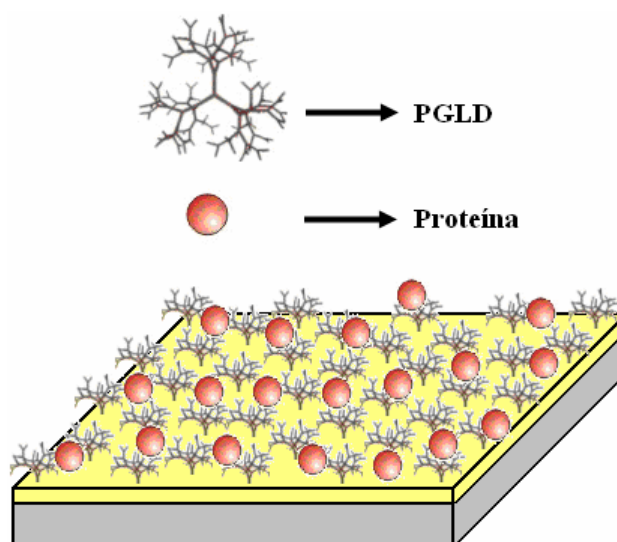
O substrato com o filme de PGLD adsorvido sobre o filme fino de ouro foi imerso em soluções de fibrinogênio de soro humano (HFb) diluídas em soro fisiológico. As

concentrações das soluções de HFb utilizadas foram de 0,12; 0,24; 0,36; e 0,48  $mg/mL$ . A concentração de fibrinogênio foi cerca de doze vezes menor que a concentração de albumina, uma vez que essa proporção é a encontrada no plasma sanguíneo humano.

Para a construção da curva de calibração, o substrato ficou imerso por um período de 5 segundos em cada solução de HFb. Já para a curva de adsorção de fibrinogênio em função do tempo, o substrato foi imerso na solução de HFb com concentração de 0,24 $mg/mL$  em intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 segundos.

Após a adsorção do HFb sobre o filme de PGLD, o eletrodo foi seco a temperatura e atmosfera ambiente (25°C, 90,66kPa) para que, em seguida, as propriedades óticas dos filmes adsorvidos fossem caracterizadas através do método de espectroscopia RPS.

A ilustração do eletrodo para a análise por RPS é apresentada na Figura 8.3. A proteína em vermelho representa ambos, BSA e HFb.



**Figura 8.3** – Diagrama representativo do eletrodo para as análises por RPS.

### 8.3.5 – Ensaio de adesão plaquetária do dendrímero PGLD

O ensaio de adesão plaquetária foi efetuado após contato da superfície de vidro revestido com o dendrímero PGLD com plaquetas marcadas com  $^{51}Cr$  [3]. O sangue humano foi coletado em solução de ACD (citrato dextrose 3,8%) e o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado após centrifugação a 700g por 5 minutos. Após adição de prostaglandina sódica ( $PGI_2$ , 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) e nova centrifugação do PRP a 900g por 10 minutos as plaquetas foram resuspensas em solução de ACD pH 6,00 (6,85mM de citrato de sódio, 130mM de NaCl, 4mM de KCL e 5,5mM de glicose). As plaquetas foram peletizadas novamente e, em seguida,

resuspensas em solução de Hepes-Tyrode (136mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 0,42mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5,5mM de glicose, 2% BSA e 5mM de ácido 4,2-hidroxietil-1-piperazina etanosulfônico). A concentração de plaquetas foi ajustada para cerca de  $2.10^9$  células.mL<sup>-1</sup> e em seguida foram marcadas com <sup>51</sup>Cr pela adição de Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (μCi.mL<sup>-1</sup>) e incubação por 40 minutos a 20°C. As plaquetas marcadas com <sup>51</sup>Cr foram lavadas duas vezes com o tampão de Hepes-Tyrode, centrifugadas e resuspensas novamente no tampão. Após ajuste para uma concentração de  $2.10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, as plaquetas foram utilizadas no ensaio de adesão plaquetária.

Para o ensaio de adesão plaquetária, substratos de vidro e tubos de ensaio (vidro pyrex) foram preenchidos com PRP contendo as plaquetas marcadas com <sup>51</sup>Cr e mantidos a 37°C por 3 minutos. Os tubos foram em seguida lavados com solução tampão de Hepes-Tyrode contendo solução de MgCl<sub>2</sub> 1mM. A radioatividade dos tubos foi medida em um contador gama. Os resultados foram expressos como a média de 5 experimentos.

Para observação do processo de adesão e agregação plaquetária nas superfícies das amostras dos tubos de ensaio revestidos e não revestidos com o dendrímero PGLD, após contato com o PRP os tubos foram desidratados em etanol, secos em atmosfera de CO<sub>2</sub> (ponto crítico) e, após revestimento com ouro, foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (SEM Phillips XL 30).

### 8.3.6 – Formação de trombos na superfície do dendrímero PGLD

A formação de trombos nas superfícies de tubos de ensaios (vidro pyrex de 1mL) não revestidos e revestidos com o dendrímero PGLD, foi estudada utilizando-se a metodologia inicialmente proposta por Imai e Nose [4]. O sangue humano foi coletado em solução de ACD (citrato-dextrose) para impedir a hemólise dos glóbulos vermelhos.

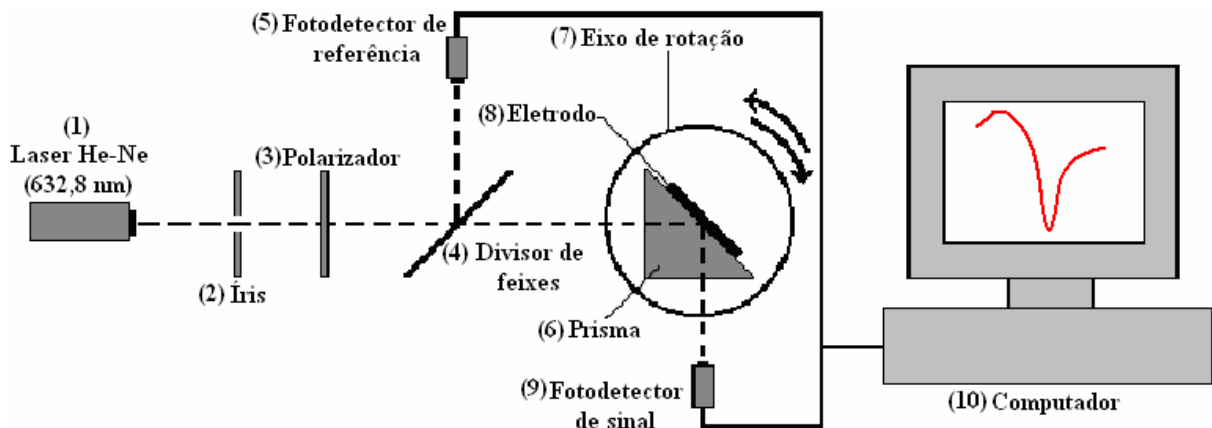
Os tubos de ensaios foram inicialmente hidratados em solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 a 37°C por 15 minutos e colocados em contato com o sangue previamente preparado com a solução de ACD. Em seguida a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20μL de CaCl<sub>2</sub> a 3,8%. Após um determinado intervalo de tempo a reação de formação de trombos foi interrompida pela adição de água destilada. As superfícies testadas foram mantidas por 5 minutos em solução de glutaraldeído a 25% para a fixação dos trombos e em seguida, secos sob vácuo a 25°C até peso constante. A quantidade de trombos na superfície foi avaliada gravimetricamente pela equação:

$$\%Trombos = \frac{W_t}{W_g} \times 100 \quad (8.5)$$

sendo  $W_g$  o peso dos trombos formados no vidro após 60 minutos (referência de coagulação total) e  $W_t$  representa o peso dos trombos formados nos tubos poliméricos.

#### 8.4 – Montagem do aparato experimental RPS: sistema de medida e aquisição de dados

O sistema RPS utilizado para o estudo da interação de proteínas do plasma sanguíneo e o dendrímero PGLD baseia-se na configuração de refletância total atenuada desenvolvida por Kretschmann. A Figura 8.4 apresenta o diagrama representativo do aparato experimental utilizado para as análises das amostras.



**Figura 8.4** – Diagrama representativo do sistema óptico utilizado no laboratório de Biomateriais na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) para análise de hemocompatibilidade de materiais poliméricos.

Inicialmente, o feixe de luz proveniente da fonte de laser (1) passa pela íris (2) e, em seguida, atravessa o polarizador (3). Posteriormente, o feixe de luz polarizado no plano ótico do conjunto prisma-eletrodo é dividido em duas componentes pelo divisor de feixe (4), uma em direção ao eixo de rotação (7) e outra para o fotodetector de referência (5). A parte da fonte de luz transmitida incide na interface prisma-eletrodo e é coletada pelo fotodetector de sinal (9). O eletrodo (8) é formado por um filme de ouro evaporado em um substrato de vidro, um filme dendrítico de PGLD adsorvido sobre o metal e, por último, um filme protéico adsorvido sobre o dendrímero. O eixo de rotação (7) é varrido de 30 a 70 graus e, então, os dados dos fotodetectores de sinal (9) e de referência (5) são coletados pelo software de

aquisição dos dados. Finalmente, os dados coletados são quantificados através do programa computacional desenvolvido em ambiente MATLAB 7.0 descrito na seção (8.6).

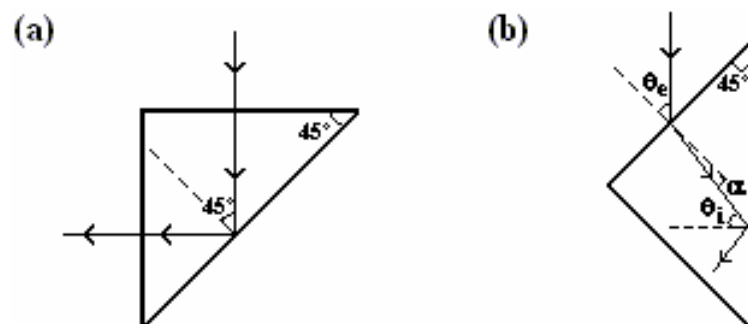
Os elementos que constituem o aparato experimental são:

1. Laser de He-Ne: apresenta um comprimento de onda de  $632,8nm$  e uma potência de saída de  $1,2mW$ .
2. Polarizador: é utilizado para polarizar o feixe de luz corretamente no plano de incidência.
3. Íris: esta componente apresenta uma abertura variável que é utilizada para bloquear ruídos espaciais do feixe de luz proveniente do laser.
4. Divisor de feixes: é um espelho parcialmente transmissivo. Ele é colocado inclinado em cerca de  $45^\circ$  na linha óptica do feixe incidente de tal forma que ele reflita uma amostra do feixe incidente para o fotodetector de referência. A parte do feixe incidente que é transmitido pelo divisor de feixe incide na superfície do prisma.
5. Fotodetector de referência: é utilizado para monitorar o nível de potência do laser de forma a eliminar efeitos decorrentes de flutuações no nível de potência.
6. Prisma reto: esta componente é utilizada para permitir o acoplamento do feixe de luz incidente em uma de suas faces aos plásmons de superfície (PS) na superfície do filme metálico.
7. Eixo de rotação: é o elemento de suporte do prisma de acoplamento. Ele é utilizado para ajustar o ângulo de incidência do feixe incidente em relação à direção normal a superfície do prisma. Com esta componente conseguimos determinar o valor do ângulo com uma precisão de  $0,05$  graus.
8. Eletrodo: é um elemento de extrema importância para a sensibilidade do nosso sensor. O filme fino metálico é depositado sobre um substrato de vidro que é colocado em contato óptico com uma das faces do prisma. Sobre o filme fino metálico é imobilizada uma camada do dendrímero PGLD.
9. Fotodetector de sinal: é utilizado para medir o nível de potência da luz refletida na interface prisma-eletrodo. No início de cada medida o fotodetector de referência é posicionado na linha óptica da entrada para a calibração do sinal de entrada com relação ao medido pelo fotodetector de referência. Uma vez realizada essa calibração, o valor absoluto da reflectância pode ser medido pela razão entre os sinais gerados nos fotodetectores de sinal e de referência.

10. Computador: este componente é utilizado como sistema de aquisição de dados. Os fotodetectores de silício são conectados ao microcomputador através de uma interface de medida cobra 3 da PHYWE (empresa multinacional de equipamentos para laboratórios de física, química e biologia). Estes dados são então registrados através do software de medidas *Measure 4.2.1.2*.

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

Um procedimento importante para a determinação dos parâmetros ópticos é a medida do índice de refração do prisma cujo valor influencia diretamente no cálculo do ângulo de ressonância e, conseqüentemente, no cálculo da espessura e da constante dielétrica do filme metálico, filme dendrítico e protético. A expressão matemática que relaciona o índice de refração do prisma ( $n$ ) com os ângulos externos ( $\theta_e$ ) e interno ( $\theta_i$ ) pode ser determinada através da Figura 8.5.



**Figura 8.5** – Prisma reto ajustado para (a) o ângulo externo nulo e (b) um ângulo externo  $\theta_e$  graus.

Quando o feixe de luz incide sobre uma das faces do prisma reto, de tal forma que o ângulo externo seja nulo, Figura 8.5(a), o ângulo de incidência interno é igual a  $45^\circ$ . Se for aplicada uma pequena rotação nesse prisma, a refração do feixe de luz nessa face dará origem a um ângulo  $\alpha$  que, no caso do prisma reto, se relaciona com o ângulo interno  $\theta_i$  pela seguinte equação matemática:

$$\theta_i = 45^\circ + \alpha . \quad (8.6)$$

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



$$\alpha = \arcsen\left(\frac{\text{sen}(\theta_e - 45^\circ)}{n}\right). \quad (8.7)$$

Substituindo a equação (8.7) na equação (8.6), tem-se:

$$\theta_i = 45^\circ + \arcsen\left(\frac{\text{sen}(\theta_e - 45^\circ)}{n}\right). \quad (8.8)$$

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

$$\theta_i = \theta_{RIT} = \arcsen\left(\frac{1}{n}\right). \quad (8.9)$$

Fazendo-se algumas operações algébricas com as equações (8.8) e (8.9), obtém-se a expressão matemática para o índice de refração do prisma utilizado no aparato experimental:

$$n = \left[ 1 + \left( 1 - \sqrt{2}(\theta_{e,RIT} - 45^\circ) \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (8.10)$$

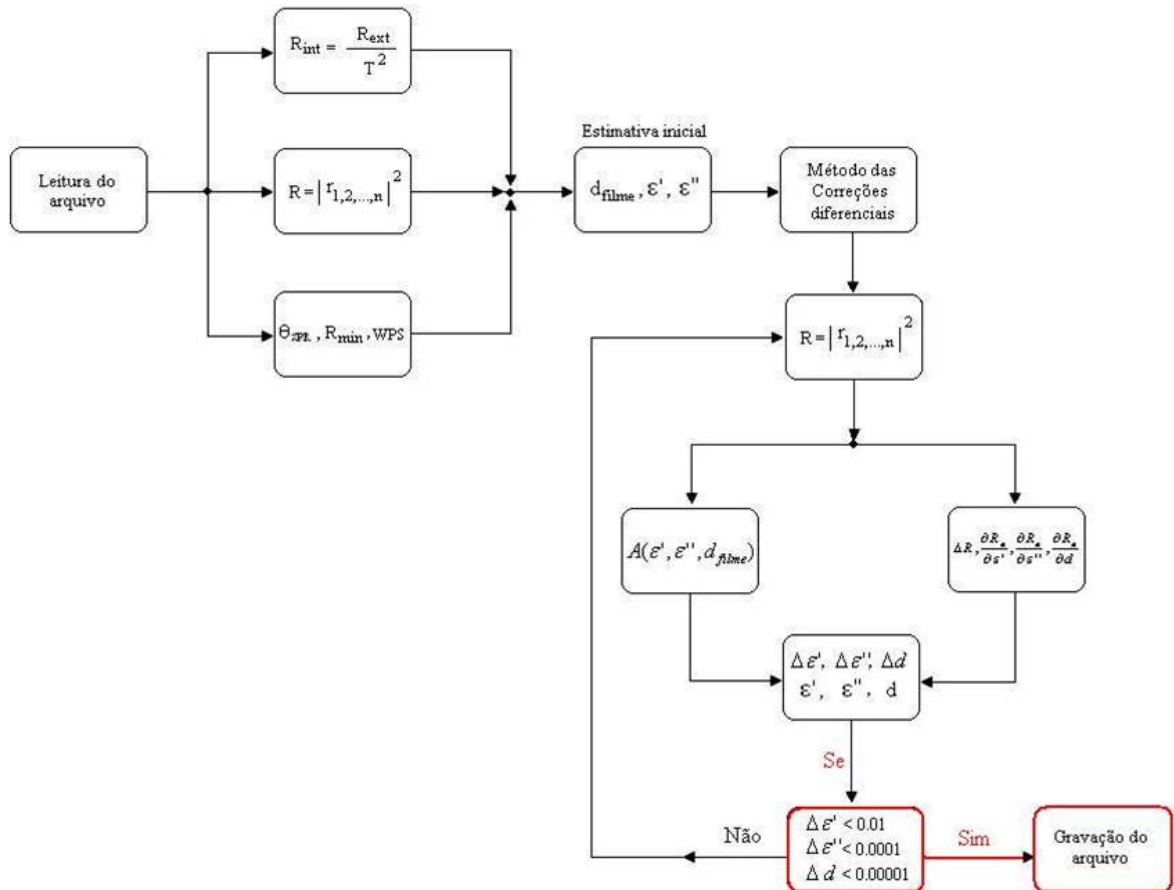
onde  $\theta_{e,RIT}$  é o ângulo externo correspondente a reflexão interna total na face da hipotenusa do prisma reto.

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

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

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

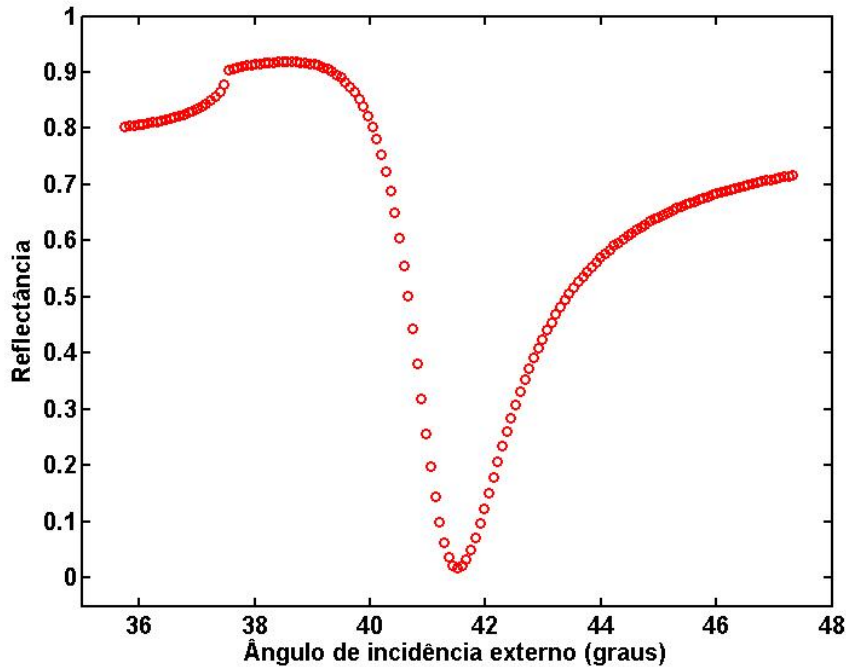
O procedimento de cálculo pode ser sumarizado a partir do fluxograma apresentado na Figura 8.6.



**Figura 8.6** – Fluxograma do procedimento de cálculo para obtenção da espessura e constantes óticas de filmes ultrafinos.

Inicialmente, é realizada a leitura do arquivo contendo os vetores correspondentes ao coeficiente de reflexão externo (obtido pela razão entre o sinal medido no fotodetector de sinal e no fotodetector de referência) e ângulo de incidência externo, obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na secção (8.4). Os dados apresentados na Figura 8.7 não correspondem a um resultado experimental e sim uma simulação computacional da reflectância em função do ângulo de incidência externo para um sistema de três interfaces (prisma-óleo de silicone, óleo de silicone-filme de ouro e filme de ouro-ar). Foram utilizados para os dados de entrada os pontos obtidos através da simulação

computacional uma vez que os parâmetros óticos são conhecidos. Estes parâmetros simulados foram:  $\lambda = 632,8nm$ ,  $d_{Au} = 50,0nm$ ,  $\varepsilon = -11,0 + 1,50i$ .



**Figura 8.7** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces obtido através de simulação computacional.

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

$$R_{\text{int}} = \frac{R_{\text{ext}}}{T^2}, \quad (8.11)$$

sendo  $T$  o coeficiente de transmissão de potência em cada face correspondente aos catetos do prisma reto.

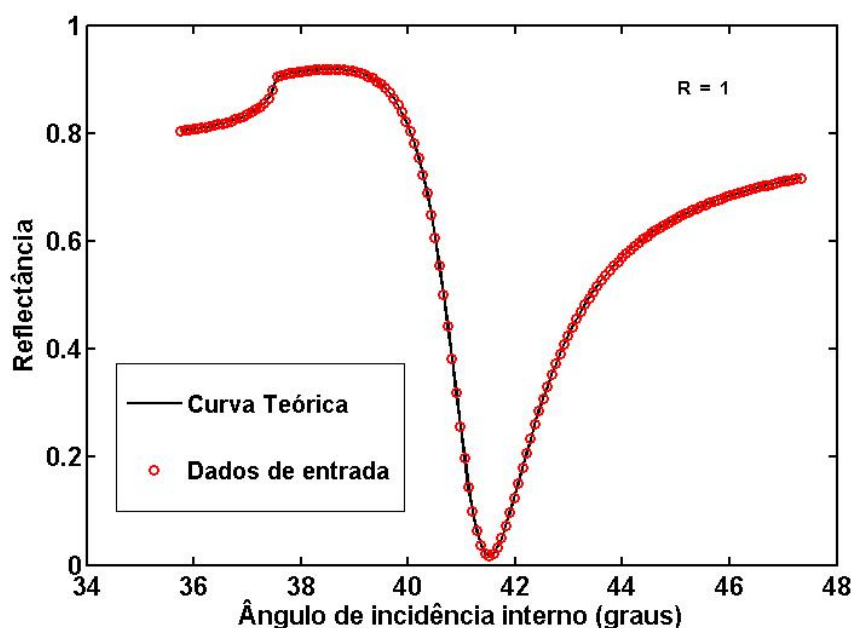
A reflectância mínima,  $R_{\text{min}}$ , é calculada utilizando a função intrínseca *min(vector)* do *MATLAB 7.0*. O ângulo ressonante,  $\theta_{PS}$ , é obtido projetando o valor do mínimo da reflectância do eixo das ordenadas para o eixo das abscissas. Já para a meia largura angular,  $W_{PS}$ ,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

$$W_{PS} = \theta_{RPS} - \theta_a \quad (8.12)$$

As equações (6.29), (6.30), (6.33) e (6.34) são utilizadas para a determinação da estimativa inicial da espessura e das partes real e imaginária da constante dielétrica dos filmes metálico e dielétrico. Como verificado anteriormente, duas estimativas iniciais dos parâmetros óticos dos filmes podem ser obtidas. No entanto, segundo Fontana [5] a estimativa que mais se aproxima do valor real é:

$$\eta_a = \frac{|r_{02}|^2}{1 - R_{\min}} \left[ (1 + R_{\min}) + 2\sqrt{R_{\min}} \right] \quad (8.13)$$

A partir das estimativas iniciais dos parâmetros óticos dos filmes é inicializado o método das correções diferenciais (apêndice B) a fim de obter o melhor ajuste entre as curvas teórica e experimental. Nesta etapa, a função de reflectância para o sistema de n-camadas é implementada. A partir dela é calculada as derivadas da reflectância em função de cada parâmetro ótico e a diferença entre o valor teórico e experimental da reflectância concomitantemente com os elementos da matriz dada pela equação (A.17). Obtidas estas variáveis são, então, calculadas as variações dos parâmetros óticos dando origem a novos valores da espessura e das constantes dielétricas. Este processo recursivo é realizado até que o erro absoluto quadrático seja totalmente minimizado. Quando isto é atingido, as curvas experimental e teórica e os valores dos parâmetros óticos são armazenados em um arquivo de gravação, como mostrado na Figura 8.8. Os valores dos parâmetros óticos obtidos através do ajuste de curva foram:  $d_{Au} = 50,0nm$ ,  $\varepsilon = -10,99 + 1,50i$ . O procedimento numérico para as demais camadas segue a mesma rotina.



**Figura 8.8** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces. A curva pontilhada em vermelho representa os dados de entrada e a curva em preto o cálculo teórico obtido através do modelo matemático e pelo método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $d_{Au} = 50,0nm$ ,  $\epsilon_{Au} = -10,99 + 1,50i$  com o coeficiente de correlação igual a  $R = 1,00$ .

### 8.7 – Considerações Parciais

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

O programa computacional, baseado no modelo matemático, foi de extrema importância para as análises de interações biomoleculares uma vez que, através dele foi possível quantificar tanto as propriedades óticas do filme de ouro evaporado sobre substratos de vidro quanto as adsorções de materiais sintéticos e biológicos.

As técnicas de GPC, FTIR,  $^{13}C$ -RMN e  $^1H$ -RMN foram essenciais durante o desenvolvimento do presente trabalho pela caracterização e comprovação da estrutura dendrítica e da alta pureza do poliglicerol dendrítico sintetizado. Já, a técnica de DSC foi fundamental para se determinar a temperatura de transição vítrea do PGLD para, assim, confirmar o seu possível uso em dispositivos biomédicos.

## 8.8– Referências bibliográficas

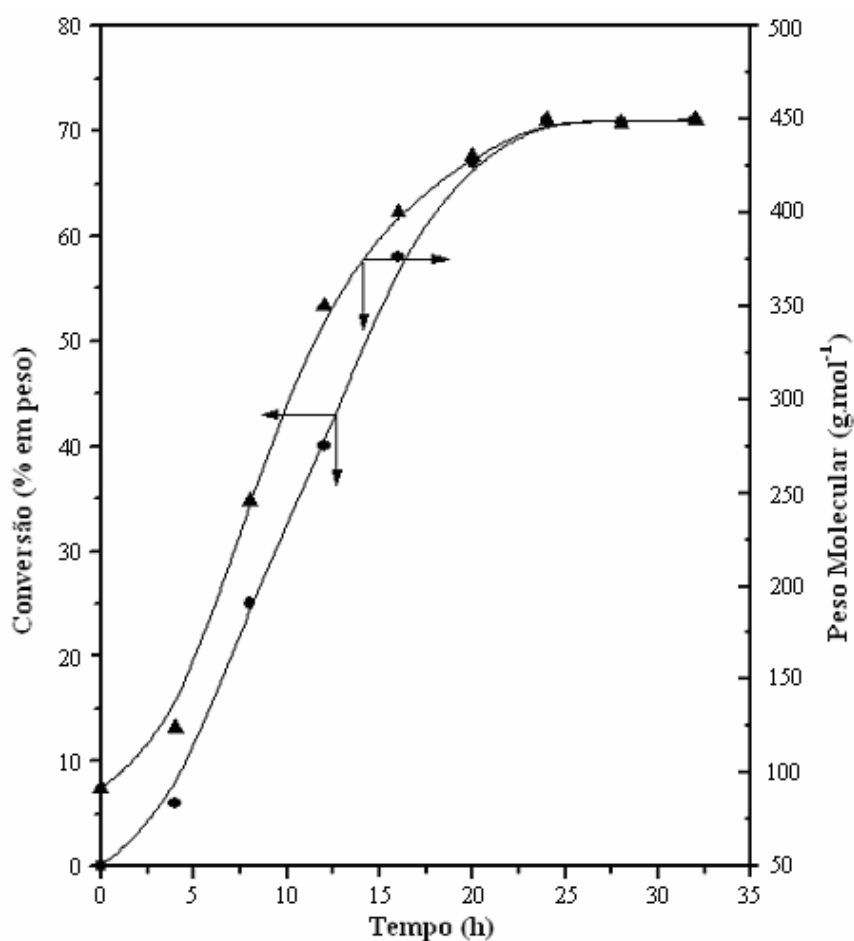
- [1] *The United States Pharmacopeia*. Rockville (USA), USP Convention. NF XXI edition. 1200-1201, 1985.
- [2] Solomon, D.H. The chemistry of organic film formers. *New York: John Wiley*. 90-93, 1967.
- [3] de Queiroz, A.A.A. Thermodynamic analysis of the surface of biomaterials. *Journal Molecular Structure: Theochem*. 394, 271-79, 1997.
- [4] Moroi, M.; Okuma, M.; Jung, S.M. Platelet adhesion to collagen-coated wells: analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. *Biochemical Biophysical Acta*. 1137, 1-9, 1992.
- [5] Fontana, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*. 45 (29): 7632-7642, 2006.

## Capítulo 9 – Resultados e Discussões

### 9.1 – Análise físico-química do poliglicerol dendrítico

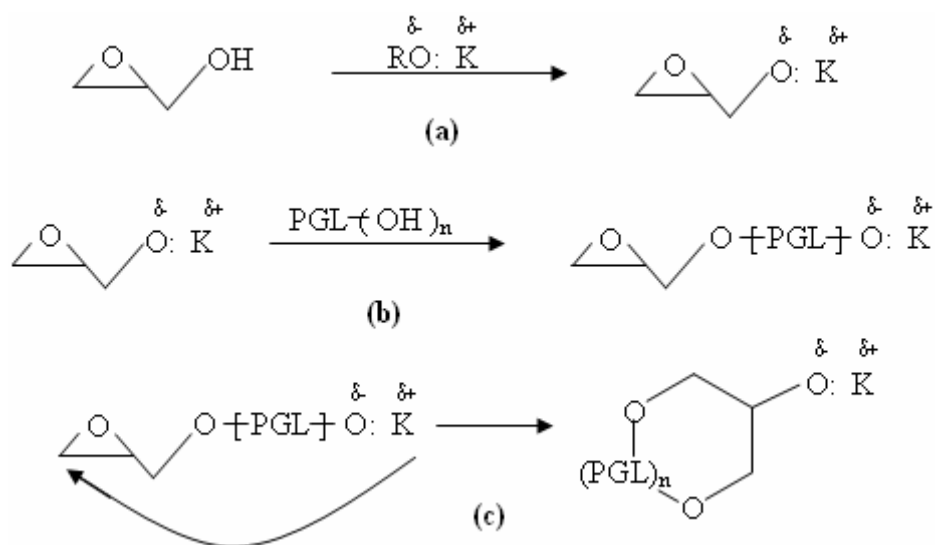
É bem conhecido na literatura que polióis tendem a sofrer eterificação na presença de catalisadores como NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , CaO em elevadas temperaturas originando, dessa forma, poliéteres. O processo de eterificação em meio alcalino não é seletivo exigindo, portanto, um longo tempo reacional e atmosfera inerte para inibir a formação de acroleína.

A Figura 9.1 mostra o percentual de conversão da glicerina em poliglicerol oligomérico em função do tempo. Percebe-se que um peso molecular limite de  $450\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , equivalente ao hexaglicerol foi obtido após 23 horas de reação.



**Figura 9.1** – Percentual de conversão da glicerina em poliglicerol oligomérico em função do tempo e sua influência no peso molecular.

A segunda etapa do processo reacional envolve a obtenção de um alcoóxido como iniciador do processo de formação do dendrímero. Neste caso, um alcoóxido é obtido pela reação de metalação do glicidol de acordo com a reação mostrada na Figura 9.2.



**Figura 9.2** – (a) Mecanismo de desprotonação, (b) propagação (c) e ciclização do glicidol.

A reação de abertura de anel leva à formação de um alcoóxido como sítio ativo que se propaga anionicamente. A reação de ciclização é indesejável uma vez que tende a formar compostos de baixo peso molecular além de levar à obtenção de materiais altamente polidispersos no peso molecular. A reação de ciclização do precursor oligomérico pode ser inibida adotando como variáveis de controle a parcial de desprotonação (~10%), baixa concentração e a lenta adição do glicidol durante o processo de polimerização.

A Figura 9.3 ilustra o percentual de conversão em função do tempo para a reação de obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) e, também, o logaritmo do percentual de conversão em função do tempo para a reação de obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD). A análise dos resultados obtidos indica que a polimerização segue uma cinética de primeira ordem clássica.



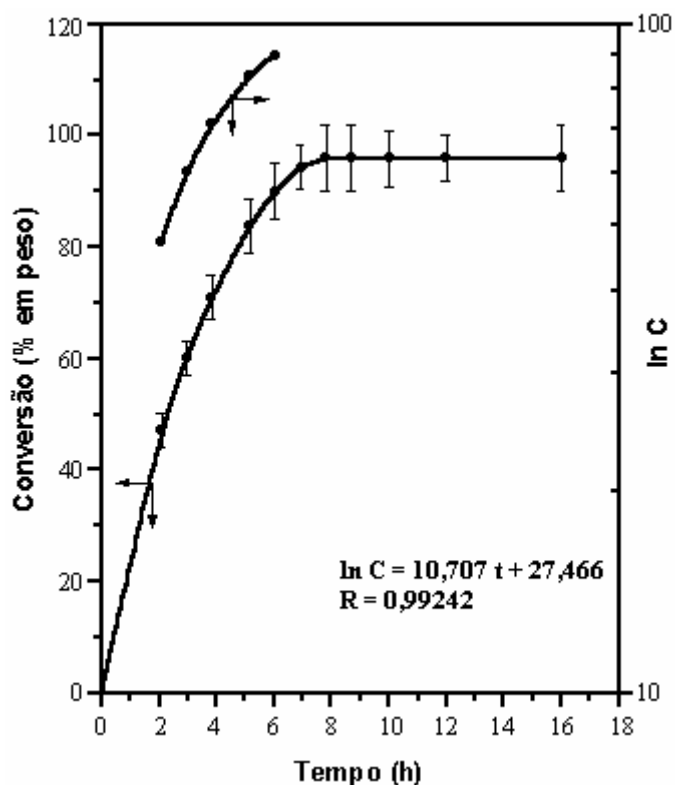
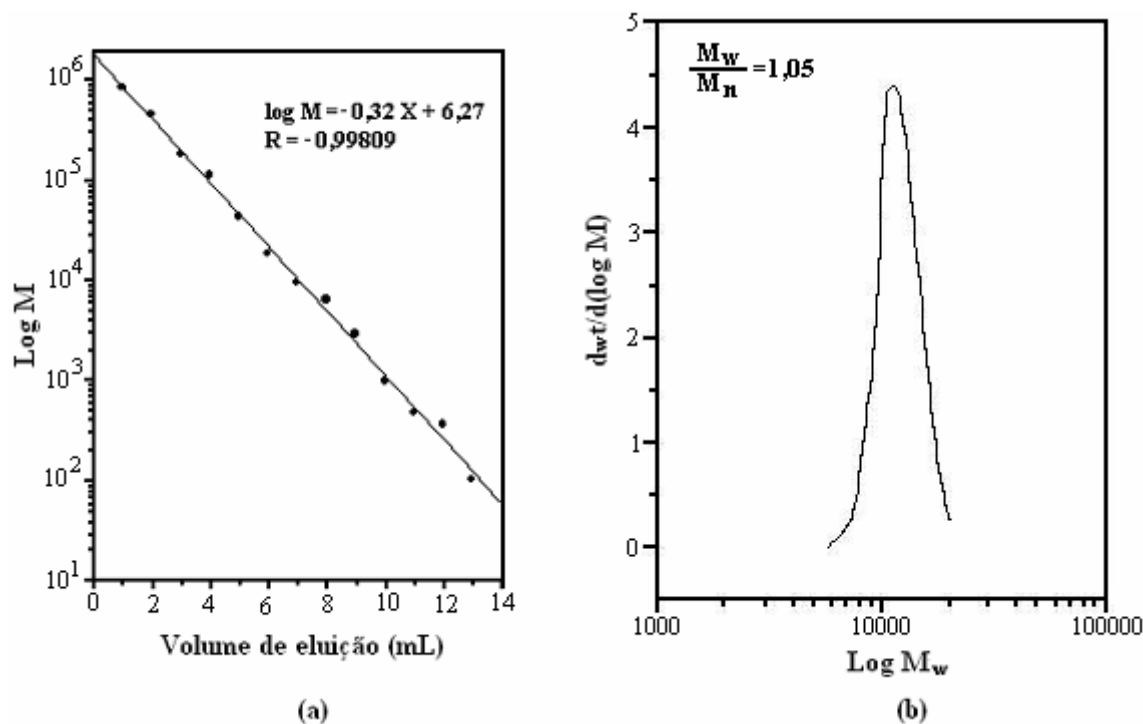


Figura 9.3 – Cinética de polimerização do PGL para obtenção do PGLD.

### 9.1.1 – Cromatografia de permeação em gel (GPC)

O peso molecular médio e o índice de polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros importantes para a determinação e explicação do comportamento físico destes sistemas macromoleculares. Estas propriedades podem ser determinadas através da técnica de GPC.

A Figura 9.4 mostra a análise por GPC do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) obtido após 12 horas de processo a 90°C. A Figura 9.4(a) apresenta a curva de calibração para o dendrímero. Já a Figura 9.4(b) indica que o dendrímero mostra uma distribuição de peso molecular monomodal e um baixo índice de dispersão no peso molecular, o que confirma a estrutura dendrítica da macromolécula de PGLD.



**Figura 9.4** – (a) Curva de calibração e (b) análise por GPC do PGLD obtido após 02 horas de processo.

Considerando um baixo grau de desprotonação, a velocidade de polimerização do glicidol poderia ser descrita por [1]:

$$\frac{d[Gl]}{dt} = k[RO:^-][ROH][Gl], \quad (9.1)$$

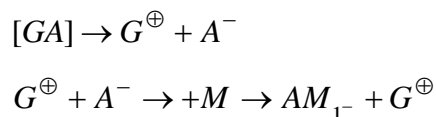
sendo  $[RO:^-]$ ,  $[ROH]$  e  $[Gl]$  as concentrações do alcoóxido, poliglicerol e glicidol, respectivamente.

Portanto, a equação (9.1) mostra que a velocidade de polimerização é controlada pelas concentrações do glicidol, alcoóxido e grupos hidroxilas. Estudos da literatura demonstram que um controle da razão concentração do epóxido/concentração de um polioliol não permite um controle preciso do peso molecular bem como do índice de polidispersão do polímero.

A obtenção de um poliglicerol de estrutura dendrítica monodisperso neste trabalho vem demonstrar que a parcial desprotonação de um poliglicerol utilizado como iniciador parece ser uma rota sintética mais adequada para a síntese de poligliceróis dendríticos. Neste caso, um provável equilíbrio dinâmico entre alcoóxidos e grupos hidroxilas parece garantir a iniciação simultânea de todos os grupos alcoóxidos presentes no sistema reacional.

Teoricamente seria de se esperar que a distribuição de pesos moleculares em uma polimerização aniônica seguisse uma distribuição de Poisson gerando, portanto, sistemas monodispersos.

Considerando que a concentração inicial do iniciador é dada por  $[GA]$ , a etapa de iniciação pode ser escrita como [2]:



sendo que o crescimento da cadeia do polímero pode iniciar nos centros  $[AM_{1^{-}}] = [GA]$ .

A velocidade de propagação pode ser escrita como uma equação integrada de velocidade de primeira ordem com relação à concentração do monômero:

$$-\int \frac{d[M]}{dt} dt = v_p = \int k_p [AM_{1^{-}}][M] = \int k_p [GA][M] \Rightarrow [M] = [M]_o e^{-k_p [GA]t}, \quad (9.2)$$

sendo  $[M]_o$  a concentração inicial do monômero em  $t = 0$  e

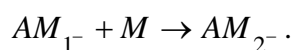
$$\bar{v} = \left( \frac{[M]_o - [M]}{[GA]} \right), \quad (9.3)$$

sendo  $v$  o comprimento cinético da cadeia.

Substituindo (9.2) em (9.3) obtém-se:

$$\bar{v} = \frac{[M]_o}{[GA]} \{1 - \exp(-k_p [GA]t)\}. \quad (9.4)$$

A velocidade da reação de polimerização após a adição de mais glicidol ao centro reativo da cadeia, assumindo a presença da espécie  $G^{\oplus}$ , pode ser escrita como:



Logo, pode-se escrever:

$$-\frac{d[AM_1^-]}{dt} = k_p[AM_1^-][M] = k_p[AM_1^-][M]_0 \exp(-k_p[GA]t). \quad (9.5)$$

Após integração, considerando  $[AM_1^-] = [GA]$  em  $t = 0$ , tem-se a expressão:

$$[AM_1^-] = [GA] \exp\left\{\frac{-[M]_0}{[GA]} [1 - \exp(k_p[GA]t)]\right\}. \quad (9.6)$$

Introduzindo a equação (9.5) obtém-se a expressão simplificada:

$$[AM_1^-] = [GA] \exp(-\bar{v}). \quad (9.7)$$

Generalizando a análise para a adição de  $n-1$  unidades monoméricas do sítio ativo  $[AM_{1-}]$ , obtém-se:

$$[AM_n^-] = [GA] \bar{v}^{n-1} \frac{\exp(-\bar{v})}{(n-1)!}. \quad (9.8)$$

A razão entre o número de cadeias com grau de polimerização  $n(N_n)$  e o número total de cadeias ( $N$ ) pode ser escrito como:

$$\frac{N_n}{N} = \frac{[AM_n^-]}{[GA]} = \frac{\bar{v}^{n-1} \exp(-\bar{v})}{(n-1)!}. \quad (9.9)$$

A expressão (9.9) representa a distribuição de Poisson. A estreita distribuição de pesos moleculares observada na análise por cromatografia de permeação em gel é justificada, portanto, pela polimerização aniônica do glicidol.

Por sua vez, o índice de polidispersão no peso molecular é dado por:

$$\frac{M_w}{M_n} = 1 + \frac{\bar{\nu}}{(\bar{\nu} + 1)^2} . \quad (9.10)$$

Substituindo o valor  $M_w/M_n$  obtido pela análise GPC, obtém-se um valor de  $\nu \approx 20$ . O comprimento cinético de cadeia,  $\nu$ , é uma medida do número médio de unidades monoméricas reagindo com um sítio ativo durante seu tempo de meia-vida e pode ser relacionado com a velocidade de reação de propagação por:

$$\bar{\nu} = \frac{k_p^2 [M]^2}{2k_t \nu_p} , \quad (9.11)$$

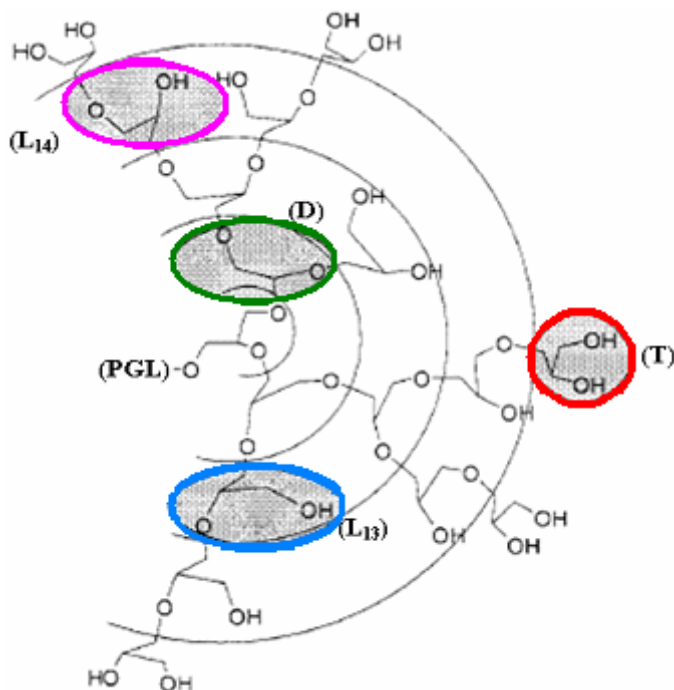
sendo que  $k_p$ ,  $k_t$  e  $\nu_p$  representam as constantes cinéticas de propagação, terminação e a velocidade de propagação, respectivamente.

A equação (9.11) mostra que  $\nu$  é inversamente proporcional à concentração de radicais, ou seja; o comprimento das ramificações pode ser controlado alterando-se a concentração do iniciador.

No processo de polimerização do glicidol para obtenção do poliglicerol dendrítico, as unidades epoxídicas que vão incorporando-se às cadeias poliméricas em crescimento podem apresentar ligações éter, grupos hidroxilas terminais na periferia do dendrímero e carbono assimétrico ou pseudoassimétrico, uma vez que, em geral, não possuem atividade ótica em função da natureza macromolecular dos substituintes.

A massa molecular de um dendrímero pode ser relacionada ao número de gerações através da expressão (4.1) [3]. Substituindo os dados obtidos para o PGLD obtido neste trabalho a saber:  $M \approx 20000 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_c \approx 550 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_m \approx 59 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_t \approx 16 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $n_c = 12$ ,  $n_m = 2$ , obtém-se um número de geração para o PGLD aproximadamente igual a 5,0.

A utilização do poliglicerol (PGL) como núcleo de crescimento no processo de síntese divergente gera a estrutura dendrítica com uma elevada densidade de grupos hidroxilas na periferia da macromolécula, como ilustrado na Figura 9.5.



**Figura 9.5** – Estrutura esquemática do políglicerol com estrutura dendrítica. L<sub>14</sub>, L<sub>13</sub>, D e T significam ligações lineares, estruturas dendríticas e grupos terminais, respectivamente.

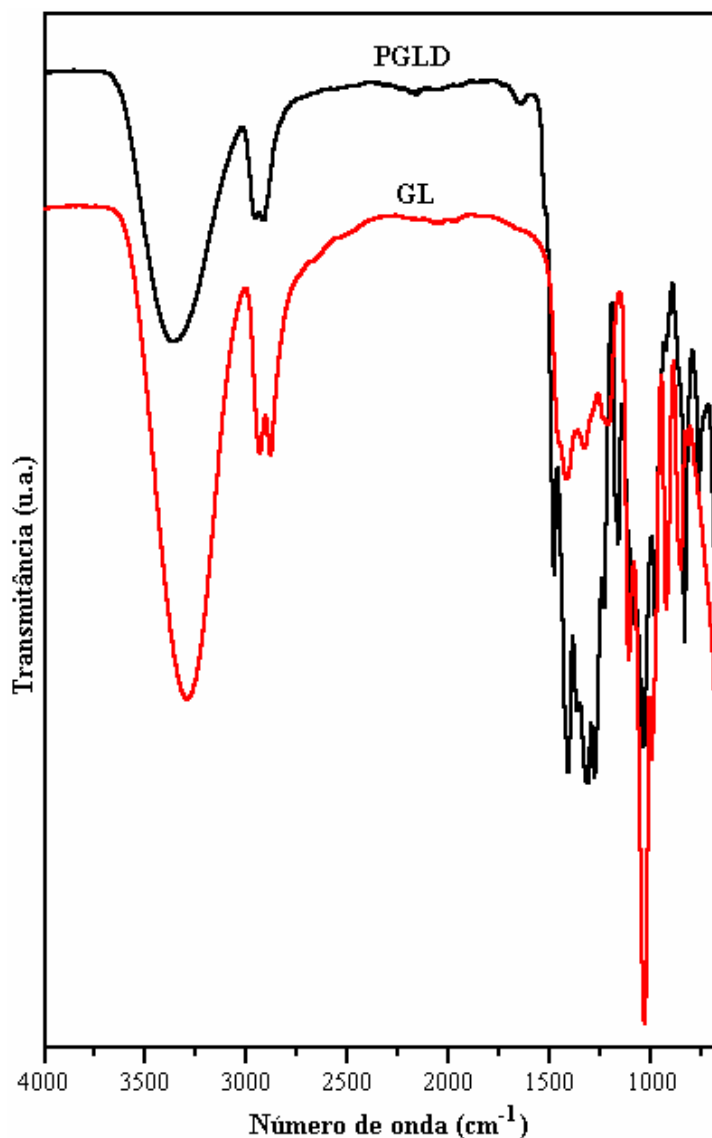
### 9.1.2 – Caracterização espectroscópica (FTIR, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>1</sup>H-RMN)

A espectroscopia vibracional (FTIR) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são ferramentas importantes para a caracterização de estruturas dendríticas, uma vez que a análise detalhada dos espectros fornece informações acerca da caracterização e confirmação da estrutura dendrítica.

A Figura 9.6 apresenta o espectro FTIR para a glicerina (GL) e para o dendrímero PGLD em um intervalo de 4000 a 637,9  $cm^{-1}$ . No espectro FTIR da GL, a banda de absorção em 3267  $cm^{-1}$  corresponde à frequência vibracional característica das hidroxilas (-OH) presentes nesta molécula. E, as bandas de absorção em 2850  $cm^{-1}$  e 1434  $cm^{-1}$  caracterizam, respectivamente, as frequências de vibração para os grupos CH e CH<sub>2</sub>. Já no espectro FTIR do dendrímero de políglicerol, as bandas de absorção em 3334  $cm^{-1}$  e 2900  $cm^{-1}$  caracterizam, respectivamente, a frequência vibracional correspondente aos grupos hidroxilas terminais presentes na periferia do dendrímero e ao grupo CH. Para o dendrímero PGLD, o grupo CH<sub>2</sub> é caracterizado pelas bandas de absorção em 1483  $cm^{-1}$  e 1434  $cm^{-1}$ . A banda de

absorção em  $1095\text{cm}^{-1}$  caracteriza a frequência de vibração da ligação C-O em ambos os espectros [4].

Observa-se nos espectros de FTIR uma significativa alteração na região correspondente ao de intervalo que vai de  $1300\text{cm}^{-1}$  a  $1000\text{cm}^{-1}$  como conseqüência da reação de eterificação da glicerina.



**Figura 9.6** – Espectro FTIR da glicerina (GL) e do PGLD sintetizado neste trabalho.

A Figura 9.7 ilustra o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o poliglicerol de estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho.

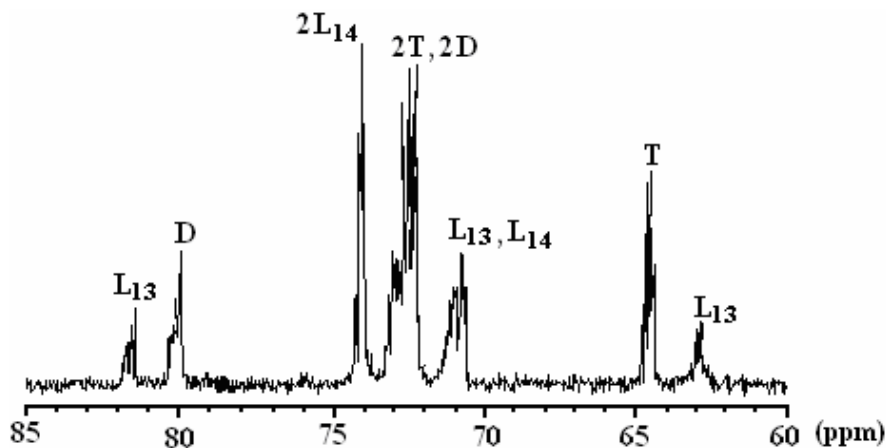


Figura 9.7 – Espectro RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) do PGLD sintetizado neste trabalho.

Quatro unidades estruturais podem ser distinguidas na estrutura dendrítica:

1. Se a propagação ocorreu através de hidroxilas secundárias uma unidade linear do tipo 1,3 é formada ( $L_{13}$ ).
2. Se hidroxilas primárias sofrem propagação, uma correspondente unidade linear 1,4 ( $L_{14}$ ) é formada.
3. Se ambas as hidroxilas reagem com o monômero, uma unidade dendrítica (D) é formada e a cadeia polimérica é ligada às hidroxilas secundárias.
4. Se o monômero sofre alguma desativação por troca de próton, uma unidade terminal (T) com duas hidroxilas é formada.

A Tabela 03 indica as atribuições efetuadas ao espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN do dendrímero obtido neste trabalho. Os dados obtidos podem ser utilizados na determinação do grau de ramificação ( $G_R$ ) da macromolécula. O grau de ramificação é uma medida que indica a tendência das ramificações criadas durante a etapa de propagação em gerar estruturas dendríticas. Para estruturas lineares o grau de ramificação ( $G_R$ ) é igual à zero ( $G_R = 0$ ), para uma reação de policondensação ao acaso,  $G_R = 0,5$ , e, finalmente, para a formação de uma estrutura dendrítica,  $G_R = 1,0$ .

O grau de ramificação pode ser calculado a partir das intensidades dos picos no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN através da equação:

$$G_R = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}}, \quad (9.12)$$



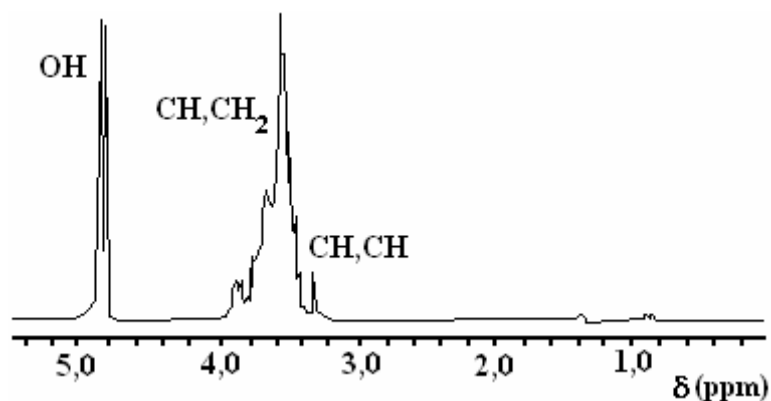
sendo  $G_R$  o grau de ramificação e D,  $L_{13}$  e  $L_{14}$  representam as contribuições das frações dendríticas e lineares presentes no polímero, respectivamente.

O valor obtido neste trabalho,  $G_R = 0,80$ , indica que a lenta adição do alcoóxico promoveu a formação da estrutura dendrítica.

**Tabela 03** – Análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para o PGLD sintetizado neste trabalho.  
Solvente:  $^d\text{DMSO}$ , temperatura:  $25^\circ\text{C}$ .

Região da Molécula	Grupo funcional	Deslocamento (ppm)	Integral relativa
$L_{13}$	$\text{CH}_2\text{OH}$	62,9	0,85
	$\text{CH}_2$	71,2	
	$\text{CH}$	81,6	
D	$\text{CH}$	80,2	6,31
	$\text{CH}_2$	73,0	
	$\text{CH}_2$	72,4	
$L_{14}$	$\text{CH}_2$	74,0	2,12
	$\text{CHOH}$	70,9	
T	$\text{CH}_2\text{OH}$	64,5	4,31
	$\text{CHOH}$	71,3	
	$\text{CH}_2$	72,4	

O espectro  $^1\text{H}$ -RMN do PGLD, Figura 9.8, é menos informativo que o espectro de carbono, mas pode-se notar claramente a incorporação do glicidol. Os sinais dos grupos metil e metileno a 0,9 e 1,4 *ppm*, respectivamente, são devidos ao glicidol. Os quatro prótons metilênicos e um próton relativo ao grupo metino do PGLD aparecem como uma larga ressonância entre 3,3 e 3,9 *ppm*. Os prótons relativos ao grupo hidroxila geram um sinal a 4,8 *ppm*.



**Figura 9.8** – Espectro RMN de próton ( $^1\text{H}$ ) do PGLD sintetizado neste trabalho.

### 9.1.3 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e comportamento reológico

Um polímero pode existir em três estados físicos: vítreo, altamente elástico e fluído viscoso. É importante ressaltar que a passagem de um estado físico a outro não ocorre em uma temperatura definida, mas em um certo intervalo de temperaturas onde existe uma variação gradual nas propriedades termodinâmicas do material. Neste caso, os valores médios da temperatura na região de transição são denominados de temperatura de transição [5].

A transição do estado vítreo para o estado altamente elástico é denominada de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e, se associa a este estado a estrutura de um líquido super-resfriado. A temperatura de  $T_g$  é comumente associada a uma transição de fase de segunda ordem uma vez que os potenciais termodinâmicos são contínuos, mas a primeira e segunda derivada são caracterizadas por exibirem uma variação brusca com a temperatura, ou seja:

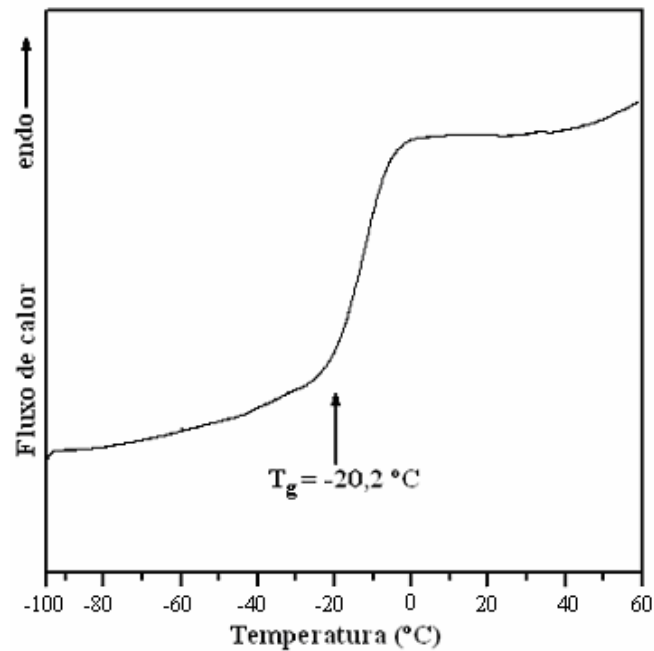
$$\frac{\partial^2 G}{\partial P^2} = \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T; \frac{\partial^2 G}{\partial P \partial T} = \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_P; \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = \frac{c_p}{T}. \quad (9.13)$$

A temperatura de transição vítrea pode ser medida experimentalmente pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica que tem sido amplamente utilizada na obtenção de informações relativas ao estado sólido das substâncias macromoleculares [6]. Portanto, na transição de fase correspondente à temperatura vítrea ( $T_g$ ), a técnica DSC exibirá uma resposta endotérmica correspondente a uma variação na capacidade calorífica do material.

Embora exista uma certa controvérsia com relação ao equilíbrio de fases em um sistema macromolecular, existe um consenso no meio científico de que a  $T_g$  de um material polimérico está diretamente relacionado às interações intermoleculares de longo ou curto alcance bem como interações intramoleculares na cadeia da macromolécula [7].

A natureza da estrutura dendrítica com relação à existência de grupos funcionais polares ou apolares na periferia da macromolécula exerce uma influência significativa nas propriedades macroscópicas do polímero destacando-se a temperatura de transição vítrea e seu comportamento reológico.

A Figura 9.9 mostra a curva de DSC para o poliglicerol com estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho. A baixa temperatura de transição vítrea observada ( $T_g = -20,2^\circ C$ ) indica que o PGLD sintetizado é adequado para o revestimento de superfícies devido à sua elevada flexibilidade à temperatura ambiente, característica desejável para o revestimento de dispositivos cardiovasculares.



**Figura 9.9** – Curva DSC para o PGLD sintetizado neste trabalho.

De acordo com a referência [8], a reologia tem como principal objetivo o estudo da deformação e fluxo da matéria, os quais envolvem fenômenos de elasticidade, plasticidade e viscosidade.

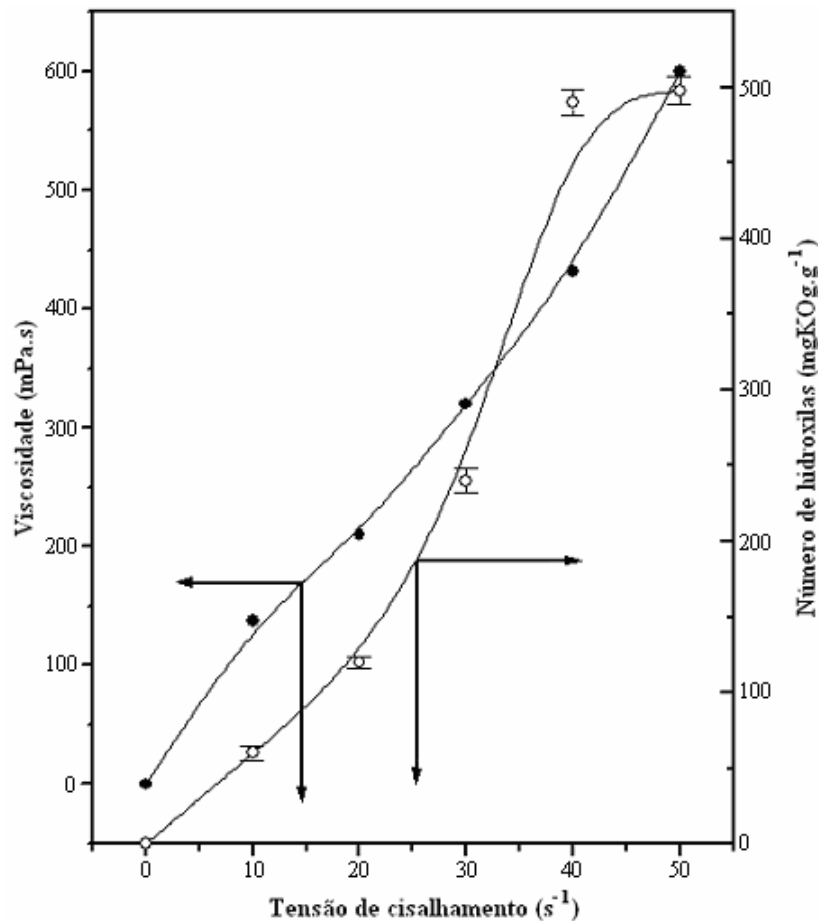
Os fluídos podem ser classificados reologicamente como fluídos newtonianos ou fluídos não-newtonianos. Aqueles que são classificados como fluídos newtonianos, apresentam uma relação linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento, como mostrado na equação de Newton:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}, \quad (9.14)$$

onde  $\eta$  é a viscosidade do fluído,  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento e  $\dot{\gamma}$  é a taxa de cisalhamento. Ou seja, a viscosidade mantém-se constante com a variação na taxa de cisalhamento.

Enquanto que, os fluídos não-newtonianos do tipo pseudoplástico são aquelas substâncias que, em repouso, apresentam suas moléculas em um estado desordenado, e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada [8,9].

O comportamento reológico do PGLD é mostrado na Figura 9.10. Como pode ser observado, a macromolécula não apresenta pseudoplasticidade comportando-se como um fluído newtoniano. A dependência da viscosidade em função da tensão de cisalhamento pode ser associada a uma possível interação por ligação de hidrogênio na macromolécula. Esta mesma dependência é observada entre o número de hidroxila e a tensão de cisalhamento.



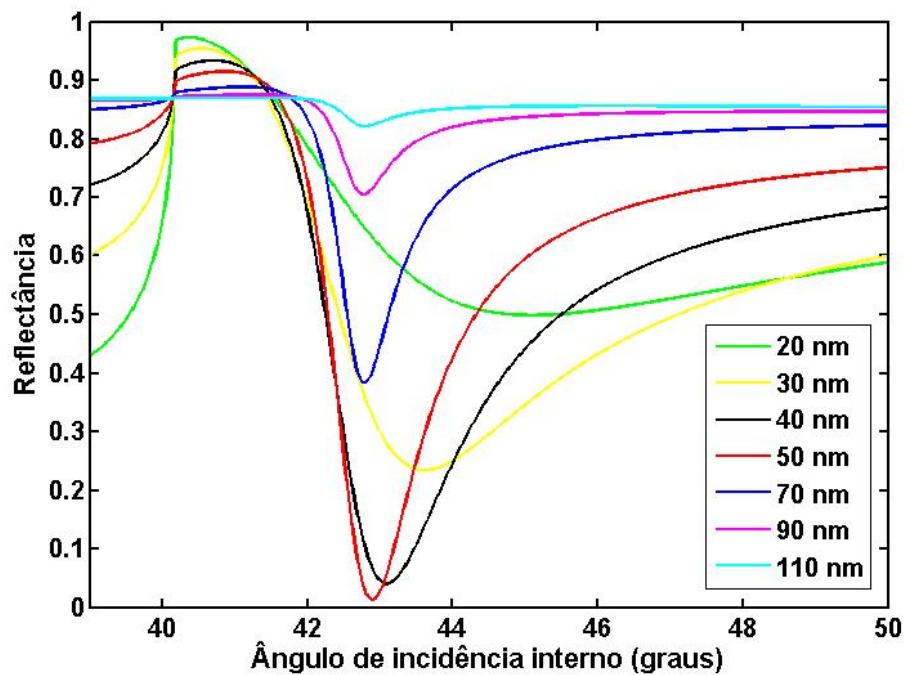
**Figura 9.10** – Comportamento reológico do PGLD.

## 9.2 – Influência dos parâmetros óticos de filmes de ouro depositados sobre substratos de vidro

Para ilustrar de que forma os parâmetros óticos do filme metálico de ouro depositado influenciam a reflectância, será inicialmente apresentado o resultado de algumas simulações

de espectros RPS com base nas equações descritas no Capítulo 6. Estas simulações foram realizadas a partir do *software MATLAB 7.0*.

Inicialmente foram realizadas simulações a fim de verificar a influência da espessura do filme metálico (ouro) sobre a dependência angular da reflectância. Uma vez que a espessura do filme tem como objetivo aumentar as perdas de energia do sistema, é importante observar como este parâmetro influencia no comportamento da curva RPS. A estrutura utilizada nas simulações é composta por três camadas que correspondem a um prisma de vidro, um filme metálico de ouro e o ar. O comprimento de onda do laser utilizado nesta simulação foi igual ao experimental ( $\lambda = 632,8nm$ ). O índice de refração do prisma e a constante dielétrica do filme de ouro foram  $n_p = 1,55$  e  $\epsilon = -10,5 + 1,50i$ , respectivamente. A Figura 9.11 mostra o resultado das simulações com curvas correspondendo a filmes de ouro de espessuras 20, 30, 40, 50, 70, 90 e 110 nm, respectivamente.



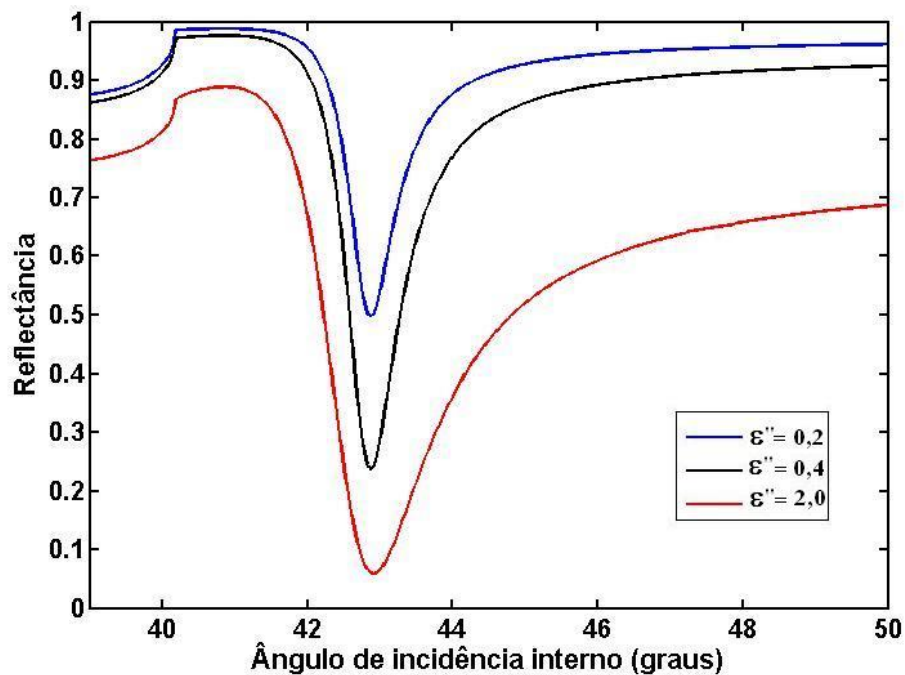
**Figura 9.11** – Simulação computacional da influência da espessura do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).

Observa-se através dessas simulações que a espessura dos filmes metálicos altera o valor mínimo da reflectância, a posição angular desse mínimo e a largura de linha da ressonância como apresentado através das equações no capítulo 6. Além disso, a espessura

ótima do filme metálico de ouro encontra-se por volta de  $50nm$  conforme pode ser observado na Figura 9.11.

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

Um outro parâmetro importante é a parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico. A Figura 9.12 ilustra a influência da variação da parte imaginária da constante dielétrica do filme de ouro ( $\epsilon'' = 0,2$ ;  $\epsilon'' = 0,4$ ;  $\epsilon'' = 2,0$ ) sobre a dependência angular da reflectância. Estas simulações correspondem também a uma estrutura de três camadas (prisma, filme de ouro, ar). A espessura foi fixada em  $d = 50nm$  e com a parte real da constante dielétrica do filme fixada em  $\epsilon' = -10,5$ . Observa-se que a parte imaginária da constante dielétrica influencia a largura de linha da ressonância, bem como o grau de acoplamento do campo incidente com os plásmons de superfície (PS). É importante notar que a largura de linha da ressonância aumenta com a absorção, representada pelo valor do parâmetro  $\epsilon''$ .



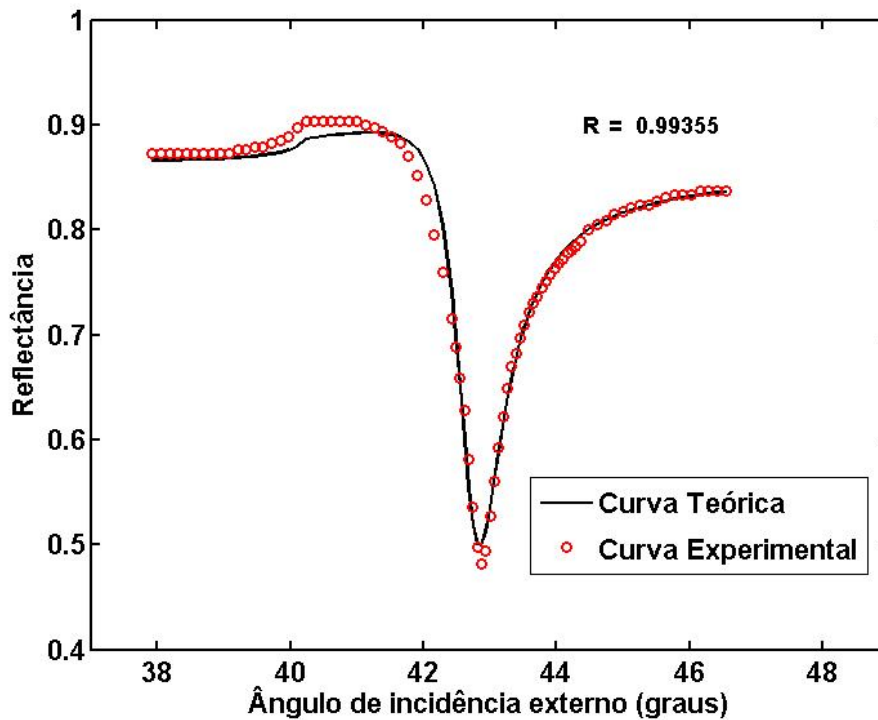
**Figura 9.12** – Simulação computacional da influência da parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).

Estes resultados são importantes devido ao fato de que a quantificação da adsorção de proteínas séricas sobre a superfície de filmes finos dendríticos leva em consideração os parâmetros óticos do filme metálico. Um outro fator importante é que a sensibilidade dos sensores baseados em RPS está diretamente relacionada com os parâmetros óticos do filme metálico. Além disso, o procedimento experimental adotado para a deposição de filmes finos metálicos, exerce uma influência significativa na resposta do biossensor. Neste sentido, a limpeza do substrato de vidro e a topologia do filme metálico depositado podem contribuir significativamente para o espectro RPS contribuindo para um falso resultado do processo de adsorção.

### 9.3 – Caracterização do filme metálico por RPS

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

A Figura 9.13 ilustra o espectro RPS para o filme de ouro de uma das lâminas que foram preparadas pela técnica de evaporação. A partir do modelo matemático, concomitantemente com o ajuste de curva baseado no método das correções diferenciais, foi possível estimar os valores da espessura e da constante dielétrica do filme metálico. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $\varepsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412) + 1,32i(\pm 0,214)$  e  $d = 77,8(\pm 1,21)nm$ , com um coeficiente de correlação igual a  $R = 0,99355$ .



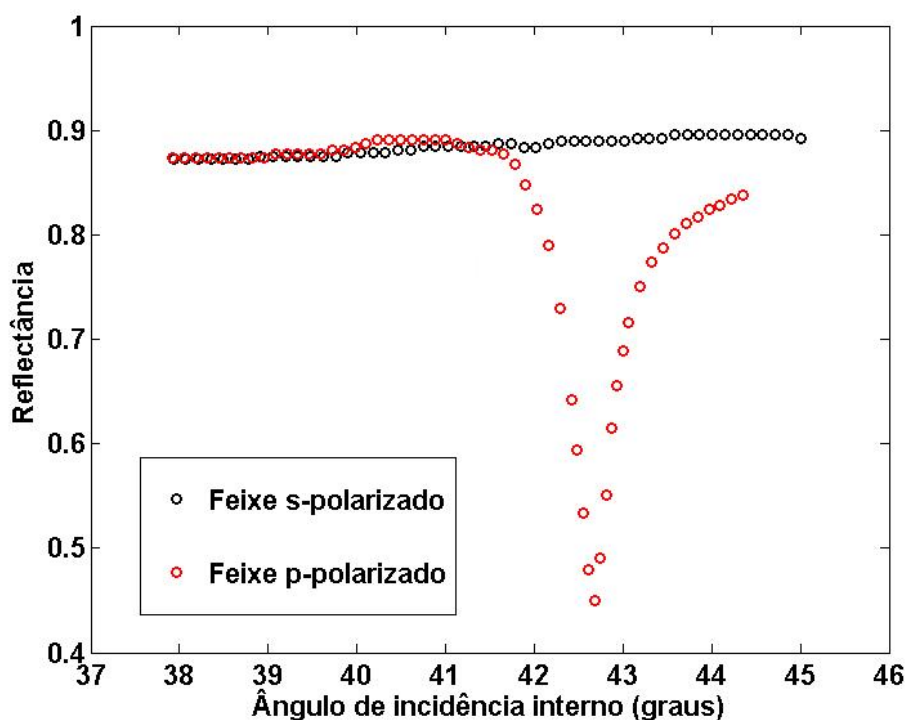
**Figura 9.13** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces. A curva pontilhada em vermelho representa o espectro RPS obtido experimentalmente e a curva em preto o ajuste de curva obtido através do método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $\epsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412) + 1,32i(\pm 0,214)$  e  $d = 77,8(\pm 1,21)nm$ , com um coeficiente de correlação igual a  $R = 0,99355$ .

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

Uma das condições necessárias para o confinamento dos PS é a exigência de que o feixe de luz incidente a interface prisma-metal seja p-polarizado, ou seja, que a polarização esteja contida no plano ótico da interface. A fim de verificar se a polarização do feixe de luz do aparato experimental descrito na seção (8.4) encontrava-se corretamente ajustada, foram realizados experimentos a fim de se obter a melhor polarização que permitisse o maior confinamento dos PS o qual está diretamente relacionado com a sensibilidade do sensor.

A Figura 9.14 apresenta dois espectros RPS com duas diferentes polarizações do feixe de luz incidente. Observa-se que apenas na curva em vermelho há o acoplamento dos PS indicado pela perda de energia da radiação incidente ao refletir na interface prisma-metal. Portanto, com este experimento foi possível ajustar a polarização do feixe de luz incidente a fim de se obter a resposta máxima do sensor.





**Figura 9.14** – Espectros RPS obtidos experimentalmente. A curva em vermelho representa o espectro para a fonte de laser p-polarizada e a curva em preto para o feixe s-polarizado.

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

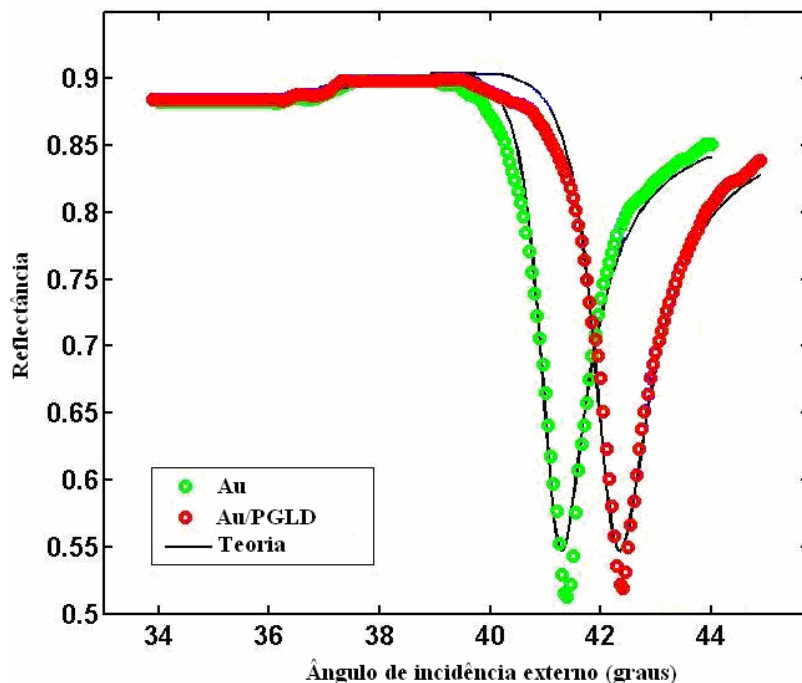
Antes da apresentação dos resultados experimentais da adsorção das proteínas séricas sobre a superfície do dendrímero PGLD faz-se necessário entender a interação entre o dendrímero PGLD e o filme de ouro evaporado sobre um substrato de vidro.

### 9.5.1 – Adsorção do dendrímero PGLD sobre a superfície do filme de ouro

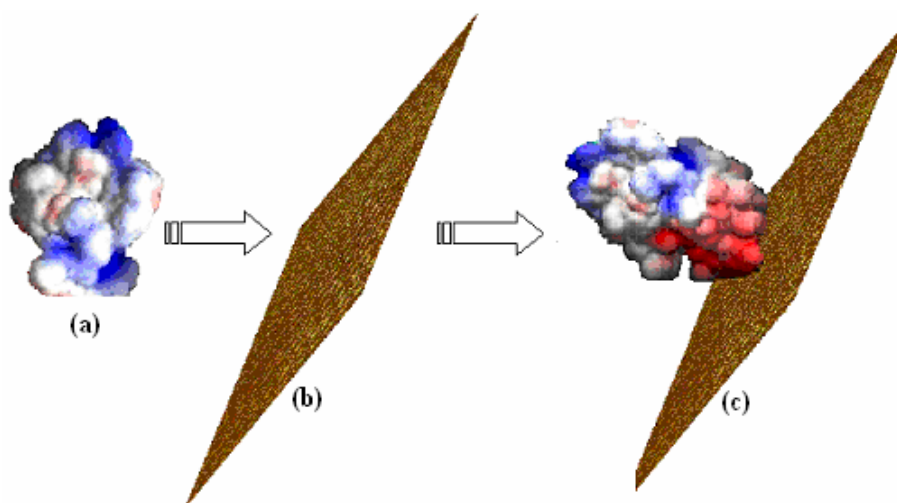
A quantificação da adsorção do dendrímero de PGLD sobre a superfície do filme de ouro foi realizada através de espectroscopia RPS. A Figura 9.15 ilustra os espectros RPS para o filme de ouro e para o filme de ouro revestido com PGLD. Observa-se que os parâmetros  $R_{min}$ ,  $W_{PS}$  e  $\theta_{PS}$  são alterados quando o filme dendrítico é adsorvido sobre a superfície do filme de ouro.

Esta adsorção pode ser atribuída ao deslocamento da nuvem eletrônica do dendrímero de PGDL (redistribuição de carga) provocada pela presença do filme de ouro quando este é imerso na solução. Este deslocamento provoca uma interação do tipo dipolo-dipolo entre a

parte externa da molécula de PGLD e a superfície do filme de ouro evaporado sobre o substrato de vidro. A interação eletrostática entre o filme de ouro e o dendrímero de PGLD está ilustrada na Figura 9.16.



**Figura 9.15** – Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro, a curva em vermelho representa o espectro RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e as curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.



**Figura 9.16** – (a) Distribuição de cargas no dendrímero PGLD em solução PBS, pH 7,4, (b) superfície de ouro e em (c) o dendrímero interagindo eletrostaticamente com a superfície do ouro. A cor vermelha representa a distribuição de cargas positivas e as azuis a distribuição de cargas negativas.

### 9.5.2 – Adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PGLD

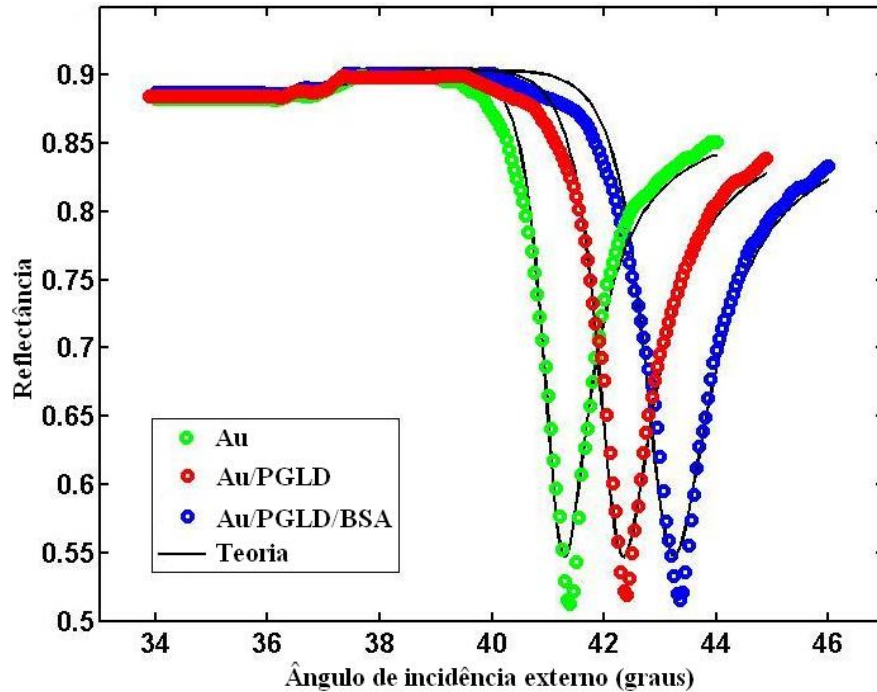
Um importante procedimento para o estudo da adsorção de proteínas sobre superfícies sintéticas é verificar o comportamento da adsorção através das isotermas de Langmuir e Freundlich. Neste sentido, foram realizados experimentos RPS variando-se a concentração da solução protéica a fim de se obter uma curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do dendrímero PGLD em função da concentração. A Tabela 04 ilustra os parâmetros óticos utilizados para a obtenção da espessura das camadas metálica, dendrítica e protéica.

**Tabela 04** – Parâmetros experimentais.

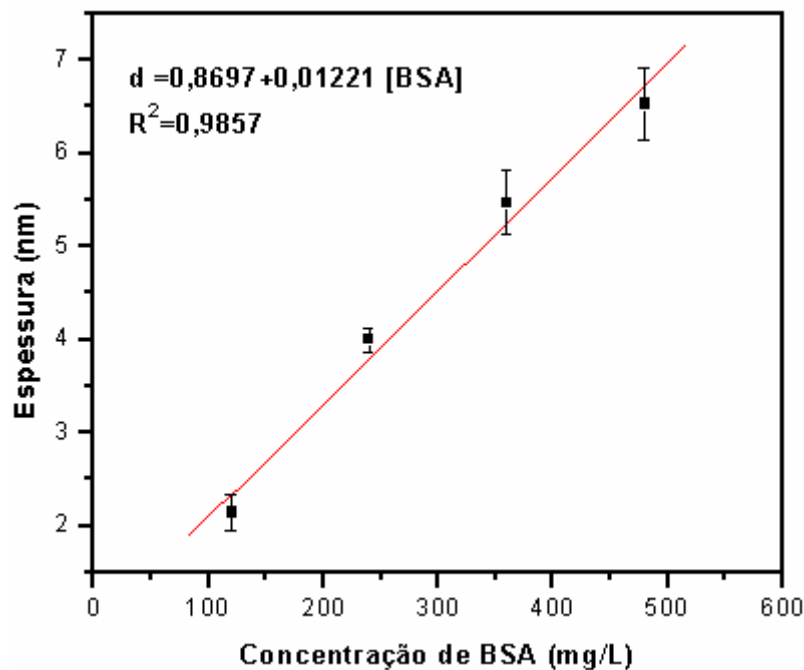
Comprimento de onda do laser	$\lambda = 632,8nm$
Índice de refração do prisma	$n_0 = \sqrt{\varepsilon_0} = 1,550$
Índice de refração do líquido casador	$n_1 = \sqrt{\varepsilon_1} = 1,495$
Espessura do líquido casador	$d_1 = 2nm$
Índice de refração do PGLD	$n_3 = \sqrt{\varepsilon_3} = 1,482$
Índice de refração das proteínas	$n_4 = \sqrt{\varepsilon_4} = 1,520$
Índice de refração do ambiente	$n_5 = 1,0$

A Figura 9.17 apresenta os espectros RPS para o filme de ouro, para o PGLD adsorvido sobre a superfície do ouro e para a solução de BSA com concentração de  $1,4mg/L$ . Observa-se através da figura que quando o filme de ouro é colocado em contato com a solução dendrítica ocorre o processo de adsorção que pode ser quantificado através da alteração dos parâmetros  $R_{min}$ ,  $W_{PS}$  e  $\theta_{PS}$  durante este processo. O mesmo é observado quando o eletrodo contendo o filme de ouro e o dendrímero PGLD é colocado em contato com a solução de BSA.

Com os valores da espessura e do índice de refração obtidos através do programa computacional descrito na seção (8.6), foi construída uma curva de calibração da espessura em função da concentração de proteína como mostrado na Figura 9.18. Observa-se uma alta linearidade entre a espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do filme dendrítico e a concentração da mesma.



**Figura 9.17** – Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína BSA sobre o filme de PGLD. As curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.



**Figura 9.18** – Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do PGLD em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

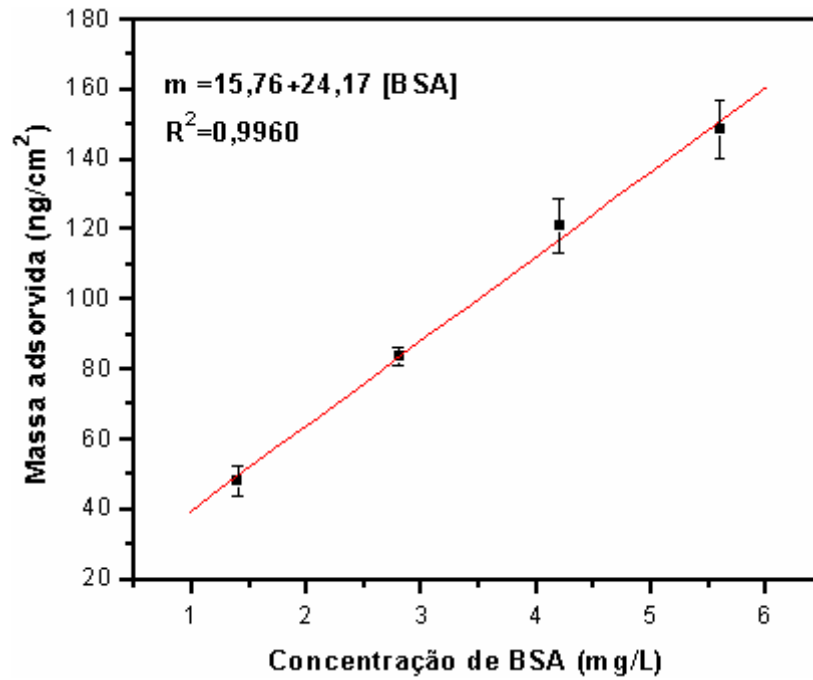
A partir da reta obtida e da equação de Feijter [10] foi possível converter espessura em massa de proteína adsorvida sobre a superfície do filme polimérico e verificar qual a isoterma foi predominante durante o processo de adsorção. A equação de Feijter relaciona a espessura da camada de proteína adsorvida sobre a superfície do dendrímero ( $d_p$ ) e os índices de refração da proteína ( $n_p$ ) e do substrato de PGLD ( $n_s$ ) no qual a proteína será adsorvida, através da seguinte equação matemática:

$$m = d_p \frac{n_p - n_s}{\partial n / \partial C} \quad (9.15)$$

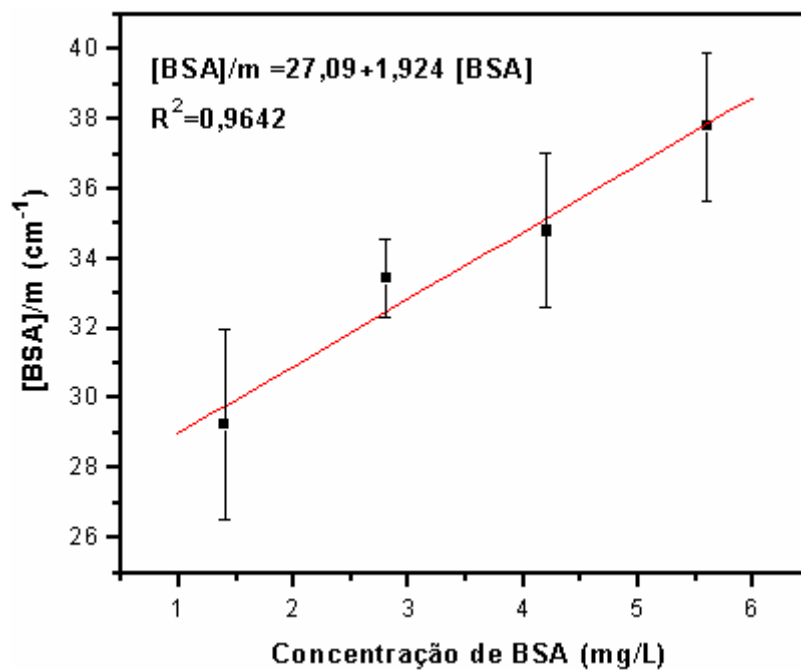
sendo  $\frac{\partial n}{\partial C}$  é o incremento do índice de refração das moléculas o qual pode ser medido através de um refratômetro diferencial. Os valores de  $d_p$ ,  $n_p$  e  $n_s$  foram obtidos através do aparato experimental montado em nosso laboratório.

Para proteínas séricas, o incremento do índice de refração é  $0,183 \text{ cm}^3/\text{g}$  [11,12]. A partir destes dados foi possível estimar a quantidade de massa de proteína adsorvida sobre a superfície do dendrímero PGLD como pode ser observado através da Figura 9.19.

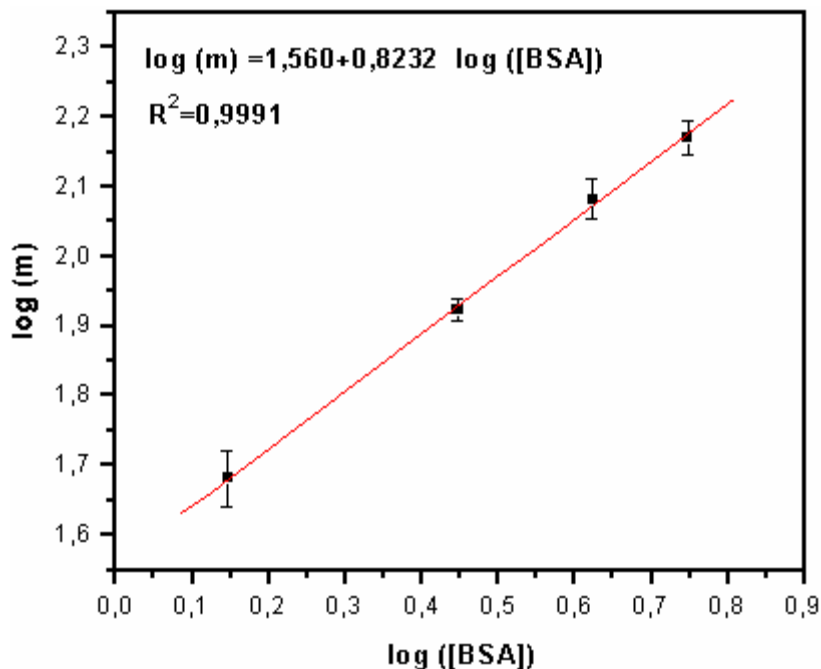
Com o auxílio das equações (3.3) e (3.8) foram construídos os gráficos das isotermas de Langmuir e Freundlich apresentados nas Figuras 9.20 e 9.21. A partir dos ajustes de curva linear, foi possível determinar os parâmetros  $b$ ,  $m_{max}$  para as isotermas de Langmuir e  $n$  e  $k_F$  para a isoterma de Freundlich. Os valores são apresentados na Tabela 05.



**Figura 9.19** – Curva de calibração da massa de BSA adsorvida na superfície do PGLD em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 9.20** – Isoterma de Langmuir para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 9.21** – Isoterma de Freundlich para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

**Tabela 05** – Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 280k.

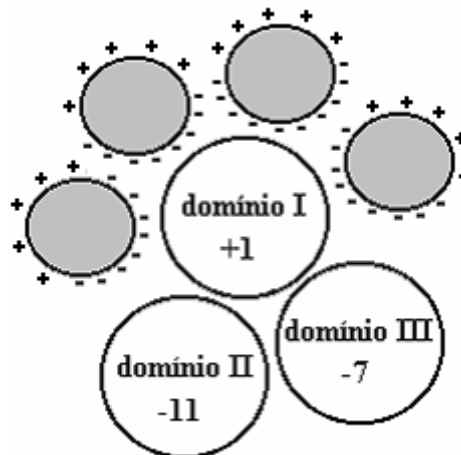
Langmuir			Freundlich		
$b(L/g)$	$m_{\max}(\mu g/cm^2)$	$R^2$	$n$	$k_F(cm)$	$R^2$
71,02	0,5198	0,9642	1,215	36,31	0,9991

A partir do coeficiente de correlação pode-se determinar a isoterma predominante no processo de adsorção de proteínas séricas sobre o dendrímero PGLD. Neste sentido, a isoterma que melhor representa o processo de adsorção de BSA em filmes finos de PGLD foi à isoterma de Freundlich. Este resultado indica que há formação de multicamadas protéicas adsorvidas sobre o filme dendrítico de poliglicerol. Além disso, o processo de adsorção é favorável tendo em vista que a constante de linearidade da isoterma de Freundlich é igual a  $n = 1,215$ .

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

A partir dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir em conjunto com a equação (3.4) foi possível determinar o valor da Energia Livre de Gibbs de adsorção. O valor obtido foi de  $-27,66 \text{ kJ/mol}$ . Este valor implica em um processo de adsorção espontâneo e, além disso, uma boa interação entre o dendrímero PGLD e a proteína sérica BSA.

A interação entre o dendrímero PGLD e a proteína sérica BSA pode ser explicada através de interações eletrostáticas [11]. Em pH 7,4 (pH do sangue), a proteína sérica BSA possui três domínios com uma carga líquida igual a -17. No entanto, o domínio I da molécula de BSA está carregado positivamente (+1). Como ocorre uma redistribuição de carga na macromolécula de PGLD, quando este entra em contato com o ouro, há uma interação entre as cargas positivas do domínio I da molécula de BSA e as cargas negativas do dendrímero PGLD (Figura 9.22), o que favorece a interação entre o dendrímero e a proteína sérica. Todavia, esta interação não é muito forte devido à repulsão eletrostática gerada pelos domínios II e III da molécula protéica.

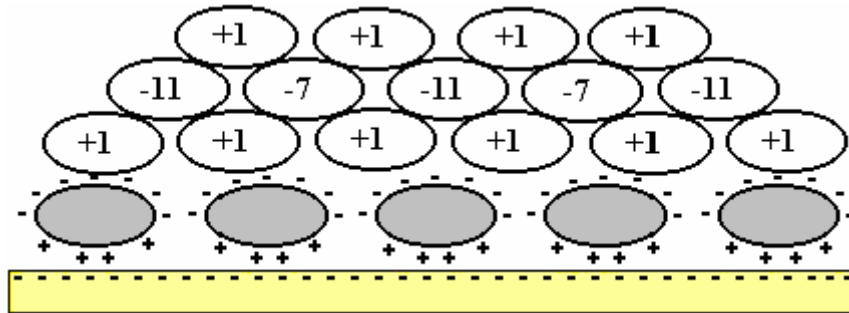


**Figura 9.22** – Modelo de interação entre a proteína sérica BSA e o dendrímero PGLD. Os círculos em cinza representam o dendrímero PGLD com os seus respectivos grupos hidroxilas terminais protonados (pH = 7,0) e os três círculos em branco representam os três domínios da proteína BSA.

No entanto, a interação eletrostática entre a região carregada negativamente na superfície do dendrímero PGLD e a carga positiva do domínio I proporcionam uma mudança conformacional. Esta mudança favorece a formação de multicamadas da proteína sérica BSA



sobre a superfície do dendrímero PGLD (empacotamento). Uma representação esquemática deste empacotamento é apresentada na Figura 9.23.

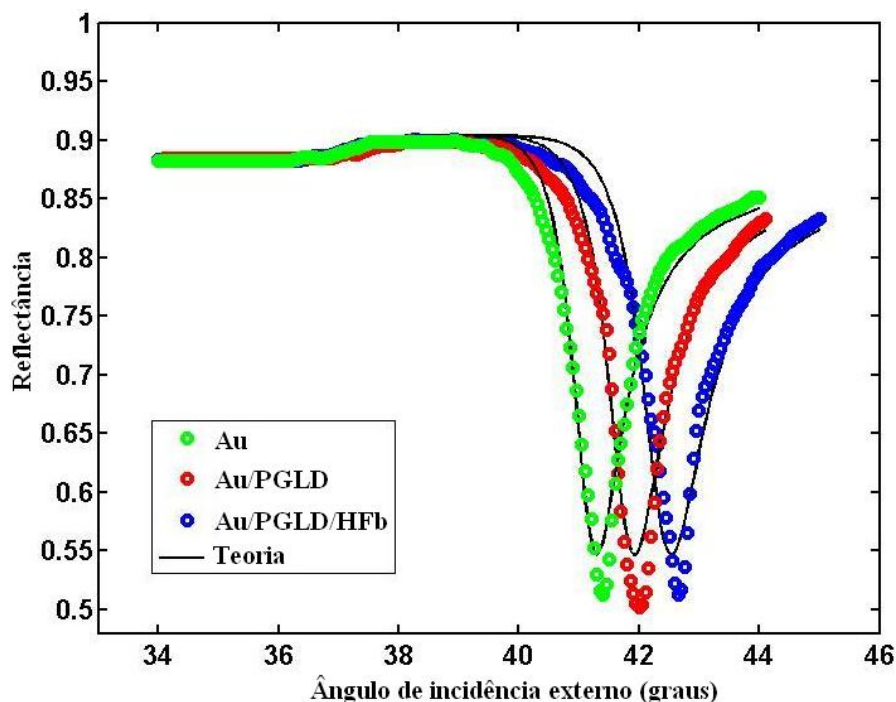


**Figura 9.23** – Diagrama representativo do empacotamento da proteína sérica BSA sobre a superfície do dendrímero PGLD. O retângulo em amarelo representa o substrato de ouro e as elipses de cor cinza e branca representam, respectivamente, a molécula do dendrímero PGLD e os domínios I, II e III que constituem a molécula da BSA.

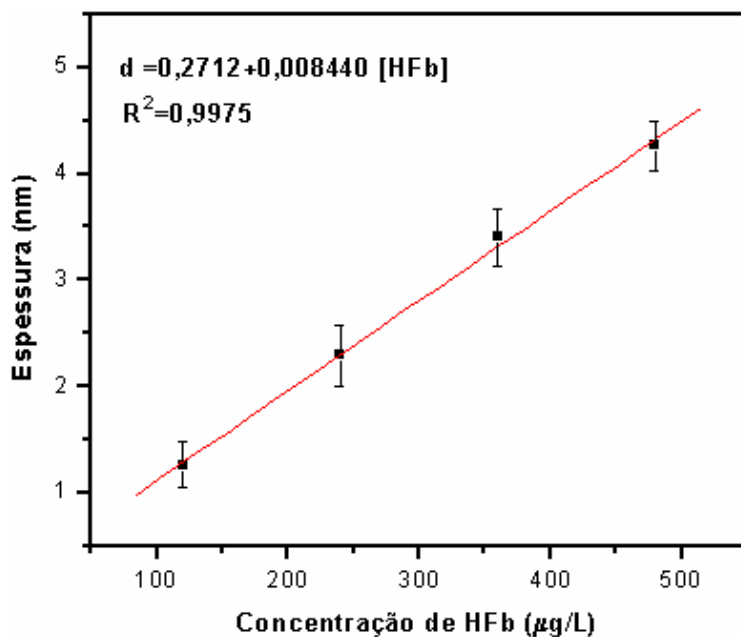
### 9.5.3 – Adsorção de HFb sobre a superfície do dendrímero PGLD

De forma análoga ao que foi realizado para a adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PGLD, a Figura 9.24 apresenta os espectros RPS para o filme de ouro, para o PGLD adsorvido sobre a superfície do ouro e para a interação entre o HFb ( $0,24 \text{ mg/L}$ ) com o PGLD. Observam-se também alterações nos parâmetros  $R_{min}$ ,  $W_{PS}$  e  $\theta_{PS}$ , como observado para a adsorção de BSA. É necessário salientar que a concentração de fibrinogênio no plasma sanguíneo humano é cerca de doze vezes menor que a concentração de albumina. Portanto, para a construção das isotermas de adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD foi mantido a mesma proporção encontrada no plasma sanguíneo humano. O mesmo é observado quando o eletrodo contendo o filme de ouro e o dendrímero PGLD é colocado em contato com a solução de HFb.

Com os valores da espessura e do índice de refração obtidos através do programa computacional descrito na seção (8.6) foi construída uma curva de calibração da espessura em função da concentração de proteína, como mostrado na Figura 9.25. Observa-se uma alta linearidade entre a espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do filme dendrítico e a concentração da mesma.



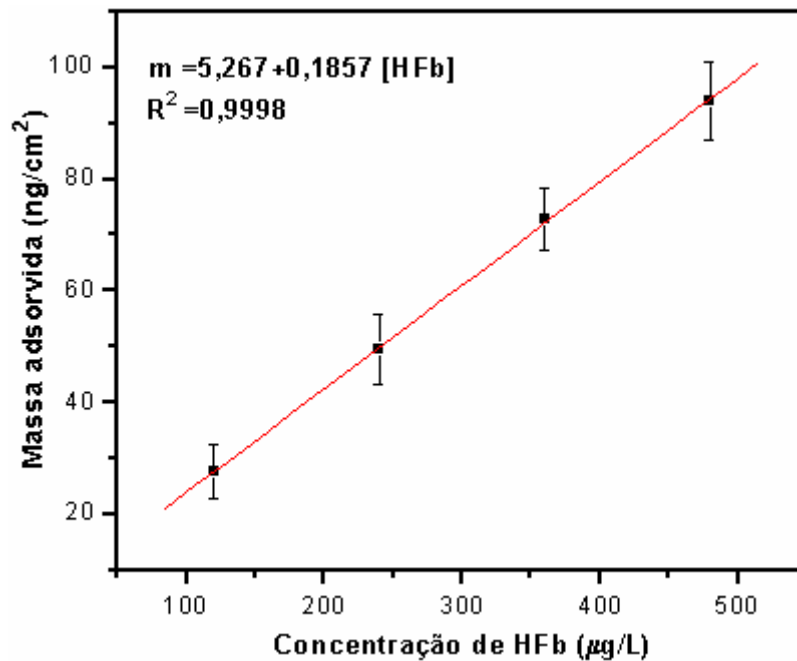
**Figura 9.24** – Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (8.4). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. A curva em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PGLD sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína HFb sobre o filme dendrítico. As curvas em preto são os ajustes de curva obtido através do método das correções diferenciais.



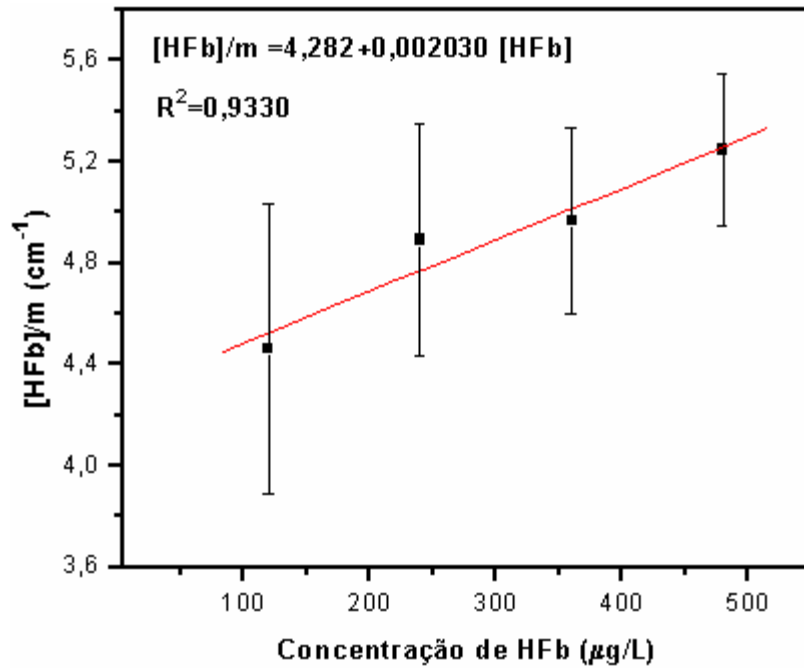
**Figura 9.25** – Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PGLD) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

De forma análoga ao que foi feito para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD, a espessura foi convertida para massa adsorvida através da equação (9.15). Os valores de  $d_p$ ,  $n_p$  e  $n_s$  foram obtidos através do aparato experimental montado em nosso laboratório. A curva convertida para massa de HFb adsorvida sobre a superfície do dendrímero PGLD é apresentada na Figura 9.26.

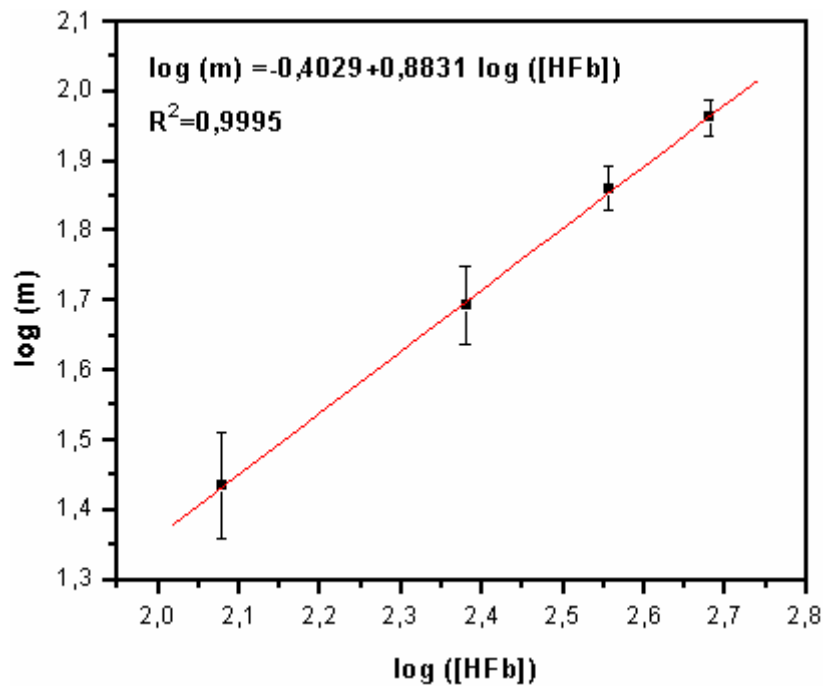
Posteriormente, com o auxílio das equações (3.3) e (3.8) foram construídos os gráficos das isotermas de Langmuir e Freundlich apresentados nas Figuras 9.27 e 9.28. A partir do ajuste de curva linear foi possível determinar os parâmetros  $b$ ,  $m_{max}$  para as isotermas de Langmuir e  $n$  e  $k_F$  para a isoterma de Freundlich. Os valores são apresentados na Tabela 06.



**Figura 9.26** – Curva de calibração da massa de HFb adsorvida na superfície do filme dendrítico de PGLD em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 9.27** – Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 9.28** – Isoterma de Freundlich para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

**Tabela 06** - Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de HFb sobre o dendrímero PGLD através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.

Langmuir			Freundlich		
$b(L/g)$	$m_{\max}(\mu g/cm^2)$	$R^2$	$n$	$k_F(cm)$	$R^2$
0,4741	492,6	0,9330	1,132	0,3955	0,9995

Assim como verificado para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PGLD a isoterma predominante no processo de adsorção de HFb também é a de Freundlich. Este resultado indica que há formação de multicamadas protéicas adsorvidas sobre o filme dendrítico de poliglicerol e que o processo de adsorção é favorável tendo em vista que a constante de linearidade da isoterma de Freundlich é maior do que 1.

A partir dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir em conjunto com a equação (3.4) foi possível determinar o valor da Energia Livre de Gibbs de adsorção do HFb sobre o dendrímero PGLD. O valor obtido foi de  $-15,25 kJ/mol$ . Este valor implica em um processo de adsorção espontâneo. No entanto, a energia livre de Gibbs de adsorção para o HFb é menor do que a energia livre de Gibbs de adsorção da BSA, o que indica uma interação muito mais pronunciada entre o PGLD dendrítico e a proteína BSA.

O baixo valor para a energia livre de Gibbs de adsorção do fibrinogênio sobre a superfície do PGLD se deve ao fato da forte repulsão entre a região carregada negativamente na superfície do PGLD e os dois domínios da molécula de fibrinogênio que fazem com que ele possua uma densidade de carga negativa em  $pH = 7.0$  [13].

#### 9.5.4 – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb

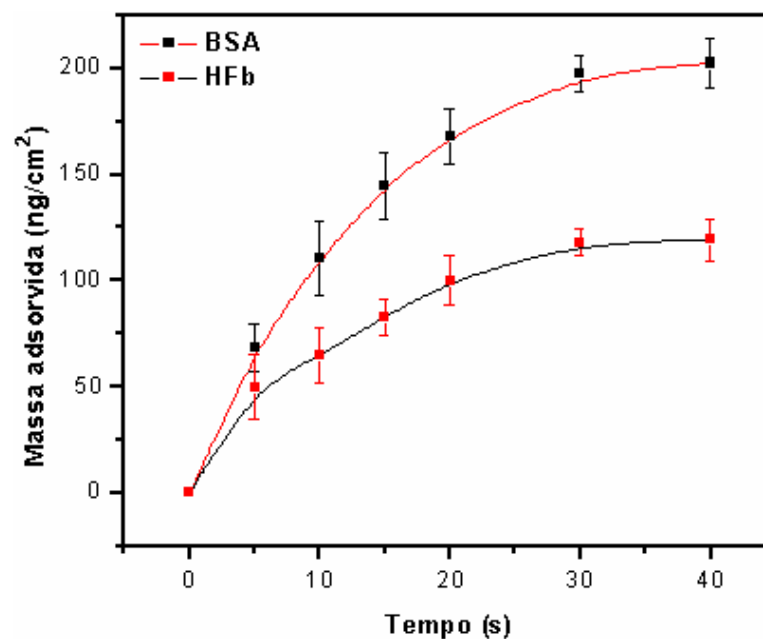
A fim de verificar a cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb foram realizados ensaios da massa adsorvida das proteínas sobre o dendrímero PGLD adsorvido sobre o substrato de ouro em função do tempo. Para o processo de adsorção de BSA foi utilizada a solução cuja concentração era de  $2,8 mg/L$  e para o HFb a solução com concentração de  $0,24 mg/L$ . De novo é necessário salientar que essa proporção de BSA/HFb

está dentro da proporção dessas proteínas encontrada no sangue. O comportamento da cinética de adsorção é apresentado na Figura 9.29.

Através da Figura 9.29, observa-se que ambos os processos de adsorção seguem uma cinética de primeira ordem. Além disso, o dendrímero PGLD possui uma maior interação com a proteína sérica BSA em condições fisiológicas. A boa interação entre a proteína BSA e o PGLD é um fator positivo para a hemocompatibilidade do dendrímero, uma vez que a molécula de BSA possui a habilidade de bloquear a subsequente adsorção das demais proteínas que possam induzir a formação de trombos [14]. Este resultado indica que, em uma adsorção competitiva, como ocorre no corpo humano, a interação entre a BSA e o PGLD contribuirá para uma minimização da adsorção de proteínas que contribuam para a formação de agregados plaquetários e o subsequente desencadeamento da cascata de coagulação.

O baixo valor para a energia livre Gibbs de adsorção do HFb concomitantemente com a elevada interação com a molécula de BSA comprovam o caráter hemocompatível do PGLD dendrítico.

A fim de complementar os resultados obtidos através da técnica RPS, foram realizados ensaios de adesão plaquetária em uma superfície de vidro e uma outra superfície de vidro revestida com o dendrímero PGLD. Os resultados são apresentados e discutidos na próxima seção.



**Figura 9.29** – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PGLD. A curva em preto representa a cinética de adsorção da BSA e a curva em vermelho a adsorção do HFb. As curvas em vermelho e preto são curvas de tendência e não ajustes numéricos. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

## 9.6 – Ensaio de adesão plaquetária

O primeiro evento decorrente da exposição de uma superfície sintética ao sangue é a adsorção de proteínas séricas seguido da adesão plaquetária na forma de monocamadas ou agregados. Estudos indicam que o processo de adesão de plaquetas envolve a interação física ou química dos receptores de membrana desta célula com a superfície do polímero sintético [15].

A interação entre a superfície sintética e o sangue envolve uma fenomenologia ainda não totalmente esclarecida pela literatura. Entretanto, sabe-se que, após exposição ao sangue, uma série de eventos de adsorção dos elementos presentes no fluido vital inicia-se na interfase macromolécula-tecido biológico. Desta maneira as propriedades físico-químicas da macromolécula, tais como presença de microdomínios hidrofílico/hidrofóbico, topologia e presença de cristálitos, são fatores que podem influenciar nas interações entre a superfície sintética e o sistema cardiovascular [16].

De uma maneira geral, a série de fatores que determinam a formação de uma interface por deposição plaquetária sobre a superfície de um biomaterial são influenciadas pela termodinâmica do sistema que, através de variações entálpicas e entrópicas, dirigem o potencial termodinâmico de Gibbs para o processo de adesão e agregação da célula sanguínea na superfície sintética [16].

Entretanto, deve-se recordar que o caráter não temporal da termodinâmica impede o estabelecimento de uma avaliação mais criteriosa da dinâmica da interação célula sanguínea-superfície sintética.

A adesão de plaquetas na superfície sintética é mediada pelo fator VII da coagulação sanguínea, podendo ser liberados alguns constituintes do agregado plaquetário dentro do plasma. Estas transformações estão sob o controle das prostaglandinas, íons  $\text{Ca}^{+2}$ , AMP e ADP. As proteínas específicas e fosfolípidos da membrana plaquetária são de importância primordial para a aceleração e controle do processo de coagulação. Por sua vez, as plaquetas aderidas sobre a superfície sintética podem ser ativadas levando ao início de um conjunto de reações complexas que conduzem à formação de trombos.

Embora mais de três décadas tenham se passado na tentativa de se estabelecer um mecanismo preciso da interação entre a plaqueta sanguínea e a superfície dos polímeros sintéticos, semelhantemente à física contemporânea, falta uma teoria unificada que seja capaz de prever tanto os processos de adesão quanto os de ativação plaquetária, independente da estrutura da macromolécula sintética em estudo.

A Figura 9.30 mostra as micrografias MEV para as superfícies dos tubos de ensaios não revestido e revestido com o dendrímero PGLD após exposição ao plasma rico em plaquetas. As superfícies revestidas com o dendrímero PGLD apresentaram poucas plaquetas aderidas comparativamente ao tubo de ensaio não revestido, evidenciando uma tendência bastante significativa do revestimento de PGLD a um comportamento hemocompatível.

Dentre os vários modelos desenvolvidos nos últimos 30 anos para a explicação das propriedades biocompatíveis de uma superfície sintética, o modelo de Baier que ressalta a importância de superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície ( $\gamma_c$ ) parece ser o mais adequado do ponto de vista termodinâmico [17]. De acordo com o modelo em questão, superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície após contato com o sangue poderá exibir propriedades hemocompatíveis.

Deste modo, revestimentos de baixa energia livre de superfície poderiam inibir os processos de adesão e ativação das plaquetas sanguíneas.

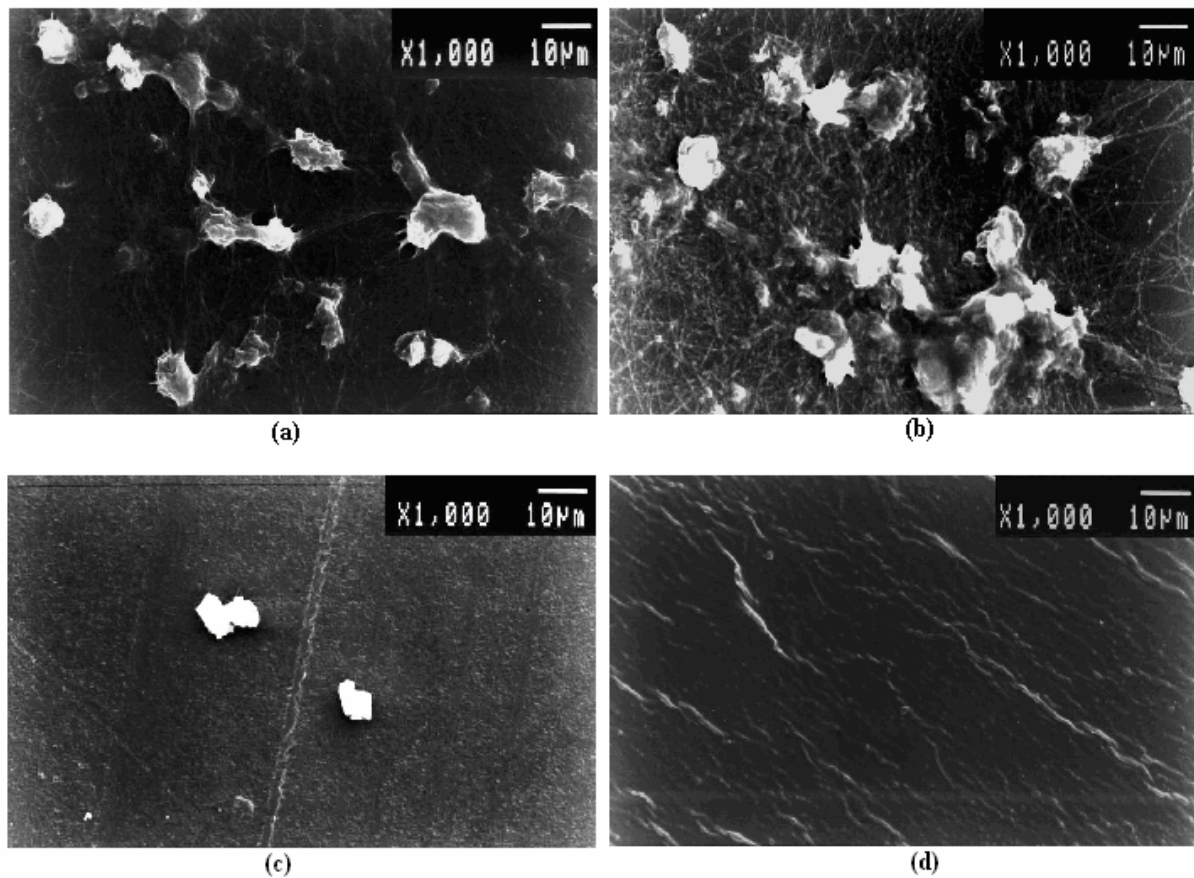
Uma propriedade da microestrutura do revestimento que está intrinsecamente ligada a  $\gamma_c$  é a temperatura de transição vítrea do revestimento [18-21]:

$$\gamma_c^{0,86} = (0,03RT_g - 1,5) \left( n\phi^2 V_m^{-0,71} \right) \quad (9.16)$$

sendo  $n$  o grau de liberdade do sistema,  $V_m$  o volume molar e  $\phi$  o parâmetro de interação.

Embora possua algumas limitações, a expressão (9.16) foi utilizada para o cálculo da tensão crítica de superfície do revestimento de PGLD. O valor de  $\gamma_c$  obtido para o revestimento de PGLD foi de  $18,2 \text{ dinas/cm}$ . Uma vez que o vidro apresenta uma energia livre de superfície,  $\gamma_c$ , igual a  $58,95 \text{ dinas/cm}$  [21], o revestimento com o dendrímero PGLD tende a reduzir a energia livre de superfície provavelmente devido à composição química de superfície. Como já mencionado anteriormente, a baixa energia livre de superfície característica do revestimento, poderia favorecer a propriedade de hemocompatibilidade e conseqüentemente a interação da superfície sintética com as plaquetas do sangue.

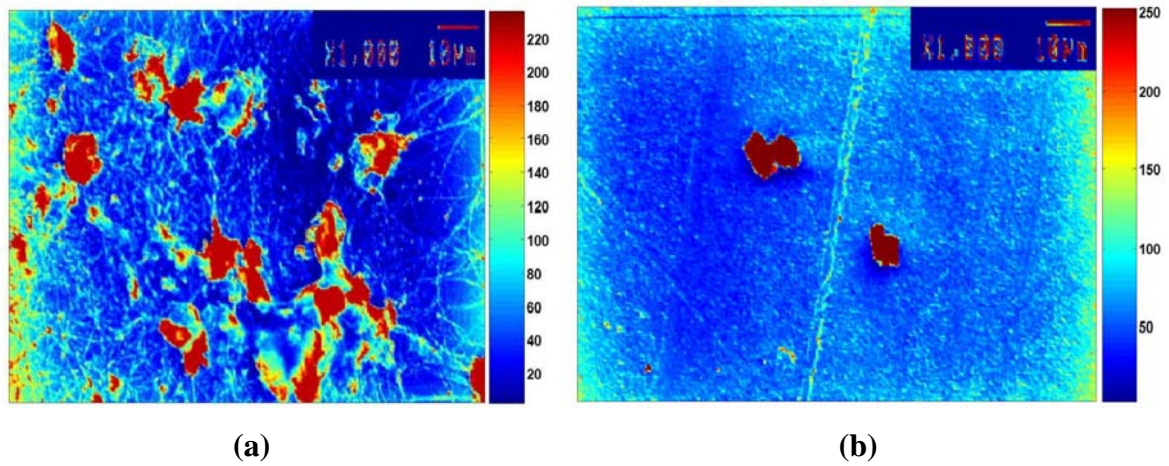




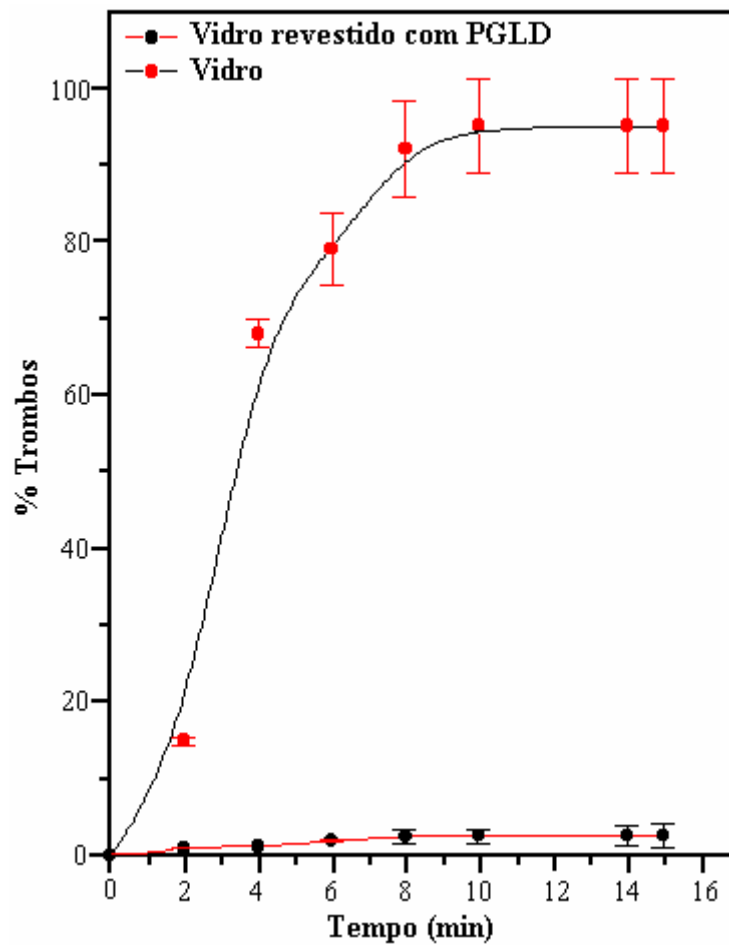
**Figura 9.30** – Micrografia do microscópio eletrônico de varredura dos substratos de vidro (a) e (b), e do vidro revestido com o dendrímero PGLD (c) e (d) após exposição ao plasma rico em plaquetas.

Para uma melhor visualização das micrografias obtidas no MEV, foram construídos mapas de cores tridimensionais das micrografias (a) e (c) da Figura 9.30. Estes mapas estão ilustrados na Figura 9.31. Os mapas são representados por matrizes onde o valor de cada elemento indica se houve ou não a adesão de plaquetas. É necessário salientar, que os valores que indicam a intensidade de cor no mapa é um valor adimensional fornecido pelo *software MATLAB 7.0* ao ler a figura da micrografia de MEV.

A Figura 9.32 mostra as curvas representando a cinética da formação de trombos nas superfícies do vidro revestido com a estrutura dendrítica PGLD e, vidro não revestido. Observa-se que a superfície revestida é significativamente menos trombogênica que o vidro não revestido com o PGLD indicando a macromolécula arborescente apresenta boas características de hemocompatibilidade.



**Figura 9.31** – Mapas de cores representativos de agregados plaquetários. Nas Figuras 9.30(a) e (c) foram realizadas um processamento de imagem utilizando um código original do software MATLAB 7.0 que permite uma melhor visualização das micrografias. As Figuras 9.31 (a) e (b) correspondem às micrografias da Figura 9.30 (a) e (c), respectivamente. As barras de cores indicam a intensidade de agregados plaquetários.



**Figura 9.32** – Cinética da formação de trombos na superfície do substrato de vidro e após o revestimento com o dendrímero PGLD. As barras indicam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

### 9.7– Referências bibliográficas

- [1] Knischka, R.; Lutz, P.J.; Sunder, A.; Mulhaupt, R.M.; Frey, H. Functional poly(ethylene oxide) multiarm star polymers: core-first synthesis using hyperbranched polyglycerol initiators. *Macromolecules*. 33 (2): 315-320, 2000.
- [2] Sandler, S.R.; Karo, W.; Bonesteel, J.; Pearce, E.M. Polymer synthesis and characterization. *New York: Academic Press*. p.143, 1998.
- [3] Tomalia, D.A.; Naylor, A.M.; Goddard, W.A. Starburst dendrimers: molecular level control of size, shape, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie.International Edition*. 29: 138-175, 1990.
- [4] Lopes, W.A.; Fascio, M. Esquema para a interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*. 27 (4): 670-673, 2004.
- [5] Tager, A. Physical chemistry of polymers. *Moscow: Mir Publishers*. p.130-34, 1972.
- [6] McNaughton, J.L.; Mortimer, C.T. Calorimetria diferencial de barrido. *New York: Perkin Elmer*. 1975.
- [7] Ibar, J.P. Do we need a new theory in polymer physics? *JMS – Rev .Macromolecular Chemistry and Physical*. C37, 389-458, 1997.
- [8] Ferreira, E.E.; Brandão, P.R.G.; Klein, B.; Peres, A.E.C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. *REM: Revista Escola de Minas*. 58 (1): 83-87, 2005.
- [9] Disponível em <<http://www.braseq.com.br/pdf/brookfield.pdf>>. Acesso em: 18 dezembro 2006).
- [10] de Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A.; Ellipsometry as a tool to study the adsorption of syntetic and biopolymers at the air/water interface. *Biopolymers*. 17 (7): 1759-1772, 1977.
- [11] Tumolo, T.; Angnes, L.; Baptista, M. S. Determination of the index increment of molecule and macromolecule solutions by surface plásmon resonance. *Analytical Biochemistry*. 333: 273-279, 2004.
- [12] Voros, J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophysical Journal*. 87 (1): 553-561, 2004.
- [13] Güleç, H. A.; Sariog˘lu, K.; Mutlu, M. Modification of food contacting surfaces by plasma polymerisation technique. Part I: Determination of hydrophilicity, hydrophobicity and surface free energy by contact angle method. *Journal of Food Engineering*. 75: 187-195, 2006.

- [14] Lassen, B.; Malmsten, M. Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 186 (1): 9-16, 1997.
- [15] Forbes, C.D.; Prentice, C.R.M. Thrombus formation and artificial surfaces. *British Medical Bulletin*. 34(2): 201-207, 1978.
- [16] Ratner, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. *Comprehensive Polymer Science*. 7, 201-247, 1989.
- [17] de Queiroz, A.A.A. Thermodynamic analysis of the surface of biomaterials. *Journal Molecular .Structure: Theochem*. 394 (2): 271-279, 1997.
- [18] Moroi, M.; Okuma, M.; Jung, S.M. Platelet adhesion to collagen-coated wells: analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1137 (1): 1-9, 1992.
- [19] Bayer, R.E. The role of surface energy in thrombogenesis. *Bulletin New York Academy of .Medicine*. 48 (2): 257-272, 1972.
- [20] Hayes, R.A. The relationship between glass temperature, molar cohesion and polymer structure. *Journal of Applied Polymer Science*. 5 (15): 318-321, 1961.
- [21] Lee, L.H. Relationship between surface wettability and glass temperature of high polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 12: 719-730, 1968.

## Capítulo 10 – Conclusões

---

O estudo da interação entre as proteínas séricas (BSA e HFb) e o dendrímero PGLD através da espectroscopia de Ressonância de Plásmon de Superfície foi constituído de várias etapas. Cada etapa foi essencial tanto na caracterização do material quanto na análise da hemocompatibilidade do mesmo.

Através da análise por GPC foram realizadas medidas a fim de comprovar o grau de pureza do dendrímero de poliglicerol sintetizado. Os resultados do baixo índice de polidispersão obtido (1,05) e o pico monomodal característico indicam um elevado grau de pureza do dendrímero PGLD. Através desta técnica, também foi possível determinar o comprimento cinético da cadeia polimérica sendo igual à aproximadamente 20 e que o PGLD sintetizado neste trabalho é de geração 5 (G5).

Os resultados da espectroscopia FTIR,  $^{13}\text{C}$ -MNR e  $^1\text{H}$ -MNR comprovaram a estrutura dendrítica do polímero de poliglicerol bem como a existência dos grupos hidroxilas terminais que interagem diretamente com as proteínas do plasma sanguíneo. Através da técnica  $^{13}\text{C}$ -MNR obteve-se o grau de ramificação da macromolécula. O resultado obtido ( $G_R = 0,8$ ) indica a formação da estrutura dendrítica do polímero sintetizado.

O resultado da técnica de DSC indica uma temperatura de transição vítrea ( $-20,2^\circ\text{C}$ ) apropriada para o revestimento de superfícies de dispositivos biomédicos devido a sua elevada flexibilidade a temperatura ambiente. Através do comportamento reológico do poliglicerol, comprovou-se que o PGLD comporta-se como um fluido newtoniano.

Os resultados experimentais para os parâmetros óticos dos filmes finos de ouro para o comprimento de onda igual a  $632,8\text{nm}$  obtidos através da técnica RPS, corroboram com os resultados da literatura obtidos através de outras técnicas.

Os resultados da adsorção do dendrímero PGLD sobre substratos de ouro colaboram com os resultados de microscopia de força atômica discutidos na literatura, uma vez que comprovam a mudança conformacional do dendrímero ao se adsorver sobre o substrato de ouro devido a interações de dipolo permanente-dipolo induzido. Esta mudança conformacional foi verificada

através de uma redução na espessura da monocamada dendrítica adsorvida sobre a superfície do ouro verificada por espectroscopia RPS.

Os ensaios de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PGLD baseados nas isotermas de Langmuir e Freundlich sugerem uma formação de multicamadas heterogêneas. Um possível modelo de empacotamento das proteínas foi proposto a fim de entender o processo de adsorção de proteínas sobre o dendrímero PGLD.

Já os resultados da cinética e da energia livre de adsorção indicam uma elevada interação entre o dendrímero PGLD e as proteínas séricas. A forte interação com a proteína BSA é um fator que contribui para a hemocompatibilidade do dendrímero PGLD uma vez que esta molécula protéica favorece o bloqueio subsequente das demais proteínas que podem propiciar a adesão e ativação plaquetária desencadeando uma série de reações bioquímicas que culminam na formação de trombos na superfície do material. Já a baixa afinidade deste dendrímero com a molécula de fibrinogênio é um resultado que também colabora para as características hemocompatível do PGLD, afinal esta proteína é um dos principais fatores que desencadeia a cascata de coagulação sanguínea.

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura confirmaram a boa afinidade do dendrímero PGLD com a molécula de BSA e a fraca interação com a molécula de HFB, uma vez que a superfície de vidro revestida pelo dendrímero apresentou uma baixa adsorção de plaquetas. Este resultado sugere um comportamento hemocompatível do PGLD sintetizado neste trabalho.

Através da cinética de formação de trombos verificou-se que a superfície de vidro revestida pelo dendrímero de PGLD é menos trombogênica do que a superfície de vidro o que indica uma boa característica hemocompatível para a macromolécula sintetizada.

Portanto, devido à elevada afinidade com a proteína BSA, ao alto grau de hemocompatibilidade ilustrados através da microscopia eletrônica de varredura e devido a cinética de formação de trombos, pode-se concluir que o dendrímero PGLD possui uma boa compatibilidade com o sangue. Todavia, uma análise mais elaborada com ensaios de adsorção competitiva faz-se necessário para consolidar não só os resultados obtidos, mas também para viabilizar a utilização deste material na biomedicina, em especial, na área cardiovascular.

## Capítulo 11 – Perspectivas Futuras

---

A aplicação de estruturas macromoleculares arborescentes do tipo PGLD representa uma vertente interessante quanto ao desenvolvimento de novos biomateriais no presente século. Neste sentido, a química nanoscópica tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de materiais em escala nanométrica.

Aliado à bioquímica e engenharia de materiais, sistemas implantáveis revestidos através da tecnologia convencional com macromoléculas biológicas como a heparina, uroquinase e o ativador tecidual de plasminogênio tem sido oferecido à medicina cardiovascular. Entretanto, a manutenção da integridade do componente biológico e o elevado custo destas técnicas que excluem a população de baixa renda em nosso país são dois desafios que devem ser vencidos.

Ao mesmo tempo uma instrumentação sofisticada e de elevada tecnologia, um biossensor RPS, foi inteiramente desenvolvido em nossos laboratórios a partir de componentes de baixo custo.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e extremamente versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área cardiovascular.

O escopo do presente trabalho e obviamente, também o binômio tempo/instrumentação nos privaram de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

1. Estudar as possíveis interações entre o dendrímero e proteínas fibrinolíticas tais como a uroquinase e a estreptoquinase;
2. Analisar o mecanismo de transporte de proteínas globulares e não globulares para uma melhor compreensão da interação entre a macromolécula arborescente e o fluido biológico;
3. Medir a distribuição de cavidades em função do número de gerações no dendrímero buscando, desta maneira, avaliar a efetiva área superficial da macromolécula sintética;
4. Avaliar a citotoxicidade dos sistemas obtidos neste trabalho;

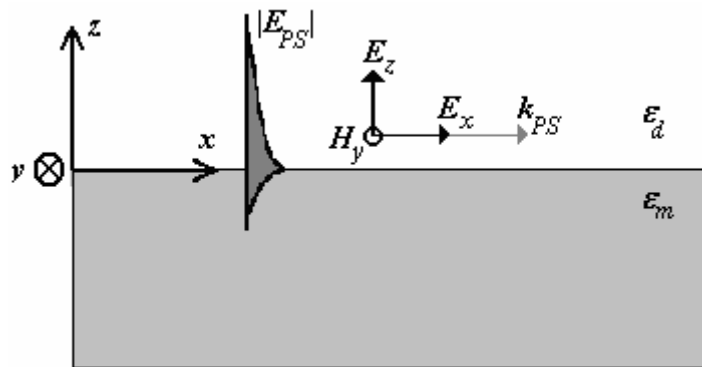
5. Estudar a aplicação da estrutura arborescente na engenharia de tecidos biológicos;
6. Incorporar fármacos com propriedades anti-inflamatórias às estruturas dendríticas e avaliar sua performance;
7. Utilizar o sistema PGLD no revestimento de stents e verificar sua performance por técnicas *in-vitro* e *in-vivo*;
8. Miniaturizar o dispositivo RPS acoplado a um processador digital de sinais para utilização em diagnósticos clínicos em tempo real;
9. Utilizar o fenômeno RPS para desenvolvimento de biossensores óticos baseados em fibras óticas;
10. Investigar a interação entre proteínas séricas e dendrímeros de PGLD através de simulações computacionais utilizando o método de Monte Carlo;
11. Utilizar o fenômeno de RPS em multicamadas e em forma de degraus para potencializar a eficiência de um arranjo de diodos;
12. Aplicar os princípios de inteligência artificial na aquisição e interpretação dos sinais oriundos do biossensor plasmônico.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas altamente específicas e, cujas respostas contribuirão fortemente para o total domínio da tecnologia RPS na investigação das propriedades hemocompatíveis de sistemas nanoscópicos.



## Apêndice A – Cálculo da Relação de Dispersão dos Plásmons de Superfície

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



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

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

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

na região  $z > 0$ , e como

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

na região  $z > 0$ , sendo  $k_{PS}$  e  $\omega$  são os vetores de onda e frequência angular dos plásmons de superfície.

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

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

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

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

no meio dielétrico, e

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

no meio metálico.

Considerando as condições de contorno de continuidade do campo eletromagnético,

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

$$E_x^d = E_x^m \text{ e } \varepsilon_d E_z^d = \varepsilon_m E_z^m. \quad (\text{A.6})$$

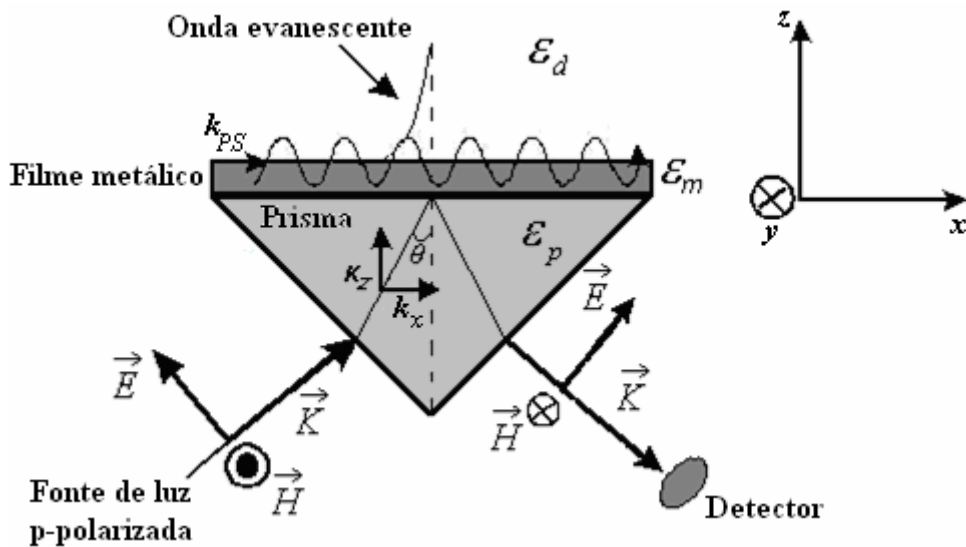
Desde que não haja carga externa em ambos os meios,  $\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0$  (Lei de Gauss), obtêm-se

$$ik_{PS} E_x^d + ik_z^d E_z^d = 0 \text{ e } ik_{PS} E_x^m + ik_z^m E_z^m = 0. \quad (\text{A.7})$$

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

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

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



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

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

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

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

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

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

## Apêndice B – O Método das Correções Diferenciais

---

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

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

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

sendo  $r_i$  definido por:

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

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

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

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

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

De modo análogo, obtêm-se a variação de  $F$  com relação aos parâmetros  $b, c$ :

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

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

Portanto,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obtêm-se, portanto, a equação linear:

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

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

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

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

As equações (B.9), (B.10) e (B.11) constituem um sistema de três equações lineares que permitem determinar as correções  $\Delta a, \Delta b, \Delta c$ . Na forma matricial, obtêm-se:

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

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

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

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

## Apêndice C – Cálculo da Reflectância para uma Estrutura de N-camadas na Configuração de Kretschmann

---

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

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

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

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

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

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

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



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

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

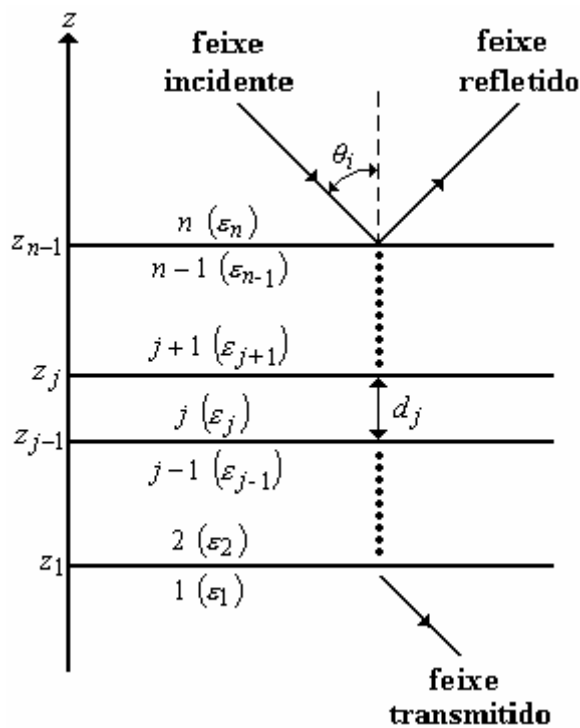


Figura C.1 – Estrutura utilizada no cálculo do coeficiente de reflexão.

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

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

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

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

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

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

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

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

e

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

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

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

Então,

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

Neste ponto é conveniente retornar a equação (C.2) e estabelecer uma convenção de sinal consistente. Assumindo que  $\omega$  e  $k_x$  sejam reais,  $Im k_z^2(j) > 0$  e que  $k_z^2(j)$  estejam na

parte superior do plano complexo, e que  $k_z(j)$  encontra-se no primeiro quadrante  $[Re(k_z(j))] > 0$  e  $[Im(k_z(j))] > 0$  ou no terceiro quadrante  $[Re(k_z(j))] < 0$  e  $[Im(k_z(j))] < 0$  do plano complexo. Tomando a raiz quadrada na equação (C.2) de modo que  $k_z(j)$  encontre-se no primeiro quadrante:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Portanto,

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

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

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

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

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

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