Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Interação entre a enzima enolase e superfícies sólidas

Arlete Tavares Almeida

Tese de doutorado

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri

Orientadora

São Paulo - SP

2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Arlete Tavares
A447i Interação entre a enzima enolase e superfícies sólidas / Arlete
Tavares Almeida. -- São Paulo, 2004.
140p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira

I. Adsorção : Físico-química I. T. II Petri, Denise
Freitas Siqueira, orientador.

541.3453 CDD

“Interação entre a enzima enolase e superfícies sólidas”

ARLETE TAVARES ALMEIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Físico-Química.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ - USP

Prof. Dr. ROBERTO MANUEL TORRESI
IQ - USP

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS NART
IQSC - USP

Prof. Dr. SERGIO BROCHSZTAIN
UMC

SÃO PAULO
10 DE DEZEMBRO 2004

*Ao Eduardo, pelo seu constante
apoio incondicional, amor,
amizade, companheirismo e,
sobretudo, paciência.*

Agradecimentos

- ☺ À Profa. Dra. Denise F.S. Petri com quem tive o prazer de trabalhar.
- ☺ À Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori pelo início do meu aprendizado em AFM
- ☺ Ao Prof. Dr. Thomas Schimmel pela oportunidade de estagiar nas instalações do Forchungszentrum Karlsruhe (Alemanha). Aos colegas deste mesmo grupo, Hartmut Gliemman, Stephan Wangheim e Mathias Müller, pelas dicas em AFM, sem as quais teria deixado de obter boa parte das imagens aqui apresentadas.
- ☺ Aos professores Dr. Michael Bruns (Forchungszentrum Karlsruhe, Alemanha) e Dr. Paul Rouxhet (Université Catolique, Bélgica) pelas análises em XPS.
- ☺ Ao Prof. Dr. Yoshio Kawano (IQ/USP) pelas análises de PAS.
- ☺ À Prof. Dra. Olga Zazuco Higa (IPEN/CNEN-SP) pelas irradiações das sluções poliméricas e imagens de MEV.
- ☺ À Prof. Dra. Rosângela Itri (Instituto de Física/USP), Sabrina Montero Pancera (Instituto de Química/USP) e Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS - Campinas, SP) pelas análises de SAXS.
- ☺ Aos meus pais pela total dedicação e apoio recebidos ao longo da minha vida.
- ☺ Aos amigos e companheiros do grupo (Alliny, Lizandra, Paulo, Romeu, Karina, Eduardo e Priscila) que de alguma forma me ajudaram durante a elaboração do trabalho.
- ☺ To my dear friends Vassilis Kapaklis, Christian Morra and Josep Maria Anglada for their encouragement and all the funny moments during my journey in Europe.
- ☺ À FAPESP pelo apoio financeiro e ao IQ/USP pelas instalações.

Índice

1	<i>Introdução</i>	1
2	<i>Considerações gerais</i>	5
2.1 -	Enolase	6
2.2 -	Modelos de adsorção protéica - Revisão da literatura	9
3	<i>Materiais e métodos</i>	17
3.1 -	Materiais	18
3.2 -	Métodos	18
3.2.1	Preparação dos substratos	19
3.2.2	Adsorção da enolase – determinação de Γ	21
3.2.2.1	Elipsometria in situ	21
3.2.2.2	Espectrofotometria UV-visível	24
3.2.3	Ângulo de contato	26
3.2.4	Microscopia de força atômica	27
3.2.5	Espectroscopia de fotoelétrons com fonte de raios-X (XPS)	29
3.2.6	Espectroscopia fotoacústica no infravermelho (PAS)	29
3.2.7	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> - SAXS)	30
3.2.8	Medida da atividade da enolase adsorvida:	32
4	<i>Resultados e Discussão</i>	33
4.1 -	Substratos Planos	34
4.1.1	Cinética de adsorção - Elipsometria	34
4.1.1.1	Influência da força iônica	36
4.1.1.2	Influência da concentração	42
4.1.2	Isotermas de adsorção - Elipsometria	45
4.1.2.1	Influência da hidrofilicidade da superfície do substrato	45
4.1.2.2	Influência do pH	47
4.1.3	Microscopia de força atômica (AFM)	49
4.1.3.1	AFM contato intermitente in situ	49
4.1.3.2	AFM contato intermitente em ar	56
4.1.4	Medidas de ângulo de contato	60

4.1.5	Medidas de XPS	63
4.1.6	Modelos de adsorção	68
4.2 -	Substratos esféricos	73
4.2.1	Caracterização das esferas de vidro modificadas com TMCS por espectroscopia fotoacústica no infravermelho	73
4.2.2	Cinética de adsorção – leitura da absorbância em $\lambda = 280\text{nm}$	76
4.2.3	Cinética de adsorção – método de Bradford ($\lambda = 595\text{ nm}$)	78
4.2.4	Isotermas de adsorção	83
4.2.5	Influência da forma do substrato no processo de adsorção da enolase	85
5	<i>Medida da atividade da enolase adsorvida</i>	89
5.1 -	Atividade da enolase adsorvida em substratos esféricos	94
5.2 -	Atividade da enolase adsorvida em substratos planos	96
6	<i>Conclusões</i>	99
7	<i>Referências bibliográficas</i>	102
Apêndices		107

Lista de abreviações mais usadas

2-PGA	<i>2-Fosfoglicerato</i>
AFM	<i>Microscopia de força atômica</i>
APS	<i>Aminopropilsilano</i>
CCBG	<i>Corante Comassie Blue G-250</i>
CSA	<i>Modelo de adsorção seqüencial cooperativa</i>
PAS	<i>Espectroscopia fotoacústica no infravermelho</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEP	<i>Fosfoenolpiruvato</i>
pI	<i>Ponto isoelétrico</i>
PS	<i>Poli(estireno)</i>
rms	<i>Rugosidade expressa em valores de média quadrática</i>
RSA	<i>Modelo de adsorção seqüencial aleatória</i>
SAXS	<i>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo</i>
TMCS	<i>Trimetilclorosilano</i>
XPS	<i>Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X</i>

Lista de símbolos mais usados

a	<i>Coeficiente de absorptividade</i>
b	<i>Caminho óptico</i>
c_{ads}	<i>Concentração de enolase adsorvida</i>
c_{enolase}	<i>Concentração de enolase livre em solução</i>
λ	<i>Comprimento de onda</i>
Θ	<i>Grau de cobertura</i>
Δ	<i>Diferença de fase entre os componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico</i>
Ψ	<i>Razão entre as amplitudes dos componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico</i>
Γ	<i>Quantidade de material adsorvido</i>
θ_A	<i>Ângulo de contato (avanço)</i>
θ_R	<i>Ângulo de contato (recesso)</i>
D	<i>Coeficiente de difusão</i>
dn/dc	<i>Incremento do índice de refração</i>
d_x	<i>Espessura da camada desconhecida</i>
I(q)	<i>Intensidade SAXS de uma solução isotrópica de partículas esféricas monodispersas</i>
N_x	<i>Índice de refração complexo do meio x</i>
N_x	<i>Índice de refração do meio x</i>
P(q)	<i>Fator forma da partícula</i>
p(r)	<i>Distribuição de distância</i>
q	<i>Vetor espalhamento</i>
R_g	<i>Raio de giro</i>
R_h	<i>Raio hidrodinâmico</i>

Resumo

Neste trabalho, foram comparadas as cinéticas de adsorção da enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) sobre substratos hidrofílicos (placas de silício não modificadas ou silanizadas com aminopropilsilano (APS)) com aquelas sobre substratos hidrofóbicos (placas de silício silanizadas com trimetilclorosilano (TMCS) ou recobertas com filme de PS (poliestireno)). O efeito da forma do substrato (plano x esférico) sobre a cinética de adsorção também foi estudado. Os substratos esféricos foram esferas de vidro não modificadas (caráter hidrofílico) e silanizadas com TMCS (caráter hidrofóbico). As curvas de cinética de adsorção em substratos planos obtidas por elipsometria *in situ* mostraram que o processo ocorre em três etapas: (1) difusão das moléculas para a interface sólido/líquido, (2) formação de uma monocamada adsorvida e (3) adsorção de outras moléculas sobre a monocamada e formação de multicamadas. As isotermas mostraram que a enolase não possui adesão preferencial em substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos. A etapa (1) pode ser descrita pelo modelo de adsorção sequencial aleatória, enquanto que as etapas (2) e (3) podem ser descritas pelo modelo de adsorção sequencial cooperativa. Não foi observada influência da força iônica. Contudo, imagens da topografia das superfícies recobertas por enolase obtidas por microscopia de força atômica (*in situ* e no ar) mostraram que os agregados de moléculas adsorvidas podem se apresentar na forma esférica (força iônica alta) ou como fibrilas (força iônica baixa). Medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) de uma solução de enolase (6 g/L NaCl 0,001 mol/L) mostraram que as moléculas possuem raio de giro de 29 Å. Portanto, a agregação é induzida pelas propriedades da superfície da monocamada e pela força iônica do meio. Medidas de ângulo de contato mostraram que substratos inicialmente

hidrofóbicos se tornaram hidrofílicos após adsorção da enolase, enquanto que os hidrofílicos apresentaram tendência oposta. Medidas de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X evidenciaram que a adsorção sobre silício é mais rápida do que sobre PS, corroborando com os resultados obtidos por elipsometria. A influência do pH na adsorção da enolase em silício e APS mostraram que a adsorção é máxima quando o valor de pH é próximo ao ponto isoelétrico da enzima. A cinética de adsorção da enolase em substratos esféricos hidrofílicos e hidrofóbicos, acompanhada por espectrofotometria UV-vis, mostrou que a quantidade de material adsorvido (Γ) nestas superfícies aumenta com o tempo de adsorção e concentração inicial de enolase em solução (efeito de cooperativismo), sendo que o valor final é muito mais elevado nos substratos esféricos do que nos planos. Pela metodologia utilizada não se pôde observar os três estágios característicos da cinética de adsorção obtida para substratos planos. A influência da força iônica somente foi observada na adsorção sobre os substratos esféricos em sistemas concentrados ($c_{\text{enolase}} > 0,5\text{g/L}$). As moléculas de enolase permanecem ativas após adsorção nos substratos estudados.

Abstract

This work aimed to compare the adsorption behavior of enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) onto hydrophilic (silicon wafers and amino-terminated surfaces (APS)) and hydrophobic planar substrates (polystyrene (PS) film, TMCS). The effect of the substrate shape (planar x spherical) was also studied. The spherical substrates were glass beads, native and modified with TMCS, with hydrophilic and hydrophobic characters, respectively. The adsorption kinetics of enolase onto planar substrates (obtained by means of *in situ* ellipsometry) presented three distinct regions: (i) a diffusion controlled step, (ii) monolayer formation evidenced by an adsorption plateau and (iii) continuous, irreversible and asymptotic increase of the adsorbed amount with time. The early stages were described by the random sequential adsorption model (RSA), while the cooperative sequential adsorption (CSA) model described regions (ii) and (iii). The adsorption isotherms show that enolase has no preferential adhesion onto hydrophilic or hydrophobic substrates. No significant influence of ionic strength was observed on the adsorption behavior of enolase onto the planar substrates. On the other hand, atomic force microscopy (AFM) showed that at long adsorption time and low ionic strength enolase monolayer induced fibrillation of the incoming molecules. Such effect was not observed at high ionic strength. Increasing the adsorption time, aggregates appeared on the surface, suggesting multilayer formation. Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements of enolase ($c = 6.0\text{g/L}$) in NaCl 0.001mol/L solution yielded radius of gyration of $29\text{ \AA}$, confirming that aggregation was probably induced by the surface of enolase monolayer and screening effects. Contact angle measurements showed that PS surfaces became hydrophilic and silicon surfaces turned hydrophobic

after the formation of the enolase biofilm. XPS measurements showed that enolase adsorption is faster onto hydrophilic silicon wafers than onto hydrophobic PS film, corroborating with the ellipsometric measurements. The study of the influence of pH on the enolase adsorption on silicon and APS surfaces showed that the highest pH was close to the enzyme isoelectric point. The adsorption kinetic curves of enolase onto spherical substrates (obtained by means of UV-vis spectrophotometry) showed that the adsorbed amount (Γ) increased as function of adsorption time and initial concentration of enolase. The highest Γ value was obtained on spherical substrates. The three adsorption steps, characteristic of enolase adsorption, could not be observed by means of the methodology used. The influence of ionic strength was observed only in concentrated enolase solutions ($c_{\text{enolase}} = 0.5\text{g/L}$). The immobilized enolase molecules kept their enzymatic activity, regardless the type of substrate.

1 Introdução

A imobilização controlada de biomoléculas em superfícies sólidas é um assunto que vem se tornando cada vez mais importante no campo da ciência dos materiais e biotecnologia. No caso específico de imobilização de proteínas, o interesse principal é a obtenção de biossensores, os quais englobam eletrodos de enzimas e imunossensores, utilizados em diagnósticos clínicos, análise de alimentos e monitoramento ambiental. Biomoléculas adsorvem na superfície sólida de um material implantado assim que este entra em contato com o fluido corpóreo. Então, superfícies de biomateriais imobilizadas com biomoléculas podem ser usadas para controle de adesão celular ou aumento da hemocompatibilidade de implantes.

Biomoléculas adsorvem facilmente sobre superfícies sólidas, mas podem facilmente sofrer denaturação e no caso de enzimas, diminuição ou perda de atividade. Na obtenção de imunossensores, sensores químicos que utilizam a ligação altamente específica entre anticorpo e antígeno para quantificar desde vírus e microorganismos até pequenas moléculas, um dos ligantes (antígeno ou anticorpo) deve ser imobilizado na superfície do sensor de maneira controlada e com a orientação desejada. O passo inicial em busca do controle da imobilização de biomoléculas é o estudo do seu processo de adsorção. Portanto, a elucidação da estrutura, distribuição, orientação e função da proteína adsorvida é determinante na obtenção de um sensor eficiente.

Muitos estudos sobre adsorção protéica têm sido realizados utilizando-se uma grande variedade de técnicas. Inicialmente, estudos de adsorção em tempo real são feitos por elipsometria. Várias outras técnicas

baseadas em ondas evanescentes e microbalanças de cristal de quartzo têm sido desenvolvidas. Todas elas são capazes de seguir a adsorção na superfície sólida com grande sensibilidade. O monitoramento da adsorção em tempo real tem sido mais estimulado com o advento de novas técnicas, como por exemplo, a microscopia de força atômica, a qual permite a determinação de características estruturais e distribuição das proteínas na superfície com alta resolução. Técnicas *in situ*, tais como espectroscopia com ressonância de plasma (SPR), elipsometria e microscopia de força atômica (AFM), permitem a obtenção direta do processo de adsorção sem a necessidade de secar a superfície do substrato, evitando assim possíveis rearranjos das moléculas adsorvidas após o processo de secagem.

Muitos trabalhos encontrados na literatura usam técnicas *ex situ* e/ou *in situ* no estudo do processo de adsorção protéica (Kim e col., 2001; Ortega-Vinuesa e col., 1997; Coen e col., 2001; Green e col., 1997). Uma das desvantagens das técnicas *ex situ* é a necessidade da secagem da amostra após adsorção, que, como dito anteriormente, pode influenciar as características da camada adsorvida na superfície em estudo, levando a conclusões errôneas a respeito do processo de adsorção. SPR (Kim e col., 2001), AFM (Kim e col., 2001; Vansteenkiste e col., 2000; Johnson e col., 2000; Zlatanova e col., 2000) e elipsometria (Kull col., 1997; Kurrat col., 1998; Arwin, 2001) são as técnicas *in situ* mais frequentemente utilizadas no estudo da adsorção proteica.

Elipsometria é uma técnica que se baseia na mudança do estado de polarização da luz após reflexão a partir de uma superfície plana refletora. A partir dos ângulos elipsométricos, Δ e Ψ , obtém-se a espessura da camada adsorvida na interface sólido/líquido. Devido a sua capacidade de monitorar mudanças rápidas na superfície sólida em ambientes líquidos, ela se tornou uma técnica muito apropriada no estudo da adsorção protéica em tempo real (Kustrzeba-Wójcicka & Golczak, 2000; Tengvall e col., 1998). As informações topográficas das moléculas adsorvidas na superfície foram obtidas por meio de microscopia de força atômica. As imagens de AFM

podem ser adquiridas em ar ou em ambiente aquoso com auxílio de uma cela de fluídos. Este último permite que o estudo da adsorção protéica possa ser realizado em condições fisiológicas, tornando assim os resultados obtidos experimentalmente mais próximos do processo que ocorre no ambiente natural da proteína (Pereira, 2001).

Este trabalho teve como objetivo o estudo do comportamento da adsorção da enolase em superfícies sólidas. A enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) é uma enzima que participa da rota glicolítica, catalisando a conversão reversível do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (Kustrzeba-Wójcicka & Golczak, 2000). Técnicas como elipsometria e microscopia de força atômica, AFM (*ex situ* e *in situ*), foram utilizadas no estudo do processo de adsorção da enolase em substratos hidrofílicos (lâminas de silício não modificadas ou silanizadas com aminopropilsilano, APS) e hidrofóbicos (lâminas de silício silanizadas com ou trimetilclorosilano (TMCS) ou recobertas por filme de poliestireno) em diferentes forças iônicas e pH. Informações sobre quantidade adsorvida obtidas por elipsometria, foram complementadas com imagens topográficas obtidas por AFM, permitindo uma visão geral do processo de adsorção da enolase. A combinação destas duas técnicas *in situ* permitiu o estudo do processo de adsorção da enolase em ambiente aquoso e em tempo real. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) e medidas de ângulo de contato também foram utilizadas na caracterização dos substratos planos. O efeito da forma do substrato também foi avaliado, comparando-se a adsorção da enolase sobre os substratos planos com a adsorção sobre substratos esféricos hidrofílicos (pérolas de vidro) e hidrofóbicos (pérolas de vidro silanizadas com TMCS). Neste último caso, a variação da quantidade de enzima adsorvida foi acompanhada por espectrofotometria UV-vis.

2 Considerações gerais

2.1 - ENOLASE

A enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase, EC 4.2.1.11) é uma metaloenzima que catalisa a desidratação do 2-fosfo-D-glicerato (PGA) formando fosfoenolpiruvato (PEP) (Figura 1) na reação direta ou direção catabólica (reações geralmente exotérmicas) na segunda metade da rota glicolítica de Emden Mayeerhoff - Parnas (Pancholi, 2001). Na reação reversa (rota anabólica, geralmente endotérmica), a qual ocorre durante a gluconeogênese, a mesma enzima catalisa a hidratação do PEP formando PAG. O cofator natural da enolase é o íon magnésio. Em sua presença a enolase apresenta atividade máxima, sendo por isso classificada como uma metaloenzima metal-ativada (esta definição foi criada por Vallee (1955), segundo o qual a ligação entre o metal e a enolase é mais fraca do que a mesma ligação em outras metaloenzimas). Os íons de magnésio se ligam em dois sítios diferentes na cadeia da enolase. O primeiro íon se liga ao chamado sítio conformacional, induzindo mudanças conformacionais no sítio ativo e permitindo a ligação de um substrato ou seu análogo (metaloenzima). Uma vez firmemente ligado, o segundo íon de magnésio se liga ao segundo sítio e atua como componente necessário do aparato catalítico.

Figura 1. Representação esquemática da reação de conversão do 2-PGA em PEP, catalisada pela enolase.

A estrutura cristalográfica da enolase foi desvendada por Lebioda e col. na década de 80 (Lebioda & Brewer, 1984; Lebioda & Stec, 1988), confirmando que a enolase é um dímero composto por duas cadeias idênticas (A e B), cada uma formada por 436 resíduos de aminoácidos. A estrutura primária da enolase, ou seja, a seqüência de aminoácidos que formam cada uma das cadeias da proteína, está ilustrada na Tabela 1.

Uma vez que a enolase é uma enzima encontrada em abundância na maioria das células, ela serve como enzima modelo no estudo de mecanismos básicos da ação enzimática assim como análise estrutural. A enolase é uma proteína que apresenta diferentes funções, sendo capaz de agir como receptor ligante de plasminogênio na superfície de uma variedade de células hematopoiéticas, endoteliais e epiteliais. Esta habilidade sugere que a enolase exerça um papel importante no sistema fibrinolítico intravascular e pericelular. Seu papel nas desordens autoimune sistêmicas e invasivas foi reconhecida há pouco tempo. Além desta propriedade, sua capacidade de funcionar como uma proteína termo-ativada (*heat-shock-protein*) e de se ligar a estruturas citoesqueléticas e cromatina indicam que a enolase pode também ter um importante papel na transcrição e em vários processos patofisiológicos. Uma abordagem completa sobre as características e funções dos vários tipos de enolase pode ser encontrada no excelente trabalho de revisão publicado por Pancholi em 2001.

2.2 - MODELOS DE ADSORÇÃO PROTÉICA - REVISÃO DA LITERATURA

O fenômeno da *adsorção* pode ser definido como sendo a ligação de partículas (ou moléculas) a uma superfície (Atkins, 1994). A substância que adsorve é chamada de *adsorbato*. A superfície onde o adsorbato adsorve é chamada de *substrato* ou *adsorbente*. O fenômeno inverso à adsorção é dito *dessorção*. A adsorção resulta das forças de interação entre o adsorbato e o substrato. Estas forças podem variar em magnitude, desde as fracas interações do tipo van der Waals (adsorção física ou fisissorção) até as fortes ligações covalentes (adsorção química ou quimissorção).

A adsorção de proteínas em superfícies sólidas ocorre assim que uma interface estranha entra em contato com um sistema biológico. Adsorção protéica é considerada um fenômeno muito importante e está diretamente envolvida em diferentes áreas, tais como biologia, medicina, biotecnologia, além de indústrias de alimentos e farmacêutica. É devido a sua grande importância que muito se tem dedicado ao estudo da natureza da adsorção de proteínas e o fenômeno de pós-adsorção. Neste sentido é altamente desejável a obtenção de um modelo capaz de prever a quantidade de proteína adsorvida na superfície de um substrato para diferentes aplicações. Bons modelos fornecem não somente uma previsão semi-quantitativa da quantidade de proteína adsorvida, mas também contribuem para a compreensão dos diferentes sub-processos que ocorrem durante a adsorção.

Muito se tem dedicado ao estudo dos diferentes fatores que influenciam a adsorção protéica. Dentre os fatores que afetam o processo de adsorção, destacam-se: (i) características da proteína, incluindo ponto isoelétrico (pI), carga líquida e distribuição de carga, estrutura tridimensional em solução, localização e natureza de domínios hidrofóbicos e variabilidade

conformacional; (ii) propriedades da superfície do adsorbato, incluindo topografia e heterogeneidade, potencial elétrico, composição e hidrofobicidade-hidrofilicidade; (iii) condições do meio, incluindo pH, temperatura, força iônica, concentração no equilíbrio, hidrodinâmica e tipo de tampão. A formulação de um modelo teórico capaz de descrever como todos estes fatores interagem ainda não foi concebida. Esta dificuldade surge da própria complexidade da estrutura protéica, o que causa uma grande diversidade de comportamento de adsorção. Nesta seção, procurou-se citar alguns dos vários trabalhos importantes descritos na literatura. No entanto, nenhum deles ainda foi capaz de prever todas as etapas envolvidas no processo de adsorção protéica.

Muitos processos de adsorção têm sido tratados termodinamicamente em termo das isotermas de Langmuir (Langmuir, 1918). O princípio de Langmuir se baseia em três hipóteses: (i) a adsorção não excede uma monocamada, (ii) todos os sítios de adsorção são equivalentes e a superfície do substrato é uniforme (perfeitamente plana em escala microscópica) e (iii) uma molécula do adsorbato pode interagir somente com um sítio de adsorção. A adsorção de pequenas moléculas formando uma monocamada é descrita pela eq.(1):

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_a C_0 (1 - \Theta) - k_d \Theta \quad (1)$$

Onde k_a e k_d são as constantes de adsorção e dessorção, respectivamente, e C_0 representa a concentração analítica (inicial) de moléculas adsorbentes no líquido. O grau de cobertura Θ é dado por $\Theta = (qN_a)/N_s$, onde N_a representa o número de partículas adsorvidas/unidade de área, N_s é o número total de sítios/unidade de área da superfície do substrato e q é igual ao número de sítios de adsorção cobertos por cada partícula. No modelo de Langmuir cada molécula pode interagir somente com um sítio ($q = 1$).

Ao modelo proposto por Langmuir foram incorporadas modificações na tentativa de descrever os diferentes tipos de interações entre a superfície-moléculas e moléculas-moléculas. Além disso, moléculas grandes e complexas como as de proteínas possuem um número de sítios de adsorção muito mais elevado do que 1. No entanto, nem o modelo de Langmuir e nem os modelos de adsorção protéica neste baseados levam em conta os efeitos de exclusão superficial das partículas adsorvidas.

Lundström (1985) propôs um modelo dinâmico de adsorção protéica em superfícies sólidas, o qual se baseia no fato de que uma molécula pode mudar sua conformação após adsorção. Ele encontrou que o número de moléculas que sofreram uma mudança conformacional após adsorção depende da concentração em solução e do tempo necessário para que a superfície induza esta mudança conformacional. Em termos energéticos, trocas entre moléculas adsorvidas e moléculas livres em solução são consideradas mais prováveis do que dessorção puramente dita. Neste caso, a duração do experimento de adsorção é importante para a detecção de qualquer redução apreciável na massa adsorvida total resultante destes intercâmbios. Cinco anos mais tarde, Lundström e Elwing (1990) investigaram a cinética destes intercâmbios em superfícies sólidas, o tempo necessário para que estes ocorressem e quais as possíveis conformações adotadas por uma molécula de proteína adsorvida. Eles ainda definiram três tipos de superfície do substrato. O primeiro tipo consiste naquela superfície invisível ao ambiente biológico, na qual adsorção reversível e trocas entre moléculas adsorvidas e dessorvidas ocorrem com pouca ou nenhuma mudança conformacional após adsorção. No segundo tipo de superfície as trocas entre moléculas adsorvidas e dessorvidas ocorrem, desde que moléculas com conformação modificada possam voltar lentamente para a solução. O terceiro tipo itera com pelo menos um tipo (ou conformação) de molécula protéica de maneira irreversível.

Em 1997, Szleifer publicou um trabalho teórico que serviu de base para o estudo de adsorção protéica em superfícies com polímeros enxertados. Neste modelo, a camada formada por cadeias poliméricas enxertadas-proteína-solvente é considerada não-homogênea na direção perpendicular à superfície enxertada. Esta teoria permite o cálculo de isothermas de adsorção da proteína em função da cobertura superficial do polímero enxertado, concentração da proteína no meio e do solvente, além da estimativa do potencial de força média entre polímero e proteína. A teoria foi aplicada a dados experimentais da adsorção de lisosima em superfícies de poli(óxido de etileno) (PEO) enxertado. A molécula protéica foi modelada como na forma esférica em solução, e as interações polímero-proteína, proteína-solvente e polímero-solvente eram todas atrativas. Foi observado que as interações que determinam a estrutura da camada protéica adsorvida são repulsivas. As isothermas mudam drasticamente de acordo com o grau de atração entre a superfície do substrato e as cadeias de PEO. Em superfícies que apresentam atração preferencial pelas cadeias de PEO, a adsorção protéica varia em função do comprimento destas cadeias: quanto mais longas, menor o grau de adsorção de moléculas de proteína. Por outro lado, no caso de superfícies que não apresentam interações preferenciais com os segmentos poliméricos enxertados, as isothermas de adsorção independem do comprimento das cadeias de PEO.

A evolução de modelos capazes de prever o comportamento da adsorção protéica tem ocorrido por meio da inserção de maiores detalhes da estrutura protéica com o intuito de se aproximar cada vez mais dos dados experimentais observados. Isto tem ocorrido principalmente no caso de adsorção dirigida eletrostaticamente (moléculas de proteínas adsorvendo em superfícies de cargas opostas), para a qual modelos coloidais são usados constantemente (Roth & Lenhoff, 1993 e 1995; Grant & Saville, 1994). Considerando que um modelo assumindo uma superfície uniformemente carregada é incapaz de prever o comportamento do processo de adsorção eletrostaticamente dirigida, Asthagiri e Lenhoff (1997) desenvolveram um

modelo para a adsorção de moléculas em superfícies de mesma carga. Neste caso, a adsorção ocorre por meio da interação da superfície do substrato com discretas regiões (*patches*) da superfície da molécula de proteína que apresentam carga oposta. Em tais sistemas, qualquer adsorção observada é atribuída à grande heterogeneidade das superfícies da molécula protéica e do adsorbente. Alguns anos mais tarde, Oberholzer e Lenhoff (1999) propuseram um método para o cálculo de isothermas de adsorção de pequenas proteínas globulares em soluções aquosas baseado em descrições coloidais das energias de interação proteína-proteína e proteína-superfície.

Muitos modelos cinéticos teóricos têm sido propostos e usados para explicar dados obtidos experimentalmente a partir de curvas de cinéticas de adsorção. Simulações baseadas no método de Monte Carlo, (Zhdanov & Kasemo, 1998; Oberholzer e col., 1997; Adamczyk, 2000; Zhou e col., 2004) as quais simulam a adsorção de moléculas individuais, e a comparação de dados experimentais com modelos cinéticos que incluem vários aspectos do processo de adsorção (Elgersma e col., 1991; Olivieri e col., 1992; VanTassel e col., 1997; Schaaf e col., 2000; Zembala & Adamczyk, 2000) são os principais meios usados na tentativa de elucidar o comportamento cinético da adsorção protéica.

Na maioria das observações experimentais a adsorção ocorre rapidamente e o equilíbrio de adsorção é atingido em tempos curtos de interação entre a solução protéica e a superfície do substrato (Malmsten, 1995; Almeida e col., 2002, Pancera e col., 2002, Soderquist & Walton, 1980; Wahlgren e col., 1995). De acordo com Soderquist e Walton (1980) há três processos distintos que contribuem para a cinética de adsorção de proteínas em superfícies poliméricas. O primeiro, adsorção rápida e reversível de moléculas protéicas em um curto intervalo de tempo. As moléculas adsorvem segundo um arranjo aleatório enquanto o grau de cobertura da superfície não extrapole a faixa de 50 a 60%. Também é considerada a possibilidade de difusão lateral de moléculas adsorvidas que

ocorre na direção de um ordenamento na superfície. Aqui pode ocorrer dessorção de parte das moléculas adsorvidas. Uma vez na superfície do substrato, a molécula pode sofrer transições conformacionais em função do tempo, contribuindo para a otimização da interação proteína-superfície. Terceiro, a probabilidade de dessorção diminui com o aumento do período de incubação, e as moléculas protéicas passam a adsorver lenta e irreversivelmente.

A maioria dos modelos teóricos de adsorção protéica se limita à formação de uma monocamada de partículas adsorvidas. Porém, dados experimentais (Norde, 1986; Ryde e col., 1991; Wahlgren e col., 1995; You e col., 1996; Ladam e col., 2000) demonstram que em alguns sistemas a adsorção continua além desta primeira camada e outras partículas podem se adsorver em partículas previamente adsorvidas na superfície do substrato. Uma das contribuições mais importantes no estudo da cinética de adsorção proteica é o modelo de adsorção seqüencial aleatória RSA (*random sequential adsorption*) (Feder & Giaver, 1980; Schaaf & Talbot, 1989). Este modelo teórico considera as moléculas protéicas como discos rígidos que interagem e adsorvem segundo os limites impostos pelo volume excluído, ou seja, as partículas adsorvidas não se sobrepõem umas às outras. As partículas adsorvem irreversivelmente na superfície do substrato, não possuindo assim grau de liberdade translacional ou dessorção da superfície. As moléculas adsorvem formando uma monocamada e a adsorção ocorre até que se atinja um grau de cobertura de aproximadamente 55% (*jamming limit*). O modelo foi estendido para se considerar também mudanças de conformação e orientação induzidas pela superfície, dessorção, polidispersidade, transporte difusivo, efeitos gravitacionais e formação de multicamadas (Van Tassel & Viot, 1997; Talbot e col., 2000; Ravichandran & Talbot, 2000; Bartelt & Privman, 1991; Senger e col., 1992; Yuan e col., 2000). A principal limitação deste modelo é a difícil inclusão de informações moleculares mais detalhadas a respeito das proteínas.

Outros modelos teóricos baseados no modelo RSA foram formulados para explicar a adsorção em multicamadas. Se a velocidade de adsorção é dependente do ambiente local e do cooperativismo entre as moléculas do adsorbato, o comportamento da adsorção pode ser descrito pelo modelo de adsorção seqüencial cooperativa, CSA (Evans, 1993). O modelo CSA prevê que a adsorção de moléculas próximas a sítios já preenchidos é favorecida, levando à aglomeração de moléculas de adsorbato ou formação de multicamadas (Bartelt & Evans, 1994). Os modelos propostos por Bartelt e Privman (1990 e 1991), Bartelt e Evans (1994) e van Tassel e Viot (1997) tentam explicar a adsorção irreversível de partículas em multicamadas. Neste último modelo as partículas adsorvem irreversivelmente, seja sobre a superfície do substrato, seja sobre a superfície de outra partícula pré-adsorvida.

Baseado em observações experimentais (imagens de AFM *in situ*), o modelo proposto por Coen e col. (2001) explica como a proteína A adsorve sobre superfícies de silício levando à formação de multicamadas adsorvidas. Este modelo (esquematizado na Figura 2) propõe que a adsorção ocorra em pelo menos duas etapas. Na primeira etapa, uma monocamada de moléculas protéicas denaturadas é formada logo após o contato da solução com a superfície do substrato. Devido à forte interação entre substrato e proteína, a monocamada tem espessura igual à cerca de um terço do valor do diâmetro da molécula livre em solução. Esta monocamada uniforme, fortemente adsorvida sobre a superfície do substrato, contém somente moléculas denaturadas e biologicamente inativas. Antes de se completar o recobrimento da superfície do substrato, novas moléculas começam a se adsorver sobre a monocamada previamente adsorvida, sendo este processo mais lento que o anterior. Desta vez, as interações entre proteína e a nova superfície (monocamada de moléculas denaturadas) são mais fracas. A espessura da segunda camada é semelhante ao valor do diâmetro das moléculas livres em solução, o que explica o fato das moléculas adsorvidas na segunda camada apresentarem atividade biológica. O mesmo raciocínio foi utilizado para explicar as camadas adsorvidas subsequente.

3 Materiais e métodos

3.1 - MATERIAIS

A enzima enolase (*Saccharomyces cerevisiae*, EC-4.2.1.11, massa molar de 46.700 g/mol, Sigma, St. Louis, USA) foi dissolvida em solução de NaCl (0,001 a 0,1 mol/L) na faixa de concentração de 0,002 a 1,0 g/L. Lâminas de silício (100) recobertas com uma camada de SiO₂ nativo (CrysTec, Berlin, Alemanha) foram utilizadas como substratos de partida porque são superfícies bem definidas, muito planas e refletoras (requisitos da elipsometria). Os substratos esféricos utilizados foram esferas de vidro (Suprind, SP) de faixa de diâmetro entre 0,42 mm e 0,6 mm. Após passagem por peneiras, as esferas apresentam diâmetro médio de 0,5 mm. Os polímeros utilizados no recobrimento das lâminas de silício foram poliestireno (PS, $M_v = 200000$ g/mol) (gentilmente fornecido pela BASF - Ludwigshafen, Alemanha). Nas reações de silanização foram utilizados (3-aminopropil) trimetoxisilano (APS) e triclorometilsilano (TMCS), também adquiridos da Fluka (Suíça). O tampão tris-HCl foi preparado a partir do reagente Trizma Base adquirido da Sigma (T1503). Reagentes como tolueno, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio e amônia, adquiridos da Nuclear (São Paulo), foram utilizados na limpeza dos substratos sem purificação prévia.

3.2 - MÉTODOS

A seguir, uma rápida descrição das condições experimentais empregadas no estudo da adsorção da enolase em substratos planos e esféricos. Uma descrição mais detalhada das técnicas utilizadas pode ser

encontrada no Apêndice A, juntamente com indicação de literatura pertinente a cada técnica.

3.2.1 Preparação dos substratos

As lâminas de silício foram limpas segundo o método descrito por Petri e col. (1999). As lâminas (1cm^2) foram mergulhadas em uma mistura de hidróxido de amônio (25%v/v), peróxido de hidrogênio (30% v/v) e água destilada (1:1:5) a uma temperatura de aproximadamente 80°C durante 20 minutos. Em seguida foram lavadas com água destilada (três vezes consecutivas) e secas com jato de nitrogênio.

As superfícies das lâminas de silício foram modificadas por meio da introdução de grupos metila ou amino-terminados após a reação de silanização com TMCS ou APS, respectivamente. A reação de silanização foi realizada segundo o método descrito em Petri e col, 1999. As lâminas, previamente lavadas e secas, foram deixadas em contato a 60°C com uma solução de TMCS ou APS (1% v/v) em tolueno. Os tempos reacionais foram de 5 h no caso da silanização com TMCS e 5 minutos no caso da silanização com APS. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tolueno (3 vezes) de modo a eliminar os grupos não ligados às superfícies da lâmina de silício.

A reação com TMCS leva à obtenção de superfícies hidrofóbicas, enquanto que no caso da silanização com APS obtém-se uma superfície hidrofílica com grupos amina primária na superfície, que em meio levemente ácido ($\text{pH} \sim 4,0$) estão protonados. Um esquema das reações de silanização com TMCS e APS é ilustrado na Figura 3. Em relação ao APS, há dois mecanismos possíveis para a formação desta monocamada, o de *enxertia* e o de *reticulação no plano* (Haller, 1978).

(a)

Figura 3. Reações de silanização das lâminas de silício com TMCS (a) e APS (b). O subscrito s refere-se à superfície.

As lâminas de silício também foram recobertas com filme fino de PS utilizando-se o método de revestimento rotacional (*spin coating*). Após limpeza com acetona, a lâmina de silício foi presa à base giratória do spinner (Spin Coater Headway - Garland, USA) por meio de vácuo e uma limpeza adicional foi realizada com tolueno (Figura 4). A lâmina foi então submetida a uma rotação de 3000 rpm durante um intervalo de 30 s. Durante a centrifugação, o solvente é rapidamente eliminado e filmes finos e

homogêneos são facilmente obtidos. A caracterização das superfícies foi realizada por meio da medida de ângulo de contato e elipsometria.

Figura 4. Esquema do preparo de filmes poliméricos finos e homogêneos por revestimento rotacional (*spin coating*).

3.2.2 Adsorção da enolase – determinação de Γ

A quantidade de enzima adsorvida (Γ) nos substratos planos (lâminas de silício não modificadas, silanizadas com APS ou TMCS ou recobertas com PS) foi determinada por elipsometria *in situ*. No caso de adsorção em substratos esféricos (microesferas de vidro não modificadas e silanizadas com TMCS), Γ foi determinada por meio de espectrofotometria UV-visível.

3.2.2.1 *Elipsometria in situ*

A caracterização das superfícies dos substratos planos e o acompanhamento *in situ* da cinética de adsorção da enolase foram realizados no elipsômetro DRE – ELX02 (Ratzeburg, Alemanha) (Figura 5),

equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$), com um ângulo de incidência ajustado em $70,0^\circ$ e cobrindo uma área de aproximadamente 3 mm^2 .

Figura 5. Elipsômetro DREX-1 (Ratzeburg, Alemanha).

A espessura d_x e o índice de refração n_x da camada desconhecida foram calculados a partir dos ângulos elipsométricos Δ e Ψ , utilizando-se a equação fundamental da elipsometria e cálculos iterativos com matrizes de Jones (Azzam & Bashara, 1979). A espessura da camada de SiO_2 nativo foi determinada em ar e em meio aquoso considerando-se o índice de refração do Si como $\tilde{n} = 3,88 - i0,018$ (Palik, 1985) e sua espessura como infinito. O índice de refração do meio foi fixado em 1,00 (ar) ou 1,3335 (meio aquoso, medido a $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ com um refratômetro Abbé). Como a camada de SiO_2 nativo é muito fina, seu índice de refração foi fixado em 1,462 (Palik, 1985) e apenas sua espessura foi calculada. Após medida de 20 amostras, a espessura média de SiO_2 nativo foi de aproximadamente $(1,9 \pm 0,2) \text{ nm}$. Após caracterização, algumas amostras de silícios foram silanizadas com APS ou TMCS. A espessura da monocamada amino-terminada foi determinada em ar, considerando-se o índice de refração do APS como sendo 1,424 (dado fornecido pelo fabricante). No caso da silanização com

TMCS, o índice de refração atribuído a este silano foi de 1,388 (dado fornecido pelo fabricante). O valor médio da espessura da camada de silano (TMCS ou APS) foi de aproximadamente $(1,1 \pm 0,2)$ nm. Os valores médios do índice de refração e espessura do filme de PS foram de $1,583 \pm 0,003$ e 84 ± 1 nm, respectivamente.

A adsorção a partir da solução de enzima foi monitorada *in situ* com auxílio de uma cela de poli(metacrilato de metila). Esta cela possui duas janelas de quartzo, uma para o feixe incidente e outra para o refletido, ambas com um ângulo de inclinação de 70° (Figura 6). As medidas foram feitas em sala com ar condicionado a uma temperatura de $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$. A quantidade adsorvida Γ é determinada a partir da eq.(2) (Motschamann e col, 1991):

$$\Gamma = \frac{d_{\text{enolase}} (n_{\text{enolase}} - n_0)}{dn/dc} = d_{\text{enolase}} c_{\text{enolase}} \quad (2)$$

onde n_{enolase} e d_{enolase} são os índices de refração e espessura da camada de enzima adsorvida, n_0 é o índice de refração da solução medido com um refratômetro Abbé, dn/dc é incremento do índice de refração determinado com um refratômetro diferencial e c_{enolase} é a concentração média da enzima na camada. No sistema utilizado neste estudo, n_0 foi medido para cada concentração e dn/dc foi considerado igual a 0,16 mL/g (Ortega-Vinuesa e col., 1998) a uma temperatura de 23°C .

A partir dos ângulos elipsométricos Δ e ψ e de um modelo de multicamadas composto por silício, dióxido de silício, monocamada amino-terminada ou filme polimérico, camada de enzima e solução é possível determinar a espessura da camada adsorvida (d_{enolase}). Contudo, o baixo valor de d_{enolase} e a pequena diferença entre os índices de refração do substrato, enzima e solução impedem a determinação independente dos valores de n_{enolase} e d_{enolase} . Portanto, n_{enolase} foi mantido constante a 1,50 e d_{enolase} foi então calculada. No entanto, deve-se lembrar que se o índice de

refração assumido para a camada adsorvida está numa faixa razoável (entre 1,40 e 1,60), o produto $n_{\text{enolase}}d_{\text{enolase}}$ deveria ser um valor constante e não dependeria do modelo adotado (Fujimoto & Petri, 2001; Azzam & Bashara, 1979; Motschmann e col., 1991). Este produto é o parâmetro necessário para calcular o valor de Γ a partir da eq. (2).

Figura 6. Realização das medidas elipsométricas durante ensaio de adsorção *in situ*: (a) o conjunto cela-substrato é alinhado com o porta-amostra do elipsômetro e (b) o substrato é posicionado de modo que o feixe incida na região central de sua superfície.

3.2.2.2 Espectrofotometria UV-visível

Após limpeza em mistura oxidativa (Petri e col, 1999), as esferas foram acondicionadas em tubos *ependorf* juntamente com a solução de enzima. As isotermas de adsorção da enolase em esferas de vidro foram obtidas a partir do monitoramento da concentração de enzima livre após contato com solução de enolase (0,1 a 1,0 g/L em solução de NaCl 0,001 mol/L e 0,1 mol/L). O equipamento utilizado na determinação de Γ foi um espectrofotômetro UV-visível da Beckman Coulter (USA), modelo DU-640.

A quantidade de enzima livre em solução foi obtida a partir da leitura da absorbância no comprimento de onda (λ) de 280nm (Sangadala e col.,

1995) e à temperatura ambiente (24 ± 2 °C). A concentração de enolase livre em solução, C_{enolase} , foi determinada a partir dos valores de absorbância lida a $\lambda = 280$ nm, do coeficiente de absorptividade $a_{280\text{nm}} = 0,895 \text{ mL/mg.cm}^{-1}$ (Sangadala e col., 1995) e do caminho óptico b (1 cm) aplicados na eq.(3) (lei de Beer-Lambert).

$$\text{Abs} = a.b.C_{\text{enolase}} \quad (3)$$

A quantidade de enolase adsorvida, Γ , nas microesferas foi obtida a partir da eq.(4) (Kamyshny e col., 2001), onde C_{ads} é a quantidade de enolase adsorvida (obtida pela diferença entre os valores da concentração de enolase inicial e da concentração de enolase livre em solução (C_{enolase}) (determinada a $\lambda = 280$ nm ou 595 nm) após contato com o substrato e V é o volume da solução.

$$\Gamma = (C_{\text{ads}} \times V) / (A_{\text{superficial}}) \quad (4)$$

A determinação da concentração de enolase livre em solução também foi realizada por meio da reação da enzima livre com o reagente de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford foi preparado por meio da diluição de 10 mg de Comassie Blue G-250 (CBBG) (Fundação Sardi, SP) na mistura de 10 mL de ácido fosfórico (Synth, SP) e 5 mL de etanol (Synth, SP). A solução foi então diluída a 100 mL em água destilada. Previamente ao uso do reagente, foram adicionados 10 mL de NaOH (1 mol/L) e em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman#1. Em uma cubeta de poliestireno, 20 μL da solução da enzima foram adicionados a 1 mL do reagente de Bradford. A leitura da absorbância da solução a $\lambda = 595$ nm e temperatura ambiente (24 ± 2 °C) foi realizada após um tempo de reação de 1 minuto. A curva padrão, gráfico dos valores de absorbância inicial versus a concentração inicial da enolase em solução, foi ajustada segundo um polinômio de segundo grau. Após contato com as esferas de vidro, a

concentração de enolase livre em solução foi obtida aplicando-se os valores da absorbância da solução no polinômio da curva padrão. Assim como no método anterior, a concentração de enzima adsorvida (C_{ads}) é obtida a partir da diferença da concentração inicial e concentração de enzima livre após adsorção. A quantidade de enzima adsorvida foi então obtida a partir da eq.(4).

3.2.3 Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas a uma temperatura de $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$ pelo método da gota séssil em um aparato montado conforme o esquema ilustrado na Figura 7. A imagem da gota sobre a superfície foi capturada por uma câmera digital Casio QV-10 conectada a um computador. Uma gota de água destilada (volume de $8 \mu\text{L}$) foi usada para determinar o ângulo de avanço (θ_A). Para o ângulo de recesso (θ_R), $4 \mu\text{L}$ da gota original foram aspirados com auxílio de uma microseringa. A histerese ($\Delta\theta$) dos ângulos de contato medidos foi calculada a partir da diferença $\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$. Todas as superfícies medidas correspondem a longos períodos de adsorção (acima de 16 horas). As amostras foram colocadas em uma cela de quartzo saturada com vapor d'água. A fim de se verificar efeitos de envelhecimento na molhabilidade da superfície, os ângulos de avanço (θ_A) foram medidos em intervalos de tempo de 10 minutos durante 1 hora. Neste caso, as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo água. A cubeta foi mantida tampada durante as medidas a fim de evitar evaporação da gota, o que levaria a alterações do ângulo de contato. Os resultados aqui apresentados são valores médios obtidos a partir de triplicatas. A imagem digitalizada da gota foi então analisada por um software adequado (Corel Draw® 8.0), o qual permitiu medir o ângulo de contato diretamente a partir da imagem digital.

Figura 7. Montagem experimental usada na medida de ângulo de contato de superfícies planas.

3.2.4 Microscopia de força atômica

Imagens de AFM das superfícies recobertas por enolase foram obtidas no ar e em meio aquoso a temperatura ambiente com auxílio de um microscópio Nanoscope IIIA (Veeco) (Figura 8) instalado no Laboratório de Filmes Finos (Instituto de Física, USP, São Paulo) coordenado pela Dra. Maria Cecília Salvadori.

O microscópio foi operado em *tapping mode*[®] (contato intermitente) usando cantilevers de silício com amplitude de oscilação de 50-100 nm (ar) e frequência de ressonância de 300 kHz, aproximadamente.

Figura 8. Microscópio de força atômica, modelo Nanoscope IIIa (Veeco) instalado no Instituto de Física da USP (São Paulo).

As imagens *in situ* da enolase adsorvida nas superfícies de silício e PS foram adquiridas no laboratório do Dr. Thomas Schimmel (Forschungszentrum Karlsruhe, Alemanha) com o auxílio de uma cela de fluídos (Figura 9) acoplada a um microscópio AFM do mesmo modelo descrito anteriormente. Cantilevers de silício (Mikromasch, USA), com constante de mola de 0,35 N/m e frequência de oscilação de 8 kHz, foram montados na cela de fluídos. A cela foi primeiramente preenchida com aproximadamente 25 μL de solução de NaCl (0,001 ou 0,1 mol/L) a fim de obter a imagem da superfície antes da adsorção da enolase. Em seguida, esta solução foi trocada por solução de enolase (0,01 ou 0,5 g/L). As imagens das áreas analisadas (20 x 20, 5 x 5 e 1 x 1 μm^2) foram obtidas com resolução de 512 x 512 pontos (pixels). O processamento das imagens foi realizado por meio do software do próprio microscópio Nanoscope III.

Figura 9. (a) Cella de líquidos usada na obtenção de imagens de AFM em líquidos, (b) esquema do interior e do funcionamento da cella e (c) ampliação da imagem do conjunto cantilever-ponta interagindo com a superfície da amostra em ambiente líquido.

3.2.5 Espectroscopia de fotoelétrons com fonte de raios-X (XPS)

As análises de XPS das superfícies de silício e PS, recobertas ou não com enolase, foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Rouxhet (Université Catholique de Louvain, Bélgica). Os detalhes experimentais estão descritos no trabalho de Dupont-Gillain e col. (1999).

3.2.6 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho (PAS)

O equipamento utilizado na aquisição dos espectros fotoacústicos foi o espectrômetro com transformada de Fourier da Bomem, modelo DA3, equipado com acessório fotoacústico da MTEC, modelo 200. Os espectros fotoacústicos das microesferas de vidro foram obtidos na região do

infravermelho (4000 a 450 cm^{-1}) com número de varredura igual a 128, resolução igual a 4 cm^{-1} .

3.2.7 Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (*Small Angle X-ray Scattering* - SAXS)

Os experimentos de SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, SP) à temperatura ambiente de aproximadamente $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ e com radiação com comprimento de onda de $\lambda = 1.608 \text{ \AA}$. A solução de enolase (6 g/L em NaCl 0,001 mol/L) foi selada em uma célula de acrílico de 1mm de espessura, com janelas de mylar perpendiculares ao feixe incidente de raio-X. A amostra foi medida em duplicata com um tempo de aquisição de 20 minutos em cada medida. Os dados apresentados neste trabalho correspondem à média aritmética dos dados obtidos. Não se observou nenhum dano à amostra devido à ação da radiação durante a aquisição dos dados.

A intensidade SAXS $I(q)$ de uma solução isotrópica de partículas esféricas monodispersas de baixa anisotropia (razão entre o maior e o menor eixo da partícula) é dada por (Guinier & Fournet, 1955; Hayter & Penfold, 1983):

$$I(q) = kP(q)S(q) \quad (5)$$

onde $k = \gamma n_p (\Delta\rho)^2 V^2$; γ é um fator relacionado a efeitos instrumentais, n_p corresponde à densidade do número de partículas, $\Delta\rho$ é o contraste de densidade eletrônica entre o espalhamento da partícula e do meio e V é o espalhamento do volume da partícula. $P(q)$ na eq. (5) é o fator forma da partícula normalizado ($P(0) = 1$) e $S(q)$ é o fator de interferência interpartículas ($q = 4\pi \sin(\theta/\lambda)$ é o vetor espalhamento e 2θ é o ângulo de espalhamento). Tendo-se uma baixa densidade de número de partículas,

$S(q) \approx 1$, então $I(q)$ torna-se proporcional a $P(q)$. O programa CRY SOL (Svergun et al, 1995) foi utilizado no cálculo de $P(q)$ a partir da estrutura cristalina obtida por raio-X da enolase dimérica (código PDB = 1ONE) (<http://www.rcsb.org>). Informações a respeito dos objetos espalhadores também podem ser obtidas a partir da curva experimental através da análise da função de distribuição de distância $p(r)$. A intensidade de espalhamento $I(q)$ é descrita pela transformada de Fourier de $p(r)$ (Glatter, 1982):

$$p(r) = \left(\frac{1}{2\pi^2} \right) \int_0^\infty I(q) q r \sin(qr) dq \quad (6)$$

a qual fornece informações a respeito da forma da partícula e $p(r) = 0$ para r distâncias maiores do que a dimensão máxima da partícula, D_{max} . Para objetos isoméricos (como esferas), $p(r)$ apresenta um máximo de aproximadamente $D_{max}/2$. Para objetos anisotrópicos, $p(r)$ decai linearmente a distâncias entre os tamanhos de seção transversal dos objetos e sua dimensão máxima (Glatter, 1979).

A função $p(r)$ também fornece o valor do raio da partícula, o raio de giro, R_g , através de (Glatter, 1979):

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} \rho(r)^2 dr}{2 \int_0^{D_{max}} \rho(r) dr} \quad (7)$$

O programa GNOM (Semenyuk & Svergun, 1991) foi usado para calcular $p(r)$ a partir das curvas de SAXS. O valor de R_g também pode ser calculado a partir da curva de espalhamento na menor faixa de q onde a intensidade obedece a lei de Guinier (Guinier & Fournet, 1955):

$$I(q) = k \exp \left(\frac{-q^2 R_g^2}{3} \right) \quad (8)$$

Portanto, o valor de R_g pode ser diretamente calculado a partir da inclinação da parte linear do gráfico $\ln[I(q)]$ versus q^2 (gráfico de Guinier).

3.2.8 Medida da atividade da enolase adsorvida:

A atividade da enolase adsorvida foi monitorada por espectrofotometria ($\lambda = 240$ nm) à temperatura ambiente (24 ± 2 °C), segundo o método descrito por Balantyne & Warmington (2000). A solução do substrato, constituída de $MgCl_2$ (2,7 mmol/L), EDTA (1,0 mmol/L) e PGA (1,2 mmol/L) dissolvidos em tampão tris-HCl (50 mmol/L, pH = 7,4), foi deixada em contato com uma massa conhecida de esferas de vidro recobertas por enolase. A absorbância foi lida em diferentes intervalos de tempo. Após cada leitura, a solução foi novamente colocada em contato com as esferas de vidro. Uma nova leitura foi realizada após um novo intervalo de tempo de contato.

4 Resultados e Discussão

4.1 - SUBSTRATOS PLANOS

4.1.1 Cinética de adsorção - Elipsometria

As cinéticas de adsorção da enolase nos substratos de silício não modificado (Si/SiO₂), silício modificado com APS e filme de PS em regime diluído ($C_{enolase} = 0,01$ g/L) e força iônica baixa (NaCl 0,001 mol/L) são mostradas na Figura 10. Observa-se que todas as curvas apresentam características similares e podem ser divididas em três regiões distintas: (i) um período inicial com rápido aumento linear da quantidade de enzima adsorvida (Γ) com a raiz quadrada do tempo ($t^{0,5}$); (ii) um patamar de adsorção e (iii) um terceiro estágio com um aumento contínuo de Γ com $t^{0,5}$. As curvas de cinética na Figura 10 também mostram que o primeiro estágio é muito rápido (cerca de 10 minutos) independentemente do substrato utilizado e que a enolase apresenta maior afinidade pela superfície de Si/SiO₂.

Segundo Norde (Norde, 1986; Norde & Giacomelli, 2000), a cinética de adsorção é um processo reversível e ocorre em cinco etapas: (1) transporte das moléculas de adsorbato da solução rumo à interface, (2) adesão do adsorbato na superfície do substrato, (3) rearranjos estruturais das moléculas de adsorbato no estado adsorvido, (4) desprendimento do adsorbato da interface e (5) volta à solução. A Figura 10 mostra que as curvas de cinética de adsorção da enolase nas superfícies de silício não modificado, silanizado com APS e recoberto por PS apresentam três regiões distintas, indicando que o processo de adsorção ocorre em três etapas. Na Figura 11 é mostrada a curva referente à cinética de adsorção da enolase (0,01g/L em NaCl 0,001 mol/L) na superfície de silício não modificado. Em destaque, as três etapas do processo de adsorção da enolase. Não houve dessorção significativa durante três dias de observação, o que implica que a

enolase adsorve irreversivelmente sobre os substratos (Almeida e col., 2002). Portanto, o processo de adsorção desta enzima poderia ser descrito pelas três primeiras etapas do modelo de adsorção descrito por Norde (1986).

Figura 10. Cinética de adsorção da enolase (0,01 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em silício não modificado (■), silício silanizado com APS (O) e recoberto por filme de PS (+) (Almeida e col., 2002).

A obtenção de curvas de adsorção da enolase sobre silício recoberto por PS foi dificultada devido à camada de água presente no interstício formado entre o filme e o silício, o que atrapalhou em parte as medidas elipsométricas. Como o filme polimérico tem caráter hidrofóbico, a água procura interagir diretamente com a superfície da lâmina, formando-se assim uma camada irregular de água entre o filme polimérico e a superfície do silício (Castro e col., 2004). A espessura desta camada de hidratação foi medida em cerca de 20 amostras de PS e a média foi de aproximadamente $(2,0 \pm 0,5)$ nm. Para controlar tal problema, a adição da enzima foi realizada somente após um intervalo de cerca de 1-2 horas, período de tempo necessário para a formação e estabilização da camada de hidratação.

Figura 11. Curva de cinética de adsorção da enolase (0,01 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em silício não modificado.

4.1.1.1 Influência da força iônica

Sabe-se que o processo de adsorção envolve (i) transporte da proteína até a superfície do substrato, (ii) sua adesão nesta superfície e (iii) mudanças conformacionais que ocorrem após adsorção, as quais podem ou não favorecer uma interação mais forte entre proteína e substrato. Neste último estágio pode-se ainda incluir a possibilidade de mobilidade lateral da proteína adsorvida. Cada um destes estágios pode ser afetado de maneira diferente pela variação da força iônica da solução (Ramsden & Prenosil, 1994). A fim de se estudar a influência da força iônica no comportamento de adsorção da enolase em substratos hidrofílico (Si/SiO₂ e Si/SiO₂/APS) e hidrofóbico (PS), foram realizadas cinéticas de adsorção em diferentes concentrações de NaCl (0,001 g/L a 0,1 g/L). A concentração da enolase foi fixada em 0,01 g/L.

Segundo Arakawa e Timasheff (1984), NaCl é um sal que promove o efeito *salting-out* em proteínas. Conforme a sua concentração aumenta, a solubilidade da proteína nativa diminui, favorecendo as interações proteína-proteína e possivelmente proteína-superfície, as quais reduzem a área da superfície da proteína exposta à solução do sal. Duas possíveis consequências podem ser consideradas: (i) as proteínas agregam formando oligômeros e (ii) possíveis mudanças conformacionais podem ocorrer.

Trabalhos teóricos (Bartelt & Privman, 1991; Lundström, 1985; Schaaf & Talbot, 1989; van Tassel & Viot, 1997) e experimentais (Shibata e col., 1996; Gage & Norde, 1997; Norde & Giacomelli, 2000) mostram que em sistemas muito diluídos ($c_{\text{proteína}} < 0,01\text{g/L}$), o **primeiro estágio da adsorção** é um processo puramente difusivo. O coeficiente de difusão aparente D pode ser calculado a partir da eq.(9) considerando que o processo segue as leis de Fick, onde $c_{\text{solução}}$ é a concentração da proteína em solução e t é o tempo:

$$\Gamma(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} c_{\text{solução}} \sqrt{Dt} \quad (9)$$

A Figura 12 mostra a quantidade de enolase adsorvida, Γ , nos diferentes substratos em função da raiz quadrada do tempo, $t^{0,5}$, em diferentes concentrações de NaCl. O coeficiente de difusão D foi então calculado a partir da inclinação da parte linear das curvas de cinética. Os valores de D obtidos na adsorção de enolase no silício e no PS são demonstrados na Tabela 2.

Os valores de D calculados a partir das curvas de cinética de adsorção da enolase em silício não modificado e recoberto com filme de PS

foram da ordem de 10^{-6} e 10^{-7} cm²/s, respectivamente, demonstrando que a difusão das moléculas é favorecida pela hidrofiliicidade da superfície. O aumento da força iônica não promoveu a formação de agregados de moléculas de enolase, uma vez que não houve variação significativa dos valores de D . Todos os experimentos foram realizados em pH = 6,7, o qual é muito próximo ao valor do ponto isoelétrico da enolase (6,1) (Chin e col., 1981). Isto explicaria o fato da força iônica não interferir no comportamento da adsorção da enolase neste primeiro estágio, já que sob tais condições as moléculas de enolase apresentam carga líquida nula e os efeitos de blindagem são minimizados.

Figura 12. Curvas de cinética de adsorção da enolase (0,01 g/L) nos substratos: silício não modificado (Si/SiO₂), silanizado com APS e recoberto com filme polimérico de PS. Força iônica do meio: 0,001 mol/L (quadrado), 0,01 mol/L (círculo) e 0,1 mol/L (asterisco).

Tabela 2. Coeficientes de difusão *D* calculados a partir da eq.(7) e curvas ilustradas na Figura 12.

Substrato	NaCl 0,001 mol/L	NaCl 0,01 mol/L	NaCl 0,1 mol/L
	<i>D</i> (cm ² .s ⁻¹)	<i>D</i> (cm ² .s ⁻¹)	<i>D</i> (cm ² .s ⁻¹)
Si/SiO ₂	3x10 ⁻⁶	4x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁶
APS	5x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁷	7x10 ⁻⁸
PS	6x10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁷	4x10 ⁻⁷

A difusão de moléculas isoladas no primeiro estágio do processo de adsorção da enolase nos substratos estudados foi confirmada por meio da equação de Stokes-Einstein (eq.(10)), a qual relaciona o valor de *D* diretamente com o valor do raio hidrodinâmico (*R_h*):

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

(10)

onde *k* é a constante de Boltzmann, *T* é a temperatura e *η* é a viscosidade do solvente. Chin e col. (1981) calcularam o raio de Stokes da enolase a partir dos coeficientes de sedimentação e fricção, considerando que a molécula de enzima possui forma esférica. Ao monômero foi atribuído o valor de 25,6 Å, enquanto que o dímero Mg-enolase apresentou um valor de 36,2 Å. Aplicando-se os valores de *D* (Tabela 2) na eq.(10), foram obtidos valores médios de *R_h* de 12 ± 3 Å na adsorção em silício, e de 50 ± 10 Å na adsorção em PS. No caso do silício, este valor está subestimado, o que pode ter sido decorrente do ajuste realizado nas curvas de cinética (em tempos curtos) necessário para o cálculo de *D*. Por outro lado, os dados indicam a ausência de grandes agregados de enolase em solução. No caso da adsorção em APS em força iônica baixa, as moléculas apresentam

valores médios de R_h de 59 ± 13 Å, mas em força iônica mais elevada obteve-se $R_h \approx 300$ Å, indicando agregação das moléculas de enolase em solução.

Observa-se que o valor de D varia de acordo com o caráter hidrofílico da superfície. O valor de D obtido durante a adsorção da enolase na superfície hidrofóbica do filme de PS é menor do que aquele obtido na adsorção na superfície hidrofílica do silício. Uma molécula proteica é composta de amino ácidos polares e apolares. Em 1987, Kauzmann demonstrou que aminoácidos com caráter apolar tendem a se esconder no interior da molécula da proteína. Portanto, mesmo desconhecendo as coordenadas atômicas de uma proteína, pode-se assumir que aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis serão encontrados na superfície da molécula. Então, a difusão mais lenta durante a adsorção da enolase em superfícies hidrofóbicas pode ser decorrente de mudanças conformacionais da molécula ainda em solução necessárias para o favorecimento da adsorção nesta superfície e não devido à força iônica do meio.

O segundo estágio do processo de adsorção é caracterizado por um patamar na curva de cinética (Figura 11), o qual foi correlacionado à saturação da primeira camada de enolase adsorvida. As primeiras moléculas alcançam os sítios de adsorção livres e se adsorvem nas superfícies dos substratos, alterando assim as características iniciais das superfícies dos substratos. As próximas moléculas necessitam então se reorganizar de modo a vencer a barreira energética imposta pelas primeiras moléculas adsorvidas. Este é um processo lento, pois o número de sítios de adsorção livres na superfície do substrato diminui com o tempo.

Segundo a Figura 12, o aumento da força iônica levou a uma diminuição do valor de Γ no patamar de adsorção, o que pode indicar que neste estágio a adsorção é dirigida principalmente por atrações eletrostáticas. O aumento da concentração de sal desfavorece este tipo de interação devido ao efeito de blindagem na molécula de enolase adsorvida.

Ramsden e Prenosil (1994) estudaram o efeito da força iônica na adsorção da transferrina em superfícies de dióxido de silício e dióxido de titânio. A análise das curvas cinéticas da transferrina mostrou que o aumento da força iônica levou à redução da difusão das moléculas e também da quantidade de proteína adsorvida. Neste caso, a redução de Γ foi atribuída ao aumento da área ocupada pela molécula protéica, o que poderia indicar possível denaturação (exposição dos grupos hidrofóbicos do interior da molécula protéica para o ambiente hidrofílico) da proteína. As curvas de cinética de adsorção da enolase mostram comportamento semelhante. O tempo de duração do patamar de adsorção, ao qual foi atribuída a formação da primeira camada adsorvida, diminui com o aumento da concentração do sal. Pode-se concluir que a enolase adsorvida ocupe uma área cada vez maior conforme o aumento da força iônica, fazendo com que o tempo necessário para a formação da primeira camada adsorvida seja menor em força iônica baixa do que em força iônica mais elevada. Uma vez que a repulsão eletrostática intermolecular é minimizada pela blindagem de cargas, o empacotamento das moléculas adsorvidas também é favorecido pelo aumento da força iônica.

O **terceiro estágio do processo de adsorção** é caracterizado por um contínuo aumento de Γ em função do tempo de adsorção (Figuras 11 e 12). Este aumento pode ser atribuído à adsorção de novas moléculas de enolase sobre a primeira camada previamente adsorvida no estágio anterior. Este estágio é mais lento que o primeiro provavelmente devido à barreira energética resultante de interações desfavoráveis proteína-proteína e a redução do número de sítios de adsorção na superfície do substrato. O aumento contínuo da quantidade de enolase adsorvida também pode ser atribuído ao efeito de cooperativismo, bastante comum em sistemas biológicos. A difusão lateral de moléculas de enolase já adsorvidas poderia também ser uma possível razão para os efeitos observados (Ramsden & Prenosil, 1994). Ravichandran & Talbot (2000) mostraram por meio de simulações que em força iônica alta, a interação Coulômbica entre as proteínas é blindada e a difusão lateral de proteínas previamente adsorvidas

levam à aglomeração destas nas superfícies, abrindo espaços adicionais para que novas moléculas possam adsorver. Mudanças conformacionais nas moléculas de enolase adsorvidas também podem ocorrer no sentido de otimizar a interação proteína-substrato. Aparentemente não há efeito da força iônica neste estágio do processo de adsorção da enolase, como pode ser observado pela variação de Γ após longos tempos de adsorção (Figura 12). No caso do substrato mais hidrofílico (silício não modificado), a força iônica não influenciou o processo de adsorção, pois o valor médio de Γ foi de $4,9 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$ após 12 horas de adsorção. Com relação ao substrato hidrofóbico (PS), observa-se que com o aumento da força iônica, a quantidade média de enolase adsorvida foi de $\Gamma \approx 4,3 \pm 0,5 \text{ mg/m}^2$, no mesmo período de adsorção. Como esta diferença está dentro do erro experimental, conclui-se então que a influência da força iônica neste terceiro estágio do processo de adsorção da enolase é desprezível.

4.1.1.2 Influência da concentração

Soluções concentradas de enolase (0,5g/L) em NaCl 0,001 mol/L e 0,1 mol/L foram deixadas em contato com silício não modificado durante 18 horas. As curvas de cinética de adsorção nestas condições estão ilustradas na Figura 13. Na adsorção da enolase em sistemas diluídos (Figura 12), as moléculas adsorvidas provavelmente sofrem mudanças conformacionais atribuídas ao segundo estágio do processo de adsorção, caracterizado pelo patamar na curva de cinética.

Segundo Morrissey (1977), em baixas concentrações a ausência de impedimento estérico dá à molécula de proteína a possibilidade de poder alterar sua conformação. As curvas de cinética obtidas em sistema concentrado (Figura 13) mostram a ausência desta segunda etapa. Acredita-se que em altas concentrações as moléculas adsorvem sem tempo suficiente para alterar sua conformação após adsorção. Comparando-se as curvas ilustradas na Figura 13 observa-se que não há variação expressiva na quantidade de enzima adsorvida, mesmo elevando-se a concentração da

enolase em 50 vezes. Isto indica que a enolase adsorve até Γ atingir um limite de saturação. Este resultado corrobora com o modelo proposto por Söderquist e Walton (1980), onde se assume que a superfície do substrato é coberta gradualmente por moléculas protéicas. Então, ao atingir 50% de cobertura da superfície, as moléculas se reorganizam e um empacotamento mais eficiente é obtido, juntamente com alterações conformacionais e possível dessorção.

Figura 13. Curva de cinética de adsorção da enolase (0,5 g/L) em silício não modificado: (a) NaCl 0,001 mol/L e (b) NaCl 0,1 mol/L.

Em todos os sistemas estudados a espessura da camada adsorvida no limite de saturação de Γ é de aproximadamente duas vezes o valor do R_g de uma molécula isolada de enolase. Em condições fisiológicas e na presença de íons Mg^{2+} , a enolase é um dímero composto por duas cadeias idênticas (A e B). Cada sub-unidade de enolase (massa molar de 46.700 g/mol) é composta por 436 resíduos e possui dimensões de 60 x 55 x 45 Å (Lebioda e col., 1989). Medidas de SAXS foram realizadas a fim de elucidar o tamanho e a forma das moléculas de enolase (6 g/L) em solução de NaCl 0,001 mol/L na ausência de íons Mg^{2+} . O bom ajuste entre os dados experimentais e a intensidade SAXS (função $P(q)$) calculada pelo software CRY SOL (código PDB = 1ONE) mostrou que a enolase adota uma conformação muito próxima da estrutura cristalina (Figura 14). O valor de R_g obtido a partir da função $P(q)$ foi de 29,8 Å, considerando-se a presença de uma camada de hidratação com 3 Å de espessura. O gráfico de Guinier (Figura 15) mostra uma faixa linear na região de baixos valores de q (dentro do limite de Guinier: $qR_g < 1$), confirmando um sistema monodisperso com partículas com R_g igual a 31,9 Å. Os valores encontrados são semelhantes ao valor do raio de Stokes obtido experimentalmente por Chin e col. (1981). A enolase monomérica apresentou um raio de 25,6 Å enquanto que na forma dimérica o raio foi de 36,2 Å.

Figura 14. Curva de SAXS medida para a solução de enolase em NaCl 0,001 mol.L⁻¹ (C_{enolase} = 6 g/L) e ajuste com o programa CRY SOL (linha sólida).

Figura 15. Gráfico de Guinier obtido a partir da curva de SAXS da enolase em solução de NaCl 0,001mol/L ($c_{\text{enolase}} = 6\text{g/L}$).

4.1.2 Isotermas de adsorção - Elipsometria

4.1.2.1 Influência da hidrofilicidade da superfície do substrato

As isotermas de adsorção da enolase em substratos planos hidrofílico (silício não modificado) e hidrofóbico (filme de PS) em diferentes tempos de adsorção em força iônica baixa (NaCl 0,001 mol/L) estão ilustradas na Figura 16. As curvas mostram um aumento contínuo da quantidade de enolase adsorvida (Γ) em função da concentração de enolase após 10 minutos, 50 minutos e 24 horas de adsorção.

A enolase adsorve fortemente às superfícies dos substratos estudados uma vez que um alto valor de Γ foi obtido mesmo após lavagem com água e secagem dos substratos com jato de nitrogênio. Os resultados também demonstram que a enolase não apresenta uma adsorção preferencial, pois os valores de Γ tanto na superfície hidrofílica quanto na superfície hidrofóbica são semelhantes. Segundo Tengvall e col. (1998), proteínas são altamente estáveis em soluções aquosas e na presença de

uma superfície estranha, o estado adsorvido é geralmente o mais favorável energeticamente ($\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} - T\Delta S_{\text{ads}} < 0$). As enzimas são adsorbatos muito complexos, pois possuem simultaneamente domínios carregados, além de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos. De acordo com os dados do PDB e do programa (software) Raswin Molecular Graphics (Rasmol), uma cadeia de enolase é composta de 436 resíduos de aminoácidos, dos quais 47% são hidrofóbicos e 53% são hidrofílicos. Portanto, não há predominância de um tipo de resíduo. Interações favoráveis entre os segmentos hidrofílicos e a superfície de silício devido a interações eletrostáticas e ligações hidrogênio, por exemplo, podem contribuir para o processo de adsorção (redução da ΔG_{ads}). Por outro lado, ligações hidrofóbicas entre PS e os segmentos hidrofóbicos da enolase podem levar à redução de ΔH_{ads} e, neste caso, o ganho entrópico pode ser a força motriz para a adsorção. Além disso, dependendo da distribuição de resíduos na superfície da enolase, domínios (*patches*) de grupos hidrofóbicos na superfície da molécula contribuem para a forte adsorção protéica nos substratos hidrofóbicos.

Figura 16. Isotermas de adsorção da enolase em NaCl (0,001 mol/L) sobre silício não modificado (a) e filme de PS (b) a $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Os valores de Γ correspondem aos tempos de adsorção de 10 minutos (■), 50 minutos (○) e 24 horas (▲). As linhas servem apenas de guia para os olhos. As barras de erro correspondem ao desvio padrão obtido a partir da média de triplicatas (Almeida e col., 2002).

Embora Γ apresente um crescimento assíntótico em função do tempo, o comportamento da adsorção da enolase não pode ser descrito com base no modelo de Langmuir, o qual assume que a adsorção ocorre de maneira reversível com formação de apenas uma monocamada. A elevada quantidade final de material adsorvido obtida por elipsometria e as imagens de AFM mostradas a seguir evidenciam a formação de mais de uma camada de enolase adsorvida.

4.1.2.2 Influência do pH

Proteínas em solução se comportam como polieletrólitos e após pequenas variações de força iônica e pH podem sofrer interações eletrostáticas intramoleculares, o que induz mudanças conformacionais devido à protonação e desprotonação (Bagchi e Birnbaum, 1981). Com o intuito de se entender como o pH influencia o comportamento de adsorção da enolase nas superfícies do silício não modificado e silanizado com APS, foram realizados experimentos de adsorção em NaCl 0,001 mol/L durante 16 horas com os valores de pH variando de 3,5 a 9,5. A Figura 17 mostra os valores de Γ em função do pH do meio.

A superfície de silício (Si/SiO_2) se torna negativamente carregada somente em valores de pH acima de 6,8 (Loidl-Stahlhofen e col., 2001), enquanto que superfícies amino-terminadas se tornam positivamente carregadas em $\text{pH} < 4$. Nos dois substratos, as curvas são simétricas com relação ao ponto isoelétrico (pI) da enolase, onde o valor máximo de quantidade adsorvida é observado. Quando o pH do meio está próximo ao valor de pI ocorre uma redução da solubilidade da enzima, pois o balanço entre cargas positivas e negativas da cadeia protéica é nulo. Nestas condições as interações proteína-solvente são desfavorecidas e as interações proteína-proteína e proteína-superfície passam a dominar, explicando o máximo de Γ em $\text{pH} = \text{pI}$ da proteína.

Em $\text{pH} < \text{pI}$, alguns segmentos da cadeia da enolase (como grupos amino e carboxílico) podem estar protonados, aumentando assim a solubilidade e desfavorecendo as interações entre proteína e superfície do substrato. Espera-se que haja repulsão eletrostática entre os grupos amino da enolase e a superfície de APS especialmente em pH próximo a 3,5. Em $\text{pH} > \text{pI}$, repulsões eletrostáticas entre a superfície parcialmente carregada de SiO_2 e os grupos negativamente carregados da enolase podem ser os responsáveis pela redução da quantidade de enolase adsorvida nestas condições.

Figura 17. Quantidade de enolase adsorvida ($c_{\text{enolase}} = 0,01 \text{ g/L}$ em $\text{NaCl } 0,001 \text{ mol/L}$) em silício não modificado (■) e silanizado com APS (Δ) em função do pH a $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Os valores de Γ correspondem a 16 horas de adsorção. As linhas servem apenas de guia para os olhos. As barras de erro correspondem ao desvio padrão obtido a partir da média de triplicatas (Almeida e col., 2002).

4.1.3 Microscopia de força atômica (AFM)

4.1.3.1 AFM contato intermitente *in situ*

Imagens de AFM de contato intermitente (tapping mode®) *in situ* foram obtidas em solução aquosa de NaCl 0,001 mol/L e 0,1 mol/L. As imagens permitiram uma comparação direta com as curvas de cinética de adsorção obtidas pela elipsometria. Foram obtidas imagens de AFM das superfícies do silício não modificado (substrato hidrofílico) e do filme de PS (substrato hidrofóbico) antes e após contato com a solução de enolase em diferentes tempos de adsorção e força iônica.

A imagem de AFM na Figura 18 mostra a superfície do silício em NaCl 0,001 mol/L na ausência de enolase. O silício possui superfície plana com rugosidade (rms) menor que 0,10 nm.

Figura 18. Imagens de AFM contato intermitente *in situ* (em NaCl 0,001mol/L) do silício. A rugosidade (expressa em valores de média quadrática, *root mean square*, rms) da superfície do substrato foi de 0,10 nm. Áreas de varredura = 2 x 2 μm , escala em Z de nm.

A elipsometria demonstrou que o processo de adsorção da enolase nos substratos no regime diluído ($c_{\text{enolase}} = 0,01\text{g/L}$) apresenta três etapas. As Figuras 19 e 20 mostram as curvas de cinética de adsorção da enolase

em silício destacando as três etapas do processo de adsorção em força iônica baixa e alta, respectivamente. As figuras também mostram as imagens de AFM *in situ* correspondentes a cada uma das três etapas do processo de adsorção.

Independentemente da força iônica do meio, a enolase adsorve rapidamente na superfície do silício, como demonstrado pela elipsometria. As imagens de AFM confirmam este resultado, pois após 2 minutos de adsorção o valor da rugosidade (rms) da superfície do silício aumenta de 0,10 nm para 0,70 nm em força iônica baixa e 0,42 nm em força iônica alta (imagens não mostradas).

Figura 19. Curva de cinética de adsorção *in situ* e imagens de AFM *in situ* da enolase ($C_{\text{enolase}} = 0,01\text{g/L}$ em $\text{NaCl } 0,001\text{mol/L}$) em silício. As imagens de AFM correspondem às etapas (1), (2) e (3) mostradas na curva da cinética. A rugosidade do filme de enolase é mostrada como valores de média quadrática (rms). Áreas de varredura = $5 \times 5 \mu\text{m}$, escala em Z de 7 nm (etapas 1 e 2) e 10 nm (etapa 3).

Figura 20. Curva de cinética de adsorção *in situ* e imagens de AFM *in situ* da enolase ($C_{\text{enolase}} = 0,01\text{g/L}$ em NaCl $0,1\text{mol/L}$) em silício. As imagens de AFM correspondem às etapas (1), (2) e (3) mostradas na curva da cinética. A rugosidade do filme de enolase é mostrada como valores de média quadrática (rms). Áreas de varredura = $5 \times 5 \mu\text{m}$, escala em Z de 7 nm (etapas 1 e 2) e 10 nm (etapa 3).

Em força iônica baixa (Figura 19), o filme de enolase adsorvido se torna menos rugoso após 3 horas de adsorção, como indica a redução do valor de rms de 0,75 nm (Figura 19-1) para 0,45 nm (Figura 19-2). Este tempo de adsorção corresponde à etapa 2 da cinética de adsorção caracterizada pela saturação da primeira camada de enolase adsorvida. Em força iônica elevada, a saturação da primeira camada adsorvida ocorre em apenas 1 hora de adsorção. A curva de cinética mostra que 1 hora de adsorção corresponde ao término da segunda etapa do processo de adsorção (saturação da primeira camada) e início da terceira onde ocorre a

adsorção de novas moléculas sobre as primeiras moléculas adsorvidas, elevando assim a rugosidade da superfície.

As imagens de AFM correspondentes à terceira etapa do processo de adsorção mostram um aumento da rugosidade do filme de enolase tanto em baixa (Figura 19-3) quanto em força iônica alta (Figura 20-3), suportando a idéia de formação de multicamadas sugerida pelas curvas de cinética. Embora as medidas elipsométricas tenham mostrado que a força iônica não exerce efeito nos valores de Γ obtidos após tempos longos de adsorção (18h), as imagens de AFM mostram que agregados de enolase podem adotar diferentes tamanhos e formas de acordo com a força iônica empregada. Este resultado demonstra a importância de se combinar duas ou mais técnicas no estudo do comportamento de adsorção protéica. A elipsometria fornece valores médios de espessura a partir de uma área de 3 mm², enquanto que imagens de AFM correspondem a áreas de 25 μm^2 . Em força iônica baixa a enolase forma fibrilas (Figura 19), enquanto que em força iônica alta os agregados formados se apresentam na forma esférica (Figura 20).

Um comportamento similar foi observado no caso do contato do silício não modificado com soluções concentradas de enolase (0,5 g/L) (Figura 21). A Tabela 2 mostra os valores de Γ e a rugosidade dos filmes de enolase correspondentes às superfícies mostradas na Figura 21. As fibrilas não foram observadas nas superfícies obtidas em força iônica elevada. O baixo contraste entre as fitas e o filme de enolase nas imagens AFM de fase (não mostradas) confirma que estes agregados são compostos por moléculas de enolase. A enolase é solúvel em água até concentrações de 200 mg/mL (Chin e col., 1981). Portanto, a presença de tais agregados já em solução antes de sua adsorção na superfície não é esperada. Como discutido anteriormente, medidas de SAXS não indicaram a presença de grandes agregados de enolase em solução com concentração de 6 g/L em NaCl 0,001 mol/L. O fator que desencadeia este processo ainda é

desconhecido. Acredita-se que estes agregados sejam induzidos pela superfície do filme de enolase e seus tamanho e forma podem ser resultado do balanço entre as contribuições da força iônica e características da superfície. Como a enolase utilizada apresenta um grau de pureza de aproximadamente 70%, não se pode descartar a possibilidade destas fibrilas serem resultantes da ação da força iônica nos contaminantes presentes na amostra.

Enolase (0,5 g/L em solução de NaCl 0,001 mol/L

Enolase (0,5 g/L em solução de NaCl 0,1 mol/L

Figura 21. Imagens de AFM em líquido das superfícies de silício após contato com solução de enolase (0,5 g/L) em NaCl. Área varrida = $5 \times 5 \mu\text{m}$, escala em Z = 7 nm (tempos de adsorção de 2 e 15 minutos) e 15 nm (tempo de adsorção de 20 horas).

Tabela 3. Valores de Γ e rms obtidas para superfícies de silício após contato com enolase (0,5 g/L) em solução de NaCl 0,001 and 0,1mol/L em diferentes tempos de adsorção. Os dados correspondem às imagens da Figura 21.

Tempo de adsorção	NaCl 0,001 mol/L		NaCl 0,1 mol/L	
	Γ (mg/m ²)	rms (nm)	Γ (mg/m ²)	rms (nm)
2 min.	1,1	0,62	1,8	0,52
15 min.	1,6	0,89	3,2	0,96
1 h	2,9	0,85	4,5	0,90
20 h	4,6	1,7	6,5	1,1

Imagens de AFM em líquido da superfície de PS recoberto com enolase após contato com solução de enolase (0,01 g/L em NaCl 0,001 mol/L) estão ilustradas na Figura 22. A Figura 22a mostra a imagem de AFM da superfície de PS puro. As Figura 22b-d mostram a superfície de PS após diferentes tempos de contato com a solução de enolase. Para cada tempo de adsorção foi utilizado um novo filme de PS. A rugosidade (expressa em rms) da superfície de PS aumenta com o tempo de adsorção, o que pode ser atribuído à presença de enolase adsorvida na superfície do filme de PS. No entanto, a visualização das moléculas adsorvidas é dificultada devido à própria rugosidade inicial do filme.

A Figura 23 mostra a imagem da superfície do filme de PS após contato com solução de enolase a 0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L. Devido à alta concentração de enolase e o longo tempo de adsorção, as moléculas adsorvidas sobre o filme podem ser facilmente observadas. A rugosidade do filme aumentou de 0,45 nm para 0,75 nm após adsorção da enolase. Diferentemente do silício, o filme de PS não apresentou agregados após contato com a solução de enolase em força iônica baixa (Figura 21). Isto reforça a idéia de que os agregados formados na superfície são influenciados por um balanço entre a natureza da superfície do substrato e força iônica do meio.

Figura 22. Imagens AFM em líquido das superfícies de PS puro (a) e após contato com solução de enolase ($c = 0,01\text{g/L}$ em $\text{NaCl } 0,001\text{mol/L}$) em diferentes tempos de contato: b) 2,5 minutos, c) 15 minutos, d) 3 horas. Todas as imagens foram obtidas após lavagem com água bidestilada para retirada de moléculas não adsorvidas. Área de varredura de $25\mu\text{m}^2$, escala em Z de 5nm.

Figura 23. Imagem AFM em líquido da superfície de enolase ($c = 0,50\text{g/L}$ em $\text{NaCl } 0,001\text{mol/L}$) adsorvida sobre PS após 20 horas de contato. Imagem obtida após lavagem com solução de $\text{NaCl } 0,001\text{mol/L}$ para remoção de moléculas não adsorvidas. Área de varredura de $25\mu\text{m}^2$, escala em Z de 10 nm.

4.1.3.2 AFM contato intermitente em ar

As imagens de AFM da superfície de silício antes e após o contato de enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) obtidas em ar estão ilustradas na Figura 24. A topografia das superfícies apresentam características similares àquelas das imagens obtidas *in situ* (Figura 21). A rugosidade das superfícies da Figura 24 aumenta com o tempo de adsorção, mas de forma mais pronunciada do que observado nas superfícies da Figura 21. Isto evidencia que o processo de secagem com N₂ provavelmente altera as características da superfície adsorvida com enolase.

A Figura 25 traz imagens de AFM dos filmes de PS antes e após contato com solução de NaCl 0,001 mol/L na ausência e na presença de enolase (0,01 g/L) e após diferentes tempos de contato. A rugosidade inicial do filme de PS (rms = 0,29 nm) aumentou após o contato com a solução de sal na ausência de enolase. Este aumento foi proporcional ao tempo de contato: rms = 0,34 nm após 1 hora e rms = 0,82 nm após 24 horas de contato. Quando o filme foi exposto à solução de enolase (0,01 g/L em NaCl 0,001 mol/L) por 24 h, a rugosidade apresentou uma variação muito menor: de 0,29 nm para 0,48 nm de contato com solução de enolase. O filme de enolase formado reduz o efeito da água na variação da rugosidade do filme de PS. A enolase possui mais afinidade pela superfície do silício do que pelo filme de PS (Figura 12). Então, a enolase provavelmente preenche rapidamente a superfície do silício exposta pelos furos presentes no filme de PS, reduzindo assim a variação da rugosidade deste após exposição à solução de NaCl.

Figura 24. Imagens de AFM em ar das superfícies secas de silício recobertas com enolase adsorvida após contato com solução de enolase ($c = 0,5$ g/L em NaCl $0,001$ mol/L): (a) 5 minutos, (b) 1 hora, (c) 2 horas, (d) ampliação da região homogênea vista na imagem (c), (e) três horas, (f) 20 horas, (g) ampliação da região homogênea vista na imagem (f). Cinética de adsorção medida a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (Almeida e col., 2002).

Figura 25. Imagem de AFM em ar das superfícies de PS puro e recoberto com enolase ($c = 0,01$ g/L em NaCl $0,001$ mol/L). PS seco corresponde ao filme que não esteve em contato com a solução de NaCl. As imagens foram obtidas após lavagem com água destilada e secagem com jato de nitrogênio. Área de varredura de $25 \mu\text{m}^2$, escala em Z de 10 nm.

As imagens de AFM ilustradas na Figura 26 correspondem às ampliações (de área de $4 \mu\text{m}^2$) de regiões escolhidas nas superfícies ilustradas na Figura 25. O filme de PS original apresenta pequenos furos ao longo de sua superfície. Estas imperfeições são atribuídas à água presente em abundância no próprio ambiente e em menor quantidade no tolueno. O contato preferencial entre água e silício impede o recobrimento total do substrato pela solução hidrofóbica do polímero. Quando o filme entra em contato com a solução de NaCl, a água penetra por estes furos, formando uma camada de água no interstício formado entre o silício hidrofílico e o filme hidrofóbico de PS (Castro et al, 2004). A rugosidade é aumentada

quando esta água intersticial é removida na secagem do filme com jato de nitrogênio. Observa-se que com a saída da água os furos no filme têm o seu diâmetro aumentado, ocorrendo também a formação de rugas na superfície do filme. Quanto maior o tempo de contato, maior a quantidade de água que penetra no interstício substrato-filme e maior é a alteração causada na superfície do filme.

Figura 26. Imagem de AFM em ar das superfícies de PS original (seco), PS após 24 h de contato com solução aquosa de NaCl 0,001 mol/L e PS recoberto com enolase (0,01 g/L em NaCl 0,001 mol/L, 24 h de adsorção). As imagens foram obtidas após lavagem com água destilada e secagem com jato de nitrogênio. Área de varredura de 4 μm^2 , escala em Z de 10 nm.

Quando filmes hidrofóbicos como PS são usados para imobilização de biomoléculas, deve-se estar atento na distinção entre defeitos do filme e moléculas de adsorbato em imagens obtidas em experimentos *ex situ*. As imagens das superfícies de filme de PS (~ 50 nm de espessura) após exposição à solução de NaCl 0,001 mol/L (Figura 27a) e à solução de enolase na concentração de 0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L (Figura 27b) são muito semelhantes, o que torna a distinção entre defeitos do filme e moléculas adsorvidas de enolase uma tarefa difícil. Isto reforça a importância da combinação de duas ou mais técnicas no estudo da adsorção. Se somente AFM fosse utilizada neste estudo, alterações topográficas e

moléculas de enolase adsorvidas em PS poderiam ser facilmente confundidas. Técnicas complementares como XPS, fluorescência, elipsometria ou espectroscopia de reflectância devem ser utilizadas simultaneamente em estudos como este (Castro e col., 2004).

Figura 27. Imagens topográficas (contato intermitente em ar) de PS: (a) após contato com solução de NaCl 0,001 mol/L durante 1 hora, lavagem com água destilada e secagem, (b) após 1 hora de contato com solução de enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L), lavagem com água destilada e secagem. Área varrida = $4 \mu\text{m}^2$ e altura em Z = 10 nm (Castro e col., 2004).

4.1.4 Medidas de ângulo de contato

Os substratos deixados em contato com solução de enolase (0,01 g/L) em NaCl 0,001 mol/L durante 16 horas, foram secos com jato de nitrogênio e em seguida foram medidos os ângulos de contato correspondentes. A Tabela 4 apresenta os ângulos de avanço (θ_A) e de recesso (θ_R), respectivamente, das superfícies de silício não modificado, silício modificado com APS ou TMCS, ou recoberto com filme de PS antes e após contato com a solução de enolase.

Os resultados da Tabela 4 mostram que as moléculas de enolase adquirem diferentes conformações dependendo da hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície do substrato. Os substratos hidrofílicos, silício não modificado e as superfícies amino-terminadas (APS) (Petri e col., 1999), se tornaram hidrofóbicos após adsorção da enolase, indicando que os segmentos hidrofóbicos da enzima estão voltados para o ar, enquanto os segmentos hidrofílicos podem estar interagindo com a superfície.

Superfícies originalmente hidrofóbicas, filme de PS (Siqueira-Petri e col., 1999) e silício silanizado com TMCS, se tornaram hidrofílicas após a adsorção da enolase. Neste caso, interações entre os segmentos hidrofóbicos da cadeia da enzima e a superfície do substrato levaram à exposição dos segmentos hidrofílicos da enolase para o ar. A orientação preferencial de um determinado tipo de segmento da cadeia da enolase para o ar em função da natureza da superfície do substrato leva provavelmente a uma minimização da energia livre do sistema.

Medidas cinéticas do ângulo de contato das superfícies de silício não modificado, modificado com APS e recoberto com PS após contato com enolase (0,01 g/L) em solução de NaCl 0,001 mol/L foram realizadas a fim de se avaliar possíveis mudanças conformacionais das moléculas adsorvidas em função do tempo de contato com a água. As medidas foram realizadas durante 1 hora em intervalos de 10 minutos.

Tabela 4. Ângulos de avanço e recesso de gotas de água depositadas nas superfícies dos diferentes substratos antes e após a adsorção de enolase a $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$. A histerese nas medidas do ângulo de contato ($\Delta\theta$) foi calculada a partir da diferença entre os valores de (θ_A) e (θ_R). As amostras foram obtidas após 16 horas de adsorção a $C_{\text{enolase}} = 0,01 \text{ g/L}$ em NaCl $0,001 \text{ mol/L}$.

Substrato	$\theta_A (^\circ)$	$\theta_R (^\circ)$	$\Delta\theta (^\circ)$
Si/SiO ₂	6 ± 1	-	-
APS	24 ± 1	19 ± 2	5
TMCS	73 ± 2	57 ± 2	18
PS	88 ± 1	79 ± 2	9
Si/SiO ₂ /enolase	72 ± 1	39 ± 1	33
APS/enolase	70 ± 1	32 ± 1	38
TMCS/enolase	56 ± 3	31 ± 2	25
PS/enolase	41 ± 2	27 ± 1	14

A Figura 28 mostra os valores dos ângulos de avanço em função do tempo de contato com a gota de água. O tempo inicial corresponde à medida realizada logo após a deposição da gota. Durante os primeiros 20 minutos, o ângulo de contato apresentou uma variação de cerca de 10 graus, indicando possíveis mudanças conformacionais nas cadeias da enolase adsorvida após contato com a água. De acordo com Lyklema e Norde (1996), as proteínas podem ser classificadas como duras e moles. Uma proteína é considerada dura quando mantém sua estrutura muito próxima daquela no estado dissolvido mesmo após adsorção. Por outro lado, a proteína é considerada mole quando adota uma conformação diferente após adsorção. A enolase pode então ser considerada uma proteína mole, uma vez que as variações do ângulo de contato em função do tempo e da natureza física da amostra evidenciam mudanças conformacionais na cadeia desta. Tais mudanças conformacionais podem ser um fator decisivo na manutenção da atividade da enzima após sua adsorção na superfície de um substrato sólido.

Figura 28. Ângulos de contato medidos por meio da deposição de uma microgota de água na superfície dos substratos recobertos com enolase adsorvida: (■) silício não modificado, (○) silício silanizado com APS e (▲) filme de PS. Todas as amostras foram obtidas após 16 horas de adsorção a $C_{\text{enolase}} = 0,01$ g/L em solução de NaCl 0,001 mol/L. As medidas foram realizadas a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. As linhas servem apenas de guia para os olhos. As barras de erro correspondem ao desvio padrão obtido dos valores médios de triplicatas (Almeida e col., 2002).

4.1.5 Medidas de XPS

Amostras de silício e PS recobertas com enolase foram submetidas à análise de XPS com o objetivo de se verificar diferenças na composição química do filme de enolase adsorvido nestes substratos e comparar os resultados com aqueles obtidos por meio de elipsometria.

Os espectros referentes à superfície de silício antes e após contato com a solução de enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em diferentes tempos de adsorção estão ilustrados na Figura 29. A Tabela 5 resume os resultados obtidos por XPS. Os picos referentes a Si e SiO_x a 99 e 103 eV (não mostrados) denotam que ainda é possível detectar o substrato mesmo

após 21h de contato com a solução de enolase. O ângulo (*take-off*) utilizado na obtenção dos espectros de XPS permite uma penetração de até 5 nm de espessura na superfície da amostra. Segundo dados elipsométricos, a espessura média do filme de enolase sobre silício é de aproximadamente $\Gamma = 5,0 \pm 0,5 \text{ mg/m}^2$ (Figura 13). A fina espessura do filme permitiu que o substrato fosse ainda detectado pela análise de XPS.

A superfície do silício não modificado contém O e C provenientes provavelmente de contaminantes. Observa-se uma concentração significativa de N mesmo na amostra de silício puro. A posição do pico N_{1s} indica que o nitrogênio está na forma reduzida, provavelmente como nitrito. As concentrações de C e N aumentam significativamente entre 5 minutos e 24 horas, enquanto que as concentrações de Si e O diminuem devido ao recobrimento do substrato pelo adsorbato. Os dados indicam que, assim como visto pela elipsometria, ocorre muita adsorção nos 5 primeiros minutos de contato com a solução de enolase. A forma do pico C_{1s} não varia apreciavelmente com o tempo de adsorção. Por outro lado, a fração molar do C é um pouco mais alta após o tempo de adsorção de 5 minutos em relação ao silício puro. Além disso, a forma do pico C_{1s} e a razão N/C (Tabela 5) na superfície do silício recoberto com enolase são típicos de proteína. No caso do silício puro, a forma do pico C_{1s} é característica de contaminação casual.

Figura 29. Espectro XPS das superfícies (em duplicata) de Si não modificado e após contato com solução de enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em diferentes tempos de contato: 5 min., 1 h e 24 h.

Tabela 5. Composição elemental (fração molar em %, excluindo H) das superfícies de silício (em duplicata), antes e após adsorção de enolase, determinada por XPS.

%	Amostra			
	Silício	Silício/enolase ($t_{\text{adsorção}} = 5 \text{ min.}$)	Silício/enolase ($t_{\text{adsorção}} = 1 \text{ h}$)	Silício/enolase ($t_{\text{adsorção}} = 24 \text{ h}$)
%C	18 ± 0,2	24 ± 1	32 ± 2	46 ± 3
%O	30 ± 0,4	27	23 ± 1	20 ± 0,2
%N	0,91	3,9 ± 0,1	5,3 ± 0,3	6,7 ± 0,2
%Si	51 ± 0,1	45 ± 1	39 ± 1	27 ±
%Na	0,24	0,090	0,031	< 0,03
O/C	1,7	1,1 ± 0,05	0,74 ± 0,1	0,44 ± 0,04
N/C	0,052	0,16	0,17	0,14

Os espectros referentes à superfície de PS antes e após contato com a solução de enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em diferentes tempos de adsorção estão ilustrados na Figura 30. A Tabela 6 resume os resultados obtidos por XPS. O pico C_{1s} do PS mostra o componente C ($\underline{C}$ -C-H) a 284,8 eV e a presença de contaminantes no Si ainda é notada. As imagens do filme de PS obtidas por AFM no ar (Figura 25), mostram que a superfície do filme não é homogênea pois apresenta pequenos furos que acabam expondo parte do substrato. Estes furos devem ser decorrentes da competição entre a solução polimérica hidrofóbica e a água (proveniente principalmente do ambiente) adsorvida na superfície hidrofílica do substrato (Castro et al, 2004). Quando o filme é recoberto por enolase, não se observa o pico referente a SiO_x , indicando que a superfície de silício está totalmente recoberta. Como mostrado pelas curvas de cinética obtidas por elipsometria (Figura 12), a enolase adsorve preferencialmente na superfície do silício e a adsorção nesta superfície ocorre de maneira mais rápida do que na superfície do filme de PS. Assim, a enolase recobre primeiramente a superfície do silício exposta pelas falhas presentes no filme de PS. Após um tempo de adsorção mais longo, tem-se então uma superfície composta somente de enolase e PS.

O PS puro contém C e pouco O. A concentração de N aumenta pouco entre os tempos de adsorção da enolase de 5 minutos a 24 horas, evidenciando que a adsorção nesta superfície também ocorre rapidamente. O pico referente ao elemento C_{1s} (C-H) presente abundantemente na superfície do filme de PS decai provavelmente devido ao recobrimento deste pela enzima. Após a adsorção da enolase, duas contribuições adicionais ainda podem ser observadas: um pico próximo a 288 eV proveniente do $\underline{N}$ - $\underline{C}$ =O e outro próximo a 286,2 eV devido a C- $\underline{C}$ -N. Ambos são típicos de ligação peptídica. Novamente, não há uma variação expressiva destes em função do tempo de adsorção. O pico referente ao carbono ligado à hidroxila

presente na superfície do filme de PS puro pode ser proveniente da umidade do ambiente. Já no caso do filme de PS recoberto com enolase, vê-se que há uma maior quantidade deste elemento, que provavelmente é proveniente do filme de enolase. Este resultado pode explicar o aumento da hidrofilicidade do filme de PS após adsorção de enolase, como já demonstrado através de medidas de ângulo de contato (Figura 28).

Figura 30. Espectro XPS das superfícies (em duplicata) de PS e PS recoberto com enolase após contato com solução da enzima (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em diferentes tempos de contato: 5 min., 1 h e 24 h.

Tabela 6. Composição elementar (fração molar em %, excluindo H) das superfícies de PS (em duplicata), antes e após adsorção de enolase, determinada por XPS.

%	Amostra			
	PS	PS/enolase (t _{adsorção} = 5 min.)	PS/enolase (t _{adsorção} = 1 h)	PS/enolase (t _{adsorção} = 24 h)
%C	98	84 ± 1	84 ± 1	83 ± 1
%O	1,5 ± 0,3	8,7 ± 0,4	8,9 ± 0,6	9,7 ± 0,1
%N	-	4,1 ± 0,4	4,6 ± 0,1	5,2 ± 0,1
%Si	0,50 ± 0,04	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,8	1,9 ± 0,6
O/C	0,021	0,10	0,11 ± 0,01	0,12
N/C	-	0,051	0,051	0,061

4.1.6 Modelos de adsorção

Muitos modelos foram desenvolvidos para descrever a dinâmica de adsorção em multicamadas (van Tassel & Viot, 1997; Talbot e col., 2000; Bartelt, & 1994; Bartelt & Privman, 1991). Todos estes se baseiam no modelo de adsorção seqüencial aleatória (RSA), o qual considera que as partículas adsorvem irreversivelmente formando uma monocamada. Devido ao volume excluído por cada partícula adsorvida, o grau de cobertura superficial varia dentro da faixa de 0,38 a 0,75, dependendo das dimensões geométricas escolhidas. Uma característica importante deste modelo é sua memória infinita: a primeira partícula que adsorve na superfície influenciará a geometria de todas aquelas que adsorverão posteriormente. O modelo de adsorção seqüencial cooperativa (CSA), uma das extensões do RSA, considera a deposição de partículas formando multicamadas ou ilhas de aglomerados formados por partículas adsorvidas na superfície do substrato

(Evans, 1993). Este modelo assume que a adsorção é favorecida pelo efeito de cooperativismo entre as moléculas do adsorbato.

Para verificar se o comportamento de adsorção da enolase poderia ser descrito pelos modelos RSA ou CSA, foram realizados experimentos de dessorção na cela elipsométrica, trocando-se a solução de enzima por solvente puro (solução de NaCl). Após 16 h de acompanhamento, não se observaram mudanças significativas nos valores de Δ e Ψ , indicando que não houve dessorção das moléculas adsorvidas. As moléculas se adsorvem no substrato com elevado grau de empacotamento, como observado por meio das imagens topográficas das superfícies dos substratos recobertos com enolase obtidas por microscopia de força atômica (seção 1.1.4). A adsorção irreversível e o elevado grau de empacotamento das moléculas adsorvidas são previstos pelos modelos RSA e CSA.

O modelo RSA estima um grau de cobertura máximo de 55% da superfície do substrato recoberto por partículas esféricas. Uma estimativa do grau de de cobertura da superfície, Θ , em função do tempo foi realizada considerando-se os valores de Γ da curva de cinética de adsorção ilustrada na Figura 31. A área esférica de uma molécula de enolase foi estimada em $2,83 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$, considerando o raio de giro da molécula igual a 3 nm. A área da lâmina de silício foi de 1 cm^2 . O número de moléculas adsorvidas, N , foi calculado a partir da quantidade adsorvida e da massa molar da enolase (46.700 g/mol).

$$\Theta = \frac{NA_{\text{molécula}}}{\text{área}_{\text{substrato}}} \quad (11)$$

Logo após 20 s de adsorção, a superfície já apresenta um grau de cobertura de 58%, o qual está próximo ao limite estipulado pelo modelo RSA ($\Theta = 0,55$). No intervalo de 1 a 2 minutos de adsorção, a superfície está totalmente recoberta pelas moléculas de enolase ($\Theta = 1$). Em tempos de adsorção mais longos Θ ultrapassa este valor, o que pode ser atribuído a um valor superestimado do raio de giro ou a diferentes conformações adotadas pela molécula durante a formação da primeira camada adsorvida (segundo estágio do processo de adsorção).

Figura 31. Valores do grau de cobertura Θ em função do tempo durante os 5 primeiros minutos de adsorção obtidos a partir dos dados da curva cinética de adsorção da enolase (0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L) em silício ilustrada na Figura 13.

A Figura 32 traz imagens das superfícies de silício após 5 minutos (Figura 32a e 32b) e 16 horas (Figura 32c e 32d) de contato com solução de enolase a 0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L. As imagens confirmam que a enolase adsorve rapidamente sobre o silício. Apesar do grande intervalo de tempo de adsorção, as duas superfícies apresentam características muito semelhantes. Segundo a curva da Figura 31, a superfície do silício está

totalmente recoberta após um curto intervalo de tempo (próximo a dois minutos), tal como pode ser observado nas Figuras 32a e 32b. A espessura da camada adsorvida após 16 horas de contato é de aproximadamente 5,3 nm, o que corresponderia aproximadamente ao dobro do R_g obtido por medidas de SAXS (Figura 14), indicando a formação de uma segunda camada adsorvida. As imagens de AFM das Figuras 32c e 32d mostram um maior empacotamento das moléculas adsorvidas, o qual é evidenciado pela rugosidade (rms) da superfície. A altura média das moléculas do adsorbato nos primeiros cinco minutos de adsorção é de $1,8 \pm 0,3$ nm, o que pode indicar que as moléculas adsorvidas na primeira camada estão denaturadas. Elevando-se o tempo para 16 horas, esta altura média aumentou para $6,2 \pm 0,5$ nm, o que pode indicar que mesmo após longos tempos de contato, a superfície não atinge 100% de recobrimento.

Todas as curvas de cinética de adsorção da enolase apresentam características semelhantes: um rápido aumento linear de Γ em tempos curtos de adsorção, um patamar de adsorção que indica a formação da primeira camada adsorvida e, em tempos de adsorção mais longos, um novo aumento assintótico de Γ em função do tempo de adsorção. Este comportamento assintótico foi previsto por modelos teóricos descritos anteriormente e pode ser atribuído ao efeito de cooperativismo entre moléculas protéicas. Portanto, o modelo CSA parece ser o modelo mais adequado para descrever o comportamento de adsorção da enolase em substratos planos sólidos em tempos longos de adsorção.

Figura 32. Imagens AFM obtidas em ar da superfície de silício após 5 minutos e 16 horas de contato com solução de enolase a 0,5 g/L em NaCl 0,001 mol/L. Escala em Z = 10 nm (a, b e d) e 20 nm (c).

4.2 - SUBSTRATOS ESFÉRICOS

4.2.1 Caracterização das esferas de vidro modificadas com TMCS por espectroscopia fotoacústica no infravermelho

Segundo Tripp & Hair (1991), a reação de trimetilclorosilano com sílica ocorre segundo o esquema ilustrado na Figura 33.

Figura 33. Reação de silanização das esferas de vidro com TMCS. O subscrito *s* se refere à superfície.

Ainda segundo Tripp & Hair (1995), na reação entre metilsilanóis e superfícies hidratadas de sílica (a baixa temperatura e em solução), a reação ocorre em duas etapas, conforme esquematizado na Figura 34.

Figura 34. Etapas possíveis da reação de silanização das superfícies hidratadas de sílica com TMCS (Tripp & Hair, 1995).

Na primeira etapa, o clorosilano adsorvido é hidrolizado a alquilsilanol pela água que está pré-adsorvida nas superfícies ou dispersa no solvente. Na segunda etapa, o alquilsilanol adsorvido então condensa com os grupos Si-OH da superfície para formar uma ligação Si-O-Si com a superfície. Em ambas as etapas, a quantidade de água é um fator determinante: água insuficiente leva a formação de uma monocamada incompleta enquanto que uma camada espessa de água produz uma camada de silano polimerizado sobre a camada de água. Neste último caso pode haver dessorção e a camada de silano pode flutuar no solvente (Tripp & Hair, 1995).

Os espectros de infravermelho fotoacústico das esferas de vidro não modificadas e silanizadas com TMCS estão ilustrados na Figura 35. As bandas que evidenciam a silanização da superfície da esfera de vidro estão indicadas por setas. A tentativa de atribuição destas bandas está descrita na Tabela 7. Os dados obtidos são semelhantes àqueles apresentados por Tripp & Hair (1991 e 1995).

Tabela 7. Tentativa de atribuição das bandas de absorção do espectro fotoacústico das esferas de vidro modificadas com TMCS.

Número de onda (cm^{-1})	Vibração
3400	O-H, água fisicamente adsorvida
2966, 2921	Estiramentos CH_3 assimétrico e simétrico, respectivamente
1428	Deformação CH_3
1060	Si-O-Si
863, 763	Rock CH_3
710	Estiramento Si-C
622	Si-Cl
463	Si-O-Si

Figura 35. Espectros fotoacústicos das esferas de vidro não modificadas (preto) e modificada com TMCS (vermelho). Os espectros foram apresentados em diferentes faixas de número de onda apenas para facilitar a visualização das bandas de interesse. Em: (a) 4000 a 1400 cm^{-1} e em (b) de 1400 a 400 cm^{-1} .

4.2.2 Cinética de adsorção – leitura da absorbância em $\lambda = 280\text{nm}$

A leitura da absorbância da enzima livre em solução em $\lambda = 280\text{ nm}$ é um método rápido e conveniente, pois não há a necessidade de reagentes adicionais ou tempo de incubação, nem o preparo prévio de soluções de proteína padrão. Além disso, não há consumo de proteína. A relação entre absorbância e concentração de proteína é linear. A desvantagem do método é que qualquer componente não protéico da solução que absorve luz ultravioleta pode interferir na medida de absorbância.

Foram utilizadas esferas de vidro de diâmetro médio de aproximadamente 0,5 mm. A massa de esferas equivalente a uma área superficial total de 1 cm^2 (a mesma das placas de Si/SiO₂) foi calculada considerando-se a densidade do vidro igual a $2,6\text{ g/cm}^3$ (Weast, 1983). A massa calculada foi de 0,0216 g ou 127 esferas, aproximadamente. As esferas foram colocadas em *ependorfs* contendo 1 mL de solução de enolase na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 g/L. Foram utilizadas amostras em duplicata para cada concentração de enolase estudada.

As Tabelas 8 e 9 mostram a cinética de adsorção da enolase em esferas de vidro não modificadas (superfície hidrofílica) em força iônica baixa e alta, respectivamente. A quantidade de enolase adsorvida Γ foi calculada através da eq.(4) (pág. 24). Embora para algumas medidas a reprodutibilidade tenha sido baixa, acarretando em alguns desvios padrões elevados, pode-se dizer que em força iônica baixa (Tabela 8) observa-se a tendência de aumento de Γ com o tempo e com a concentração de enolase. Com exceção do experimento com concentração de enolase de 1,0 g/L e 24 h de adsorção, todos os outros resultados mostram que a alta força iônica favorece a adsorção sobre esferas de vidro (Tabela 9).

Tabela 8. Adsorção da enolase em esferas de vidro. Quantidade média de enolase adsorvida (Γ) após contato com solução de enolase dissolvida em NaCl 0,001mol/L em diferentes concentrações e tempos de adsorção. Leitura da absorbância a $\lambda = 280\text{ nm}$ e $T = 23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[enolase] (mg/mL)	Esferas (g)	Área (m ²)	Γ (mg/m ²)				
			15 min.	30 min.	1 h	2 h	24 h
1,0	0,0206	9,51.10 ⁻⁵	36	81	274	291	864 ± 420
	0,0225	1,04.10 ⁻⁴					
0,50	0,0207	9,55.10 ⁻⁵	49 ± 10	54 ± 23	156	180	297 ± 126
	0,0210	9,69.10 ⁻⁵					
0,25	0,0271	1,25.10 ⁻⁴	56 ± 38	40 ± 0,1	35	-	87 ± 28
	0,0270	1,24.10 ⁻⁴					
0,13	0,0228	1,05.10 ⁻⁴	9 ± 1	-	43	-	16
	0,0224	1,03.10 ⁻⁴					

Tabela 9. Adsorção da enolase em esferas de vidro. Quantidade média de enolase adsorvida (Γ) após contato com solução de enolase dissolvida em NaCl 0,1mol/L em diferentes concentrações e tempos de adsorção. Leitura da absorbância a $\lambda = 280\text{ nm}$ e $T = 23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[enolase] (mg/mL)	Esferas (g)	Área (m ²)	Γ (mg/m ²)				
			15 min.	30 min.	1 h	2 h	24 h
1,0	0,0240	1,11.10 ⁻⁴	432 ± 126	353 ± 70	514 ± 270	559 ± 106	424 ± 74
	0,0242	1,12.10 ⁻⁴					
0,50	0,0215	9,92.10 ⁻⁵	436 ± 17	159 ± 38	436 ± 128	541 ± 301	419 ± 250
	0,0211	9,74.10 ⁻⁵					
0,25	0,0214	9,88.10 ⁻⁵	259 ± 80	510 ± 10	269 ± 191	201 ± 18	-
	0,0211	9,74.10 ⁻⁵					
0,13	0,0209	9,65.10 ⁻⁵	51	215 ± 10	-	-	-

4.2.3 Cinética de adsorção – método de Bradford ($\lambda = 595$ nm)

De modo a vencer as limitações do espectrofotômetro e de possíveis interferências causadas por outras espécies absorventes em $\lambda = 280$ nm, a determinação da quantidade de enzima livre em solução passou a ser monitorada a $\lambda = 595$ nm pelo método de Bradford (1976). Neste método a concentração da enzima livre em solução é determinada por meio da reação desta com a solução resultante da dissolução do corante Comassie Blue G-250 em etanol e ácido fosfórico (reagente de Bradford). A ligação do corante à proteína causa um deslocamento no máximo de absorção do corante de 465 nm (forma catiônica, coloração vermelha) para 595 nm (forma aniônica, coloração azul), o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente (Bradford, 1976). O reagente de Bradford se liga a resíduos específicos da proteína como a arginina, o triptofano, a histidina e a fenilalanina.

O gráfico dos valores de absorbância inicial versus concentração da enolase dá origem à curva padrão, cujo ajuste gera um polinômio de segundo grau utilizado nos cálculos da concentração de enzima livre em solução após contato com as esferas de vidro. A Figura 36 mostra a curva padrão da enolase em força iônica baixa (Figura 36a) e alta (Figura 36b), além do polinômio gerado no ajuste dos dados. Observa-se que os perfis das duas curvas são diferentes, demonstrando que provavelmente a força iônica exerça alguma influência não só na enzima livre em solução, mas também no corante e até mesmo no complexo formado entre a enzima e o corante. Não se conhece na literatura nenhum trabalho que aborde a influência na força iônica no reagente de Bradford. A instabilidade do reagente de Bradford frente às ações da luz e da temperatura, o consumo de proteína e a necessidade de se realizar uma curva padrão a cada ensaio realizado são outras desvantagens que o método apresenta.

Figura 36. Curva padrão - enolase dissolvida em solução de NaCl: (a) 0,001mol/L e (b) 0,1mol/L. Leitura da absorbância da solução do complexo formado entre enolase e reagente de Bradford a 595nm após 1 minuto de reação. O ajuste da curva foi realizado segundo um polinômio de segundo grau.

As curvas de cinética de adsorção da enolase em esferas de vidro não modificadas (substrato hidrofílico) e modificadas com TMCS (substrato hidrofóbico) obtidas pelo método de Bradford estão ilustradas nas Figuras 37 e 38, respectivamente.

Nas Figuras 37a e 37b (adsorção em força iônica baixa e alta, respectivamente) observa-se que após 4h de adsorção Γ atinge um valor de saturação. Os valores médios de Γ aumentam com a concentração da enolase de maneira mais pronunciada em força iônica baixa. Esta tendência é oposta àquela observada pelo método de leitura da absorbância em $\lambda = 280$ nm e também contrária à observada para substratos planos hidrofílicos (Tabela 3, pág.53).

O sal presente no meio pode causar algum tipo de interferência no reagente de Bradford, uma vez que as curvas padrão obtidas em força iônica baixa e alta (Figuras 36a e 36b, respectivamente) apresentam diferentes características. Desconhece-se na literatura algum trabalho que já tenha abordado o tema. Não se pode afirmar qual dos dois métodos de leitura de absorbância (em 280 nm ou 595 nm) é o mais adequado. No entanto, em ambos o valor de Γ é muito superior àquele obtido por elipsometria (nas placas de silício, Γ atinge um valor máximo de aproximadamente $5 \pm 0,5$ mg/m² após 24 h de adsorção, como ilustra a Figura 13).

A adsorção da enolase sobre as esferas modificadas com TMCS (superfícies hidrofóbicas) (Figura 38) apresentou comportamento diferente daquele observado para a adsorção sobre esferas hidrofílicas. Em baixa força iônica há a formação de um patamar após 2h de adsorção, independente da concentração inicial da solução de enolase. Os valores aproximados de Γ no patamar de adsorção são 100 mg/m², 170 mg/m² e 370 mg/m² para as soluções de concentrações de 0,25 g/L, 0,10 g/L e 1,0 g/L, respectivamente. Após 24h de adsorção, há um grande aumento no valor médio de Γ , obtendo-se valores próximos aos obtidos para as esferas hidrofílicas (Figura 37).

Em alta força iônica (Figura 38b), os valores do patamar são atingidos após 1h de adsorção. Os valores médios de Γ no patamar aumentam com o aumento da concentração de enolase. Para concentrações de enolase menores que 0,5 g/L os valores de Γ obtidos em esferas hidrofílicas são semelhantes aos obtidos para as hidrofílicas. Para concentrações de enolase maiores que 0,5 g/L, a adsorção é mais pronunciada sobre as esferas hidrofóbicas.

Figura 37. Cinética de adsorção da enolase em esferas de vidro não modificadas: (a) força iônica baixa (NaCl 0,001 mol/L) e (b) força iônica alta (NaCl 0,1 mol/L). As esferas foram colocadas em contato com soluções de enolase de diferentes concentrações: 0,10 g/L (quadrado), 0,25 g/L (círculo), 0,50 g/L (triângulo), 0,75 g/L (triângulo invertido) e 1,0 g/L (losango).

Figura 38. Cinética de adsorção da enolase em esferas de vidro modificadas com TMCS: (a) força iônica baixa (NaCl 0,001 mol/L) e (b) força iônica alta (NaCl 0,1 mol/L). As esferas foram colocadas em contato com soluções de enolase em concentrações de 0,1 g/L a 1,0 g/L.

De modo geral, a força iônica não influencia a adsorção da enolase sobre substratos esféricos em sistemas diluídos ($C_{\text{enolase}} < 0,5 \text{ g/L}$) e em tempos longos de adsorção. Este mesmo comportamento foi observado na cinética de adsorção da enolase sobre substratos planos acompanhada por elipsometria (Figura 12). Por outro lado, a influência da força iônica parece ser muito mais pronunciada no processo de adsorção da enolase em sistemas mais concentrados ($C_{\text{enolase}} > 0,5 \text{ g/L}$) sobre substratos esféricos. A discrepância entre o comportamento de adsorção da enolase nas esferas e placas pode estar relacionada ao método de Bradford de determinação indireta da quantidade de material adsorvido. Pela metodologia utilizada para os substratos esféricos não se pôde observar três estágios característicos da cinética de adsorção obtida para substratos planos (Figura 12). Não se pode afirmar com certeza que estes não ocorram no caso da adsorção da enolase sobre substratos esféricos. Seria necessário diminuir o intervalo de tempo empregado entre as medidas da concentração de enzima livre para tornar possível a visualização de todas as etapas do processo de adsorção da enolase nos substratos esféricos.

4.2.4 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção da enolase em esferas de vidro não modificadas e modificadas com TMCS em força iônica baixa e alta obtidas pelo método de Bradford estão ilustradas na Figura 39. Observa-se que quanto maior a concentração da enolase em solução, maior a quantidade de enzima adsorvida na esfera de vidro. Tal comportamento pode ser atribuído ao efeito de cooperativismo, muito comum para biomoléculas (Almeida e col., 2002).

Figura 39. Isotherma de adsorção da enolase em esferas de vidro não modificadas (a) e silanizadas com TMCS (b). A quantidade adsorvida foi obtida após 24h de contato com a solução de enolase em NaCl 0,001 mol/L (triângulo invertido) e NaCl 0,1 mol/L (quadrado). Temperatura = 24 ± 2 °C. A linha tracejada serve apenas de guia para os olhos.

Observa-se também que a quantidade de material adsorvido (Γ) diminui quando a força iônica é elevada de 0,001 mol/L para 0,1 mol/L de NaCl. Este tipo de comportamento é característico de sistemas onde as interações entre substrato e adsorbato não são de natureza puramente eletrostática. Interações hidrofóbicas ou forças do tipo van der Waals

provavelmente contribuem para o processo de adsorção de enolase sobre as esferas de vidro.

4.2.5 Influência da forma do substrato no processo de adsorção da enolase

Com o objetivo de se avaliar a influência da forma geométrica do substrato no processo de adsorção da enolase, o método de Bradford também foi utilizado no monitoramento da quantidade de enzima adsorvida em placas de silício nas mesmas condições experimentais utilizadas nas esferas. As Tabelas 10 e 11 mostram os valores de Γ obtidos após 20 horas de adsorção da enolase em placas de silício e esferas de vidro não modificadas e modificadas com TMCS, respectivamente. Novamente, observa-se que pelo método de Bradford, o aumento da força iônica levou à diminuição do valor médio de Γ , independentemente do caráter da esfera.

A Tabela 10 mostra que a adsorção sobre substratos planos hidrofílicos é em geral maior do que sobre as esferas hidrofílicas (Figura 39a). Já a Tabela 11 mostra um comportamento diferenciado para substratos hidrofóbicos. A adsorção sobre substratos planares somente é mais favorecida que aquela sobre os esféricos (Figura 39b) quando a força iônica é alta.

Tabela 10. Quantidade de enolase adsorvida nas superfícies de placas de silício e esferas de vidro não modificadas em diferentes forças iônicas. O acompanhamento foi realizado segundo o método de Bradford (595 nm) após 20 h de adsorção.

NaCl 0,001 mol/L		
[enolase] _{inicial} (g/L)	Esferas Γ (mg/m ²)	Placas Γ (mg/m ²)
0,10	538	-
0,25	218 $\pm$ 12	467 $\pm$ 16
0,5	544 $\pm$ 172	350 $\pm$ 40
1,00	2039 $\pm$ 39	1520 $\pm$ 143
NaCl 0,1 mol/L		
0,10	201 $\pm$ 53	545 $\pm$ 30
0,25	157	740 $\pm$ 24
0,5	364 $\pm$ 18	1860 $\pm$ 256
1,00	451 $\pm$ 25	3690 $\pm$ 206

Tabela 11. Quantidade de enolase adsorvida nas superfícies de placas de silício e esferas de vidro modificadas com TMCS em diferentes forças iônicas. O acompanhamento foi realizado segundo o método de Bradford (595 nm) após 20 h de adsorção.

NaCl 0,001 mol/L		
[enolase] _{inicial} (g/L)	Esferas Γ (mg/m ²)	Placas Γ (mg/m ²)
0,10	505 $\pm$ 112	380 $\pm$ 73
0,25	524 $\pm$ 107	254 $\pm$ 36
0,5	856 $\pm$ 241	557 $\pm$ 19
1,00	2290 $\pm$ 151	1020 $\pm$ 42
NaCl 0,1 mol/L		
0,10	86 $\pm$ 6	284 $\pm$ 111
0,25	298 $\pm$ 52	396 $\pm$ 4
0,5	258 $\pm$ 188	669 $\pm$ 70
1,00	545 $\pm$ 6	1360 $\pm$ 166

A área superficial foi fixada em 1cm^2 tanto para placas como para as esferas (considerando a área nominal das esferas). Entretanto, a área real das esferas é muito diferente da área nominal, o que acarreta em erros na determinação de Γ . As esferas de vidro não possuem forma nem tamanho homogêneos mesmo após passagem por peneiras ($0,5\ \mu\text{m}$), como pode ser observado na fotografia de uma pequena amostra na

Figura 40. Portanto, há uma grande incerteza nos valores da área superficial total das esferas utilizadas em cada ensaio. A Figura 41 ilustra uma imagem de AFM da topografia das esferas de vidro utilizadas neste estudo. Observa-se que a superfície das esferas é bastante irregular, com buracos e saliências. Esta alta rugosidade também altera a área superficial total das esferas, ou seja, a área real pode ser muito maior do que a nominal.

Figura 40. Fotografia das esferas de vidro usadas como substratos esféricos para adsorção da enolase. Aumento de 10.000 vezes, aproximadamente.

Figura 41. Imagem de AFM da superfície da esfera de vidro. Imagem obtida com o microscópio operando em contato intermitente (*tapping mode*) no ar.

***5 Medida da
atividade da
enolase adsorvida***

A enolase pertence a uma família de enzimas que compartilham o fato comum de catalisar reações iniciadas com a abstração de um próton α de um substrato ácido carboxílico (Poyner e col., 2001). A enolase catalisa a desidratação do 1,2-fosfo-D-glicerato (PGA) para formar 3-fosfoenolpiruvato (PEP) (Figura 42).

Figura 42. Reação de conversão do 2-PGA em PEP catalisada pela enolase.

A enolase é um dímero formado por duas cadeias idênticas e requer dois íons metálicos divalentes por monômero para converter o 2-PGA em PEP, sendo que os íons magnésio são aqueles que induzem a enolase a apresentar atividade máxima. A Figura 43 ilustra o mecanismo por etapas da reação de desidratação catalisada pela enolase (Liu e col., 2000). A primeira etapa envolve a abstração do próton do C2 do PGA (próton α) por uma base da enzima. A segunda etapa é a saída do grupo hidroxila do C3 (grupo hidroxila β) do intermediário enólico 2 com a ajuda de um ácido.

Figura 43. Mecanismo da reação de conversão do 2-PGA em PEP catalisada pela enolase (Liu e col., 2001).

A forma dimérica da enzima apresenta dois sítios para ligação dos íons Mg^{2+} responsáveis pela estabilidade conformacional do dímero, dois sítios para os íons que ativam a enzima, e outros dois para ligação do substrato. Cada sub-unidade do dímero de enolase possui um conjunto completo de cada tipo de sítio, ou seja, nenhuma parte do sítio ativo é

compartilhada entre as sub-unidades. Portanto, tanto a forma monomérica quanto a dimérica da enzima apresenta atividade (Chin e col, 1981).

O sítio ativo da enolase está localizado em uma cavidade na extremidade C-terminal, como ilustra a Figura 44a. A Figura 44b mostra alguns dos aminoácidos que fazem parte do sítio ativo. Acredita-se que His373 interage por meio de ligação hidrogênio com Glu168/Glu211/H₂O, o qual produz a remoção ou adição da hidroxila do C3 do substrato. His159, também localizada no sítio ativo, age como uma base catalítica na reação catalisada pela enolase.

Figura 44. (a) Estrutura cristalina da enolase: diagrama de fitas de uma sub-unidade do complexo enolase-Mg²⁺-2-PGA. As extremidades N-terminal e C-terminal são marcadas pela letra e a posição correspondentes ao aminoácido. Íons magnésio são representados por esferas e o 2-PGA por um modelo em esferas e bastões, ambos localizados na cavidade onde se encontra o sítio ativo da enzima. (b) Representação do sítio ativo do complexo enolase-Mg²⁺-2-PGA, com destaque para o íon magnésio e algumas das cadeias laterais que rodeiam os resíduos catalíticos (Chin e col., 1981).

A atividade da enolase adsorvida nos substratos foi acompanhada por espectrofotometria com $\lambda = 240$ nm, o qual corresponde ao comprimento de onda do PEP formado a partir da reação da enolase com 2-PGA (Ballantyne e col., 2000). A Figura 45 ilustra a curva padrão do PEP em tampão Tris-HCl (pH = 7,5) utilizada nos cálculos da concentração de PEP formado no meio.

Figura 45. Curva padrão do PEP em tampão tris-HCl (pH = 7,5).

5.1 - ATIVIDADE DA ENOLASE ADSORVIDA EM SUBSTRATOS ESFÉRICOS

As Figuras 46 e 47 mostram a formação do PEP na solução de substrato em função do tempo de contato com superfícies de esferas de vidro (hidrofílica) e esferas modificadas com TMCS (hidrofóbicas), respectivamente.

A atividade da enzima adsorvida nos substratos esféricos hidrofílicos tornou-se constante em tempos reacionais curtos (em torno de 30 min). A concentração média do PEP foi de $8,5 \pm 1,0$ mg/L independente de Γ (Figura 46).

Figura 46. Formação do PEP em função do tempo de contato com as superfícies das esferas de vidro imobilizadas com enolase (24 horas de adsorção). As linhas servem apenas de guias para os olhos.

Figura 47. Formação do PEP em função do tempo de contato com superfícies das esferas de vidro modificadas com TMCS e imobilizadas com enolase (24 horas de adsorção). As linhas servem apenas de guias para os olhos.

A atividade das moléculas adsorvidas nos substratos esféricos hidrofóbicos (Figura 48) foi relativamente menor do que aquela observada nos substratos esféricos hidrofílicos. A concentração média de PEP foi de aproximadamente 4 mg/L nas superfícies com Γ mais baixo (500 e 850 mg/m^2). Por outro lado, a superfície com alto valor de Γ (2200 mg/m^2) apresentou atividade mais elevada do que aquelas com baixo Γ . Este comportamento pode ser atribuído a diferentes fatores: (i) o alto valor de Γ pode indicar a formação de multicamadas e, neste caso, as estruturas das moléculas adsorvidas nas camadas superiores podem ser diferentes daquelas adsorvidas nas camadas inferiores ou (ii) possível dessorção no meio reacional, apesar do controle feito em solução de NaCl 0,001 mol/L não ter evidenciado isto. Em todas as superfícies imobilizadas, a quantidade de PEP formada apresentou fraca dependência do tempo reacional.

5.2 - ATIVIDADE DA ENOLASE ADSORVIDA EM SUBSTRATOS PLANOS

As Figuras 48 e 49 mostram a formação do PEP na solução de substrato em função do tempo de contato com as superfícies das placas de silício não modificadas (hidrofílicas) e silanizadas com TMCS (hidrofóbicas), respectivamente.

Figura 48. Formação do PEP em função do tempo de contato com superfícies de silício imobilizadas com enolase (24 horas de adsorção). As linhas servem apenas de guias para os olhos.

Figura 49. Formação do PEP em função do tempo de contato com superfícies de silício modificadas com TMCS e imobilizadas com enolase (24 horas de adsorção). As linhas servem apenas de guias para os olhos.

A atividade da enolase adsorvida sobre as placas hidrofílicas (Figura 48) apresentou comportamento semelhante àquele observado para as moléculas adsorvidas sobre placas modificadas com TMCS (superfícies hidrofóbicas) (Figura 49). Há uma fraca dependência da concentração de PEP com relação ao tempo reacional e Γ . A concentração média de PEP formado pelas superfícies imobilizadas de caráter hidrofílico e hidrofóbico foi de 4 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

De modo geral, a atividade das moléculas adsorvidas no substrato plano foi menor do que daquelas adsorvidas no substrato esférico. O caráter da superfície não influencia a atividade das moléculas adsorvidas nos substratos planos, enquanto que no caso dos substratos esféricos, as moléculas adsorvidas sobre superfície hidrofílica apresentaram maior atividade do que aquelas adsorvidas sobre superfície hidrofóbica.

Um último estudo comparativo foi realizado uma semana após a primeira medida da atividade da enolase adsorvida em substratos planos e esféricos para testar a possibilidade de reuso dos substratos. Os resultados descritos na Tabela 12 mostram que as moléculas adsorvidas nos substratos permanecem ativas. No entanto, as moléculas adsorvidas nos substratos esféricos continuam a apresentar maior atividade do que aquelas adsorvidas em substratos planos.

Tabela 12. Medida da atividade da enolase adsorvida em placas de silício e esferas de vidro modificadas com TMCS em diferentes tempos de contato com a solução do substrato. As medidas foram realizadas 1 semana após a primeira medida da atividade da enolase.

Placas Si/TMCS			Esferas/TMCS		
Γ (mg/m ²)	[PEP] mg/L t = 4h	[PEP] mg/L t = 24h	Γ (mg/m ²)	[PEP] mg/L t = 4h	[PEP] mg/L t = 24h
254	-	1,6 ± 0,4	-	-	-
380	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	505	2,5 ± 0,4	2,7 ± 0,3
557	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,6	856	2,7 ± 0,8	3,2 ± 0,5
1020	1,4 ± 0,5	3,1 ± 0,2	2290	13 ± 1,4	15 ± 1

6 Conclusões

O comportamento da adsorção da enolase nos substratos planos hidrofílicos e hidrofóbicos foi acompanhado por elipsometria *in situ*. As curvas de cinética em tempos longos apresentaram três etapas distintas: (i) uma controlada pela difusão de moléculas isoladas ou pequenos agregados, (ii) formação de uma monocamada evidenciada pelo patamar de adsorção e (iii) o aumento assintótico da quantidade de enolase adsorvida. Sendo a adsorção irreversível, as primeiras duas etapas podem ser descritas pelo modelo RSA e a terceira pelo modelo CSA. A influência da força iônica foi observada apenas na etapa (ii): elevando-se a concentração de sal no meio, a espessura da monocamada diminuiu e o empacotamento das moléculas adsorvidas foi favorecido, como observado nas imagens de AFM. Tal comportamento pode ser atribuído aos efeitos de blindagem, contribuindo para rearranjos conformacionais mais rápidos. Medidas de ângulo de contato mostraram que a enolase adsorvida em substratos hidrofóbicos possuem maior liberdade conformacional do que aquelas adsorvidas em substratos hidrofílicos. As isotermas de adsorção mostraram que a enolase não possui afinidade específica pelo substrato, pois as quantidades adsorvidas foram similares tanto nos substratos planos hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Variando-se o pH, a adsorção máxima ocorreu em $\text{pH} \approx \text{pI}$. Este máximo pode ser explicado baseando-se não somente em interações favoráveis entre substrato e enolase, mas também na redução da solubilidade da enzima.

O comportamento da adsorção da enolase em substratos esféricos hidrofílicos e hidrofóbicos, acompanhado por espectrofotometria UV-vis, mostrou que a quantidade de material adsorvido nestas superfícies (de modo geral) aumenta com o tempo de adsorção e concentração inicial de enolase em solução. Tal comportamento pode ser atribuído ao efeito de cooperativismo, bastante comum em biomoléculas. No entanto, a quantidade

adsorvida nos substratos esféricos é muito mais elevada do que nos substratos planos, como observado por meio do método de Bradford. Pela metodologia utilizada para os substratos esféricos não se pôde observar os três estágios característicos da cinética de adsorção obtida para substratos planos (Figura 12). Não se pode afirmar com certeza que estes não ocorram no caso da adsorção da enolase sobre substratos esféricos. A influência da força iônica somente foi observada na adsorção sobre os substratos esféricos em sistemas concentrados.

Medidas da atividade da enolase adsorvida mostraram que as moléculas apresentam maior atividade catalítica quando adsorvidas sobre substratos esféricos. O caráter da superfície não influenciou a atividade das moléculas adsorvidas nos substratos planos, enquanto que no caso dos substratos esféricos, as moléculas adsorvidas sobre superfície hidrofílica apresentaram maior atividade do que aquelas adsorvidas sobre superfície hidrofóbica. Isto mostra que a conformação que a molécula adota após a adsorção é influenciada não só pelas propriedades físico-químicas da superfície, mas também pela forma geométrica do substrato. O reuso das superfícies imobilizadas com enolase foi observado. Este é um resultado com grande potencial de aplicação tecnológica, uma vez que kits comerciais para detecção de biomoléculas em geral não são reutilizáveis.

Os resultados aqui apresentados podem contribuir no conhecimento do comportamento de adsorção desta enzima. Apesar do reconhecimento do papel da enolase em desordens sistêmicas e auto-imunes, não há na literatura estudos sobre sua imobilização em nenhum tipo de substrato. Com este trabalho, espera-se contribuir na construção futura de um sensor utilizado, por exemplo, na quantificação da produção de fosfoenolpiruvato, um intermediário da rota glicolítica, ou para detecção de níveis de imunoglobulina.

7 Referências bibliográficas

ADAMCZYK, Z. Kinetics of diffusion-controlled adsorption of colloid particles and proteins. *J. Colloid Interf. Sci.*, v.229, n.2, p.477-489, 2000.

ALMEIDA, A.T.; SALVADORI, M.C.; PETRI, D.F.S. Enolase adsorption onto hydrophobic and hydrophilic solid substrates. *Langmuir*, v. 18, n. 18, p. 6914-6920, 2002.

ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, S.N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts – balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, v.23, n.25, p.5912-5923, 1984.

ARWIN, H. Is ellipsometry suitable for sensor applications? *Sens & Actuators*, v. 92, n. 1-3, p. 43-51, 2001.

ASTHAGIRI, D.; LENHOFF, A.M. Influence of structural details in modeling electrostatically driven protein adsorption. *Langmuir*, v.13, n.25, p.6761-6768, 1997.

ATKINS, P.W. Physical chemistry. 5th edition, Oxford University Press, Oxford (USA), 1994.

AZZAM, R.M.A; BASHARA, N.M. In: Ellipsometry and Polarized Light. Amsterdam: North Holland Publication, 1979.

BAGCHI, P.; BIRNBAUM, S.M. Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin-G on anionic poly (vinyltoluene) model latex particles. *J. Coll. Interf. Sci.*, v. 83, n. 2, p. 460-478, 1981.

BALLANTYNE, D.S.; WARMINGTON, JR. Purification of native enolase from medically important *Candida* species. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v.31, 213-218, 2000.

BARTELT, M.C. AND EVANS, J.W. Scaling of spatial correlations in cooperative sequential adsorption with clustering. *J. Statistical Phys.*, v.76, n.3-4, p.867-876, 1994.

BARTELT, M.C., PRIVMAN, V. Kinetics of irreversible multiplayer adsorption – one dimensional models. *J. Phys. Chem.*, v.93, n.9, p.6820-6823, 1990.

BARTELT, M.C.; PRIVMAN, V. Kinetics of irreversible monolayer and multiplayer adsorption. *Internat. J. Modern Phys. B*, v.5, n.18, p.2883-2907, 1991.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CASTRO, L. B. R.; ALMEIDA, A. T.; PETRI, D. F. S. The effect of water or salt solution on thin hydrophobic films. *Langmuir*, v.20, n.18; p.7610, 2004.

CHIN, C.C.Q.; BREWER, J.M.; ECKARD, E.; WOLD, F. The amino-acid sequence of yeast enolase- preparation and characterization of peptides produced by chemical and enzymatic fragmentation. *J. Biol. Chem.*, v. 256, n. 3, p. 1370-1376, 1981.

COEN M.C.; LEHMANN, R.; GRÖNING, P.; BIELMANN, M.; GALLI, C.; SCHLAPBACH, L. Adsorption and bioactivity of protein A on silicon surfaces studied by AFM and XPS. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 233, n.2, p.180-189, 2001.

DUPONT-GILLAIN, C.C.; NYSTEN, B.; ROUXHET, P.G. Collagen adsorption on poly(methyl methacrylate): net-like structure formation upon drying. *Polym. Int.*, v.48, p.271-276, 1999.

ELGERSMA, A.V.; ZSOM, R.L.J.; NORDE, W.; LYKLEMA, J. The adsorption of the different types of monoclonal immunoglobulin on polistively and negatively charged polystyrene lattices. *Colloid. Surf.*, v.54, n.1-2, p.89-101, 1991.

EVANS, J.W. Random cooperative sequential adsorption. *Rev. Mod. Phys.*, v.65, n.4, p.1281-1329, 1993.

FEDER, J.; GIAVER, I. Adsorption of ferritin. *J. Colloid Interface Sci.*, v.78, n.1, p.144-154, 1980.

FUJIMOTO, J.; PETRI, D.F.S. Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. *Langmuir*, v. 17, n. 1, p. 56-60, 2001.

GAGE R.A, NORDE W. Interaction of the lipodepsipeptide syringotoxin with solid surfaces. *Colloids Surf.*, v. 9, n. 3-4, p. 139-145, 1997.

GLATTER, O. In: Small Angle X-ray Scattering. Glatter, O.; Kratky, O. (Eds), Academic Press: London, 1982.

GLATTER, O. Interpretation of real space information from small angle scattering experiments. *J. Appl. Crystallogr.*, v. 12, p. 166-175, 1979.

GRANT, M.L.; SAVILLE, D.A. Colloidal interactions in protein crystal growth. *J. Phys. Chem.*, v.98, n.40, p.10358-10367, 1994.

GREEN, R.J.; DAVIES, J.; DAVIES, M.C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S.J.B. Surface plasmon resonance for real time in situ analysis of protein adsorption to polymer surfaces. *Biomaterials*, v. 18, n. 5, p. 405-413, 1997.

GUINIER, A.; FOURNET, G. In: Small Angle Scattering of X-rays, Wiley: New York, 1955.

HALLER, I. Covalently attached organic monolayer on semiconductor surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 100, n. 26, p. 8050-8055, 1978.

HAYTER, J.B.; PENFOLD, J. Determination of micelle struture and charge by neutron small angle scattering. *Coll. Polym. Sci.*, v. 261, n. 12, p. 1022-1030, 1983.

<<http://www.rcsb.org>>, com o código de entrada 1ONE, acesso em outubro 2001.

JOHNSON CA, YUAN Y, LENHOFF AM. Adsorbed layers of ferritin at solid and fluid interfaces studied by atomic force microscopy. *J. Colloid. Interf. Sci.*, v. 223, n. 2, p. 261-272, 2000.

KAMYSHNY, A.; LAGERGE, S.; PARTYKA, S.; RELKIN, P.; MAGDASSI, S. Adsorption of native and hydrophobized human IgG onto silica: Isotherms, calorimetry, and biological activity. *Langmuir*, v. 17, n. 26, p. 8242-8248, 2001.

KAUZMANN, W. Protein stabilization – thermodynamics of unfolding. *Nature*, v. 325, n. 6107, p. 763-764, 1987.

KIM, K.; KIM, C.; BYUN, Y. Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir*, v. 17, n. 16, p. 5066-5070, 2001.

KULL, T.; NYLANDER, T.; TIBERG, F.; WAHLGREN N.M. Effect of surface properties and added electrolyte on the structure of beta-casein layers adsorbed at the solid/aqueous interface. *Langmuir*, v. 13, n. 19, p. 5141-5147, 1997.

KURRAT, R.; WALIVAARA, B.; MARTI, A.; TEXTOR, M.; TENGVALL, O.; RAMSDEN, J.J.; SPENCER, N.D. Plasma protein adsorption on titanium: comparative in situ studies using optical waveguide lightmode spectroscopy and ellipsometry. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v.11, n.4, p.187-201, 1998.

KUSTRZEBA-WÓJCICKA, I.; GOLCZAK, M. Enolase from *Candida albicans* - purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v.126, n.1, p.109-120, 2000.

LADAM, G.; GERGELY, C.; SENGER, B.; DECHER, G.; VOEGEL, J.C.; SCHAAF, P.; CUISINIER, F.J.G. Protein Interactions with Polyelectrolyte Multilayers: Interactions between Human Serum Albumin and Polystyrene Sulfonate/Polyallylamine Multilayers. *Biomacromolecules*, v.1, n.4, p.674-687, 2000.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.40, n.7, p.1361-1403, 1918.

LEBIODA, L.; BREWER, J.M. Crystallization and preliminary crystallographic data for a tetragonal form of yeast enolase. *J. Mol. Biol.*, v.180, n.1, p.213-215, 1984.

LEBIODA, L.; STEC, B. Crystal structure of enolase indicates that enolase and pyruvate-kinase evolved from a common ancestor. *Nature*, v.333, n.6174, p.683-686, 1988.

LEBIODA, L.; STEC, B.; BREWER, J.M. The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution – an 8- fold beta+alpha-barrel with novel beta-beta-alpha-alpha (beta-alpha) 6-topology. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 7, p. 3685-3693, 1989.

LIU, H.; ZHANG, Y.; YANG, W. How Is the Active Site of Enolase Organized To Catalyze Two Different Reaction Steps? *J. Am. Chem. Soc.*, v.122, n.28, p.6560-6570, 2000.

LOIDL-STÄHLHOFEN, A.; SCHMITT, J.; NÖLLER, J.; HARTMANN, T.; BRODOWSKY, H.; SCHMITT, W.; KELDENICH, J. Solid-supported biomolecules on modified silica surfaces - A tool for fast physicochemical characterization and high-throughput screening. *Adv. Mater.*, v.13, n.23, p.1829-1834, 2001.

LUNDSTROM, I. Models of protein adsorption on solid surfaces. *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, v.70, p.76-82, 1985.

LUNDSTROM, I.; ELWING, H. Simple kinetic models for protein exchange reactions on solid surfaces. *J. Colloid Interf. Sci.*, v.136, n.1, p.68-84, 1990.

LYKLEMA, J., NORDE, W. Interfacial behaviour of biomacromolecules. *Prog. Colloid & Polymer Sci.*, v.101, p.9-17, 1996.

MALMSTEN, M. Protein adsorption at phospholipid surfaces. *J. Colloid Interf. Sci.*, v.172, n.1, p.106-115, 1995.

MALMSTEN, M. Studies of serum protein adsorption at phospholipid surfaces in relation to intravenous drug delivery. *Colloids Surf. A: Physicochem. Engineer. Asp.*, v.159, n.1, p.77-87, 1999.

MORRISSEY, B.W. Adsorption and conformation of plasma proteins – physical approach. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.283, p.50-64, 1977.

MOTSCHMANN, H.; STAMM, M.; TOPRAKCIOGLU, C. Adsorption kinetics of block copolymers from a good solvent – A 2 – stage process. *Macromolecules*, v.24, n.12, p.3681-3688, 1991.

NORDE, W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, v.25, n.4, p.267-340, 1986.

NORDE, W.; GIACOMELLI, C.E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J. Biotechnology*, v.79, n.3, p.259-268, 2000.

OBERHOLZER, M.R.; LENHOFF, A.M. Protein adsorption isotherms through colloidal energetics. *Langmuir*, v.15, n.11, p.3905-3914, 1999.

OBERHOLZER, M.R.; WAGNER, N.J.; LENHOFF, A.M. Grand canonical Brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. *J. Chem. Phys.*, v.107, n.21, p.9157-9167, 1997.

OLIVIERI, M.P.; BAIER, R.E.; LOOMIS, R.E. Surface properties of mussels adhesive protein-component films. *Biomaterials*, v.13, n.14, p.1000-1008, 1992.

ORTEGA-VINUESA, J.L.; TENGVALL, P.; LUNDSTROM, I. Aggregation of HSA, IgG, and fibrinogen on methylated silicon surfaces. *J. Colloid. Interf. Sci.*, v.207, n.2, p.228-239, 1998.

PALIK, E.D., *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, Inc., New York, 1985.

PANCERA, S.M.; DA SILVA, L.H.M.; LOH, W.; ITRI, R.; PESSOA JR; A.; PETRI, D.F.S. The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, v.26, n.4, p.291-300, 2002.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.58, n.7, p.902-920, 2001.

PEREIRA, R.D. Atomic force microscopy as a novel pharmacological tool. *Biochem. Pharmacol.*, v.62, n.8, p.975-983, 2001.

PETRI, D.F.S.; WENZ, G.; SCHUNK, P.; SCHIMMEL, Th. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, v.15, n.13, p.4520-4523, 1999.

POYNER, R.R.; CLELAND, W.W.; REED, G.H. Role of metal ions in catalysis by enolase: An ordered kinetic mechanism for a single substrate enzyme. *Biochemistry*, v.40, n.27, p.8009-8017, 2001.

RAMSDEN, J.J.; PRENOSIL, J.E. Effect of ionic strength on protein adsorption kinetics, *J. Phys. Chem.*, v.98, 5376-5381, 1994.

RAVICHANDRAN, S., TALBOT, J. Mobility of adsorbed proteins: A Brownian dynamics study. *Biophysical J.*, v.78, n.1, p.110-120, 2000.

ROTH, C.M.; LENHOFF, A.M. Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption – computation of equilibrium constants. *Langmuir*, v.9, n.4, p.962-972, 1993.

ROTH, C.M.; LENHOFF, A.M. Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption – comparison of theory and experiment. *Langmuir*, v.11, n.9, p.3500-3509, 1995.

RYDE, N., KALLAY, N., MATIJEVIĆ, E. J. Particle adhesion in model systems. 14 – Experimental evaluation of multilayer deposition. *Chem. Soc. Faraday Trans.*, v.87, n.9, 1377-1381, 1991.

SANGADALA, V.S.; GLOVER, C.V.C.; ROBSON, R.L.; HOLLAND, M.J.; LEBIODA, L.; BREWER, J.M. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1251, p.23-31, 1995.

SCHAAF, P.; TALBOT, J. Surface exclusion effects in adsorption processes. *J. Chem. Phys.*, v.91, n.7, p.4401-4409, 1989.

SCHAAF, P.; VOEGEL, J.C.; SENGHER, B. From random sequential adsorption to ballistic deposition: A general view of irreversible deposition processes. *J. Phys. Chem. B*, v.104, n.10, p.2204-2214, 2000.

SEMENYUK, A.V.; SVERGUN, D.I. GNOM - A program package for small angle scattering data processing. *J. Appl. Crystallogr.*, v.24, p.537-540, 1991.

SENGER, B.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.C., JOHNER, A.; SCHIMMITT, A.; TALBOT, J. Influence of bulk diffusion on the adsorption of hard spheres on a flat surface. *J. Chem. Phys.*, v.97, n.5, p.3813-3820, 1992.

SHIBATA, A.; IIZUKA, Y.; UENO, S.; YAMASHITA, T. Effect of water activity on unfolding of adsorbed protein at the interface. *Thin Solid Films*, v.284-285, pp.549-551, 1996.

SIQUEIRA-PETRI, D.F.; WENZ, G.; SCHUNK, P.; SCHIMMEL, TH.; BRUNS, M.; DICHTL, M. Surface modification of thin polystyrene films. *Colloid Polym. Sci.*, v.277, n.7, p.673-679, 1999.

SÖDERQUIST, M.E.; WALTON, A.G. J. Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *Colloid Interface Sci.*, v.75, n.2, p.386-397, 1980.

SVERGUN, D.I.; BARBERATO, C.; KOCH, M.J.H. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.*, v.28, p.768-773, 1995.

SZLEIFER, I. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: A theoretical approach. *Biophysical J.*, v.72, n.2, p.595-612, 1997.

TALBOT, J.; TARJUS, G.; VAN TASSEL, P.R.; VIOT, P. From car parking to protein adsorption: an overview of sequential adsorption processes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineer. Aspects*, v.165, n.1-3, p.287-324, 2000.

TENGVAL, P.; LUNDSTRÖM, I.; LIEBERG, B. Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach. *Biomaterials*, v.19, n.4-5, p.407-422, 1998.

TRIPP, C.P.; HAIR, M.L. Reaction of chloromethylsilanes with silica – a low frequency infrared study. *Langmuir*, v.7, n.5, p.923-927, 1991.

TRIPP, C.P.; HAIR, M.L. Reaction of methylsilanols with hydrated silica surfaces – the hydrolysis of trichloromethylsilanes, dichloromethylsilanes and monochloromethylsilanes and the effects of curing. *Langmuir*, v. 11, n.1, p.149-155, 1995.

VALLEE, B.L. Zinc and metalloenzymes. *Adv. Prot. Chem.*, v.10, p.317-384, 1955.

VANSTEENKISTE, S.O.; CORNEILLIE, S.I.; SCHACHT, E.H.; CHEN, X.; DAVIES, M.C.; MOENS, M.; VAN VAECK, L. Direct measurement of protein adhesion at biomaterial surfaces by scanning force microscopy. *Langmuir*, v.16, n.7, p.3330-3336, 2000.

VAN TASSEL, P.R.; VIOT, P. An exactly solvable continuum model of multilayer irreversible adsorption. *Europhys. Lett.*, v.40, n.3, p.293-298, 1997.

VAN TASSEL, P.R.; VIOT, P.; TARJUS, G. A kinetic model of partially reversible protein adsorption. *J. Chem. Phys.*, v.106, n.2, p.761-770, 1997.

WAHLGREN, M.; ARNEBRANT, T.; LUNSTROM, I. The adsorption of lysozyme to hydrophilic silicon oxide surfaces – Comparison between experimental data and models for adsorption kinetics. *J. Colloid Interf. Sci.*, v.175, n.2, p.506-514, 1995.

WEAST, R.C. IN: Handbook of Chemistry and Physics, 64^a ed., CRC Press, Inc. Florida (USA), 1983.

YOU, H.X.; LOWE, C.R. AFM studies of protein adsorption .2. Characterization of immunoglobulin G adsorption by detergent washing. *J. Colloid Interface Sci.*, v.182, n.2, p.586-601, 1996.

YUAN, Y.; OBERHOLZER, M.R.; LENHOFF, A.M. Size does matter: electrostatically determined surface coverage trends in protein and colloid adsorption. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Engineer. Aspects*, v.165, n.1-3, p.125-141, 2000.

ZEMBALA, M.; ADAMCZYK, Z. Measurements of streaming potential for mica covered by colloid particles. *Langmuir*, v.16, n.4, p.1593-1601, 2000.

ZHDANOV, VP; KASEMO, B. Monte Carlo simulations of the kinetics of protein adsorption. *Surf. Rev. Lett.*, v.5, n.2, p.615-634, 1998.

ZHOU, J.; TSAO, H.K., SHENG, Y.J. Monte Carlo simulations of antibody adsorption and orientation on charged surfaces. *J. Chem. Phys.*, v.121, n.2, p.1050-1057, 2004.

ZLATANOVA, J.; LINDSAY, S.M.; LEUBA, S.H. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys & Molec. Biology*, v.74, n.1-2, p.37-61, 2000.

Apêndices

I. Elipsometria

A elipsometria é um método óptico não destrutivo, com resolução na faixa de Ângstrons, utilizada na determinação das propriedades ópticas (índice de refração) e espessura de filmes finos a partir da mudança do estado de polarização da luz após sua reflexão a partir da superfície refletora da amostra.

I.1. Princípios básicos

A base da técnica de elipsometria é a mudança do estado de polarização de uma onda eletromagnética monocromática após reflexão a partir de uma superfície refletora. O elipsômetro não mede diretamente a espessura do filme depositado no substrato, mas sim as mudanças da fase (Δ) e amplitude (Ψ) dos feixes incidente e refletido a partir de uma superfície plana refletora. Uma vez que a técnica envolve vários conceitos ópticos, faz-se necessária uma breve discussão dos conceitos diretamente envolvidos na técnica de elipsometria (Azzam & Bashara, 1979).

Segundo a teoria de Maxwell, a luz é uma onda cuja representação é feita por dois vetores mutuamente perpendiculares ao longo da direção z de propagação do feixe, o vetor campo elétrico ($\mathbf{E}$) e o vetor campo magnético ($\mathbf{B}$) (Azzam & Bashara, 1979). Nas interações da luz com a matéria, geralmente as mudanças no vetor campo magnético são desprezíveis, enquanto que as mudanças no vetor campo elétrico são significativas. A eq. (A1) descreve a onda eletromagnética pela sua amplitude e frequência:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{[i(2\pi/\lambda)z - \omega t]} \begin{cases} \vec{E}_x = \vec{E}_{01} \cos(\bar{q}z - \omega t + \delta_x) \\ \vec{E}_y = \vec{E}_{02} \cos(\bar{q}z - \omega t + \delta_y) \end{cases} \quad (\text{A1})$$

onde $\vec{E}_0$ representa a amplitude máxima de $\vec{E}$ que propaga na direção +z, ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$), t é o tempo, q é o número de onda ($q = 2\pi/\lambda$) e δ é a fase (δ_x e δ_y são constantes de fase). O vetor $\vec{E}$ é representado pela superposição de dois componentes, $\vec{E}_x$ e $\vec{E}_y$, ortogonais à direção de propagação z+ ($\vec{E}_z = 0$) e cujas amplitudes são $\vec{E}_{01}$ e $\vec{E}_{02}$, respectivamente.

A variação em função do tempo da orientação de $\vec{E}$ ao longo da direção de propagação em uma determinada posição fixa é denominada *polarização*. Qualquer fonte ordinária de luz produz luz não polarizada, ou seja, com $\vec{E}$ oscilando aleatoriamente no plano perpendicular à direção da propagação. A luz apresenta três tipos diferentes de polarização: *linear*, *circular* e *elíptica*. Um feixe de luz linearmente polarizado (Figura A - 1) é obtido a partir da combinação de dois feixes cujo valor de δ é múltiplo de π (0° ou 180°). Se as amplitudes de $\vec{E}_x$ e $\vec{E}_y$ são iguais ($\vec{E}_{01} = \vec{E}_{02}$) e δ é múltiplo de $\pm \pi/2$, a luz originada é circularmente polarizada (Figura A - 1). A combinação de dois feixes de mesmos comprimentos de onda (λ), intensidade e amplitude, mas com diferença de fases diferente de qualquer um dos valores citados anteriormente ($\delta \neq 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ ou 270°) gera luz elipticamente polarizada.

I.2. Modelos ópticos

Elipsometria é uma técnica indireta e as informações relevantes são obtidas através da análise de $\rho = \tan \psi e^{i\Delta}$. Os ângulos elipsométricos ψ e Δ descrevem somente as propriedades refletoras da superfície em questão. Sozinhas elas não fornecem nenhuma informação sobre a estrutura ou a composição da amostra. Para ir de dados ópticos a propriedades da amostra é necessária a utilização de modelos ópticos, ou seja, uma representação matemática idealizada de uma dada amostra que permita calcular as propriedades de interesse. Normalmente têm-se disponíveis informações

suficientes sobre o histórico da amostra para construir seu modelo óptico ideal. A maioria dos modelos ópticos utiliza substratos lisos semi-infinitos com uma ou mais camadas laminares aderentes de espessura uniforme na superfície. Assume-se que todas as interfaces são bem definidas, e que todas as camadas são compostas por materiais opticamente isotrópicos (Arwin, 2001).

Figura A - 1. Luz linearmente (a) e circularmente (b) polarizadas (Gonçalves & Irene, 2002).

Os modelos de multicamadas compostos por substrato-meio (Figura A - 2a) ou substrato-camada desconhecida (enzima adsorvida, APS ou filme polimérico)-meio (Figura A - 2b), utilizados na obtenção dos valores de espessuras das camadas adsorvidas, estão representados na Figura A - 2.

Figura A - 2. Modelo de multicamadas usado no cálculo da espessura (d) do filme adsorvido sobre o substrato a partir dos valores de Δ e Ψ obtidos nas medidas elipsométricas. Um feixe incidente (i) linearmente polarizado é refletido (r) pelas superfícies do substrato e do conjunto de multicamadas formado por substrato, filme e meio. O plano de incidência (P.I.) inclui o feixe incidente e a normal da superfície da amostra (plano do papel).

Os componentes paralelo ($\vec{E}_p$) e perpendicular ($\vec{E}_s$) ao P.I. estão fora de fase logo após a reflexão, e tanto fase quanto amplitude da luz refletida mudam de formas distintas, dependendo das propriedades ópticas da superfície.

Antes de dar prosseguimento na descrição da técnica, faz-se necessário uma rápida abordagem de alguns conceitos ópticos fundamentais no entendimento da elipsometria.

Quando a luz passa de um meio para outro ocorrem dois fenômenos diferentes conhecidos como reflexão e refração. O desvio sofrido pela luz ao atravessar dois meios diferentes é o chamado fenômeno da refração (Figura A - 2a). Este desvio depende da velocidade da luz nestes dois meios. A grandeza física que descreve a interação da luz com a matéria é denominada índice de refração (n). O índice de refração relativo (n_{21}) é definido como a razão entre a velocidade da luz no primeiro meio (v_1) e a velocidade da luz no segundo meio (v_2) (Figura A - 2a). Quando o primeiro meio é o vácuo ($v_1 = c$), o índice de refração que relaciona a velocidade da luz no vácuo (c) com a velocidade em outro meio (v), é denominado índice de refração absoluto ($n = c / v$, sendo $c = 3 \times 10^{10} \text{ cm}^2/\text{s}$).

$$(n_{21}) = v_1 / v_2 \quad (A2)$$

Se a superfície refletora (meio 2 da Figura A - 2b) não é totalmente transparente, o parâmetro que descreve a interação da luz com este meio é o chamado índice de refração complexo (N), o qual é composto de uma parte real e outra imaginária:

$$N = n - jk \quad (A3)$$

onde n é o índice de refração e k é o coeficiente de extinção.

A lei da refração formulada por Willebröd Snell (1580 - 1626) e René Descartes (1596 - 1650), também chamada de "Lei de Snell-Descartes", postula que o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão (ambos representados por θ_1 na Figura A - 2). A parte refratada sofre uma mudança na direção ao atravessar o segundo meio. O ângulo que o raio refratado faz

com a normal à superfície é denominado ângulo de refração (θ_2). e é dada por:

$$n_1 \times \text{sen}(\theta_1) = n_2 \times \text{sen}(\theta_2) \quad (\text{A4})$$

A Figura A - 2 mostra que o plano de incidência (PI) contém os feixes de luz incidente e refletido, além da normal da superfície. $\vec{E}_p$ e $\vec{E}_s$ são os componentes do campo elétrico nas direções paralela e perpendicular ao plano de incidência, respectivamente (o índice s vem da palavra em alemão *senkrecht*, que significa perpendicular).

Após a seleção de um modelo adequado, a equação que descreverá as propriedades elipsométricas de um modelo pode ser retirada das equações de Fresnel. As equações de Fresnel derivam diretamente das equações de Maxwell. Elas descrevem a reflexão e a transmissão na interface entre dois materiais opticamente isotrópicos. Como visto a seguir, a equação elipsométrica depende do índice de refração complexo e da espessura do filme modelo.

A influência da superfície na reflexão da luz é descrito pelos coeficientes de amplitude da reflexão ou coeficientes de reflexão de Fresnel, r_p e r_s , referentes aos componentes do campo elétrico paralelo e perpendicular, respectivamente.

As expressões para r_p e r_s considerando uma interface única entre o meio 0 (ambiente), com um índice de refração complexo N_0 , e o meio 1 (substrato), com um índice de refração complexo N_1 (Figura A - 2b), são:

$$r_{01p} = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = |r_p| e^{(i\delta_r)} = \frac{N_1 \cos \theta_0 - N_0 \cos \theta_1}{N_1 \cos \theta_0 + N_0 \cos \theta_1} \quad (\text{A5})$$

$$r_{01s} = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = |r_s| e^{(i\delta_s)} = \frac{N_0 \cos\theta_0 - N_1 \cos\theta_1}{N_0 \cos\theta_0 + N_1 \cos\theta_1} \quad (\text{A6})$$

O coeficiente de reflexão total (reflectância, R) para interface substrato recoberto com filme-ambiente (Figura A - 2b), no ângulo de incidência θ_0 é dado por:

$$R_p = |r_p|^2 \quad \text{e} \quad R_s = |r_s|^2 \quad (\text{A7})$$

ou ainda:

$$R_p = \frac{r_{01p} + r_{12p} e^{(-i2\beta)}}{1 + r_{01p} r_{12p} e^{(-i2\beta)}} \quad \text{e} \quad R_s = \frac{r_{01s} + r_{12s} e^{(-i2\beta)}}{1 + r_{01s} r_{12s} e^{(-i2\beta)}} \quad (\text{A8})$$

onde β relaciona a espessura do filme (d) e o índice de refração complexo do filme, N_1 , considerando uma luz incidente de comprimento de onda λ e ângulo de incidência θ_0 (equação de Drude):

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) N_1 \cos\theta_0 \quad (\text{A9})$$

A mudança de polarização após a reflexão a partir de uma superfície com múltiplas interfaces pode ser medida através de um coeficiente de reflexão complexo. A equação fundamental da elipsometria pode então ser reescrita como:

$$\rho = \tan(\Psi) e^{(i\Delta)} = \frac{R_p}{R_s} \quad (\text{A10})$$

A Figura A - 3a mostra as curvas dos coeficientes de Fresnel (r_p e r_s) em função do ângulo de incidência para uma interface formada entre um material dielétrico ($k = 0$) com $n_2 = 2,00$ e ar ($n_1 = 1,00$). Como $n_2 > n_1$ (e portanto $v_2 < v_1$), diz-se então que o meio 2 é mais refringente que o meio 1. Observa-se também que os valores de r_p e r_s variam de positivo a negativo conforme o ângulo de incidência aumenta. Há, porém, um determinado ângulo de incidência onde r_p se anula, o que implica na máxima polarização da luz refletida. Este ângulo específico é denominado ângulo de Brewster ou ângulo polarizante. Nesta condição, toda a luz p-polarizada é transmitida e somente luz s-polarizada é refletida. No caso específico da superfície de silício, este ângulo é de aproximadamente 70° . A Figura A - 3b mostra as reflectâncias R_p e R_s em função do ângulo de incidência obtidas a partir da equação anterior.

Figura A - 3. Variação dos coeficientes de reflexão em função do ângulo de incidência.

1.3. O elipsômetro

A configuração óptica básica de um elipsômetro está esquematizada na Figura A - 4. O feixe de luz incidente passa por um polarizador, sendo posteriormente refletido pela superfície da amostra em estudo com um ângulo igual ao ângulo de incidência. O feixe emitido pela fonte de luz monocromática atravessa o retardador (ou compensador). Se os componentes do campo elétrico do feixe estavam em fase (luz linearmente polarizada) antes de atravessar o compensador, a luz emergente terá seus componentes fora de fase (luz elipticamente polarizada). A luz refletida pela amostra passa por um segundo polarizador (analisador). O conjunto polarizador-compensador funciona como um polarizador elíptico (Tompkins, 1993).

Figura A - 4. Configuração básica de um elipsômetro "nulo": seu princípio de funcionamento se baseia na medida indireta do estado de polarização da luz através do ajuste da orientação do polarizador, do compensador (retardador) e do analisador para que a intensidade da luz que chega no detector (fotomultiplicadora) seja nula.

Os valores da diferença de fase (Δ) e a razão das amplitudes (Ψ) dos componentes paralelo (p) e perpendicular (s) do campo elétrico resultantes da reflexão são determinados pelos ângulos de rotação do conjunto

polarizador-analisador. No caso da reflexão a partir da superfície refletora do substrato (Figura A - 2), as eq. (A11) e (A12) descrevem Δ e Ψ (Azzam & Bashara, 1979):

$$\Delta = \delta_{rp} - \delta_{rs} \quad (\text{A11})$$

$$\tan \Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|} \quad (\text{A12})$$

sendo δ_{rp} e δ_{rs} a diferença de fase entre os componentes do feixe refletido paralelo e perpendicular e r_p e r_s os coeficientes de reflexão de Fresnel. A quantidade complexa ρ é definida pela razão entre os coeficientes de reflexão total (eq.(A13)):

$$\rho = r_p / r_s \quad (\text{A13})$$

A eq.(A14) é conhecida como a equação fundamental da elipsometria

$$\rho = (\tan \Psi)e^{i\Delta} \quad \text{ou} \quad (\tan \Psi) \cdot e^{i\Delta} = r_p / r_s \quad (\text{A14})$$

A informação a respeito da amostra estudada está contida no coeficiente de reflexão r_p e r_s . Por meio dos cálculos desenvolvidos por Jones em 1941 é possível se calcular o estado da polarização da luz conforme esta passa por todo o elipsômetro e pelo sistema que se deseja estudar (Azzam & Bashara, 1979).

I.4. Cálculo de Γ a partir de Δ e Ψ

O índice de refração complexo N representa as partes real e imaginária do índice de refração n ($N = n + ik$). Os parâmetros n e k (coeficiente de extinção) descrevem as mudanças de velocidade da fase e da amplitude da onda eletromagnética que se propaga através de um meio, respectivamente. Em outras palavras, o parâmetro k informa a quantidade de luz absorvida após interação desta com o material em estudo. No caso de materiais transparentes, devido ao alto grau de penetração da luz, os valores de k são aproximados para zero e, portanto $N = n$. Por outro lado, se o material em estudo não é totalmente transparente, então $k \neq 0$. Neste caso, n e k não mais podem ser considerados parâmetros constantes, mas sim dependentes de λ . Este efeito é conhecido como dispersão (Gonçalves e Irene, 2002). A relação de n em função de λ é descrita pela equação de Cauchy (Tompkins, 1993):

$$n(\lambda) = n_1 + n_2/\lambda^2 + n_3/\lambda^4 + \dots \quad (\text{A15})$$

onde n_1 , n_2 e n_3 são chamados de coeficientes de Cauchy. A relação de k com λ pode ser descrita pela equação:

$$k(\lambda) = k_1 + k_2/\lambda^2 + k_3/\lambda^4 + \dots$$

onde k_1 , k_2 e k_3 são chamados de coeficientes de extinção de Cauchy.

A maioria dos elipsômetros possui um software que mede Δ e ψ e calcula o índice de refração N (partes real e imaginária) e a espessura d do filme depositado sobre um substrato (desde que a espessura do filme seja da ordem de nanômetros, considera-se $k = 0$ e obtêm-se os valores de n e d). Como estes parâmetros dependem da homogeneidade da superfície, estes sempre devem ser medidos (a não ser que o material estudado seja extremamente reprodutível, como um único cristal de silício).

Normalmente o substrato usado pode ser considerado homogêneo e semi-infinito, com ou sem uma camada de óxido. Com estas restrições o problema se reduz a encontrar as propriedades de um filme orgânico fino sobre uma amostra com propriedades conhecidas. A correlação entre a espessura e o índice de refração do filme é normalmente alta. Além disso, na maioria dos substratos utilizados, como silício e metais, a mudança em Δ é praticamente linear com relação à espessura e as mudanças em Ψ são muito pequenas. Para minimizar os problemas de correlação, assume-se então um índice de refração fixo, normalmente da ordem de 1,4 a 1,6. Feito isso, a espessura do filme passa a ser o único parâmetro livre a ser determinado. Multiplicando a espessura do filme pela densidade do material que o compõe, obtêm-se uma concentração superficial Γ de unidades $\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

A rugosidade da superfície em estudo também altera os parâmetros elipsométricos Δ e Ψ . As mudanças de fase e amplitude da luz são muito afetadas com a presença de regiões heterogêneas microestruturais (1 a 10^3 nm), tais como contornos de grãos, regiões desordenadas, fases distintas, entre outras. Desse modo, a função dielétrica de um material (ϵ), a qual correlaciona suas propriedades ópticas e elétricas, possibilita uma estimativa da composição e microestrutura de uma fase não homogênea. Por meio de elipsometria espectroscópica, pela qual é possível se obter as mudanças de amplitude e fase em função da variação de λ , e da aplicação de modelos apropriados pode-se então determinar as contribuições destas regiões microestruturais em um dado material (Gonçalves e Irene, 2002).

Vale ressaltar que as equações da elipsometria descritas neste trabalho foram baseadas em modelos de interfaces paralelas entre diferentes materiais. No entanto, um novo tratamento matemático se faz necessário se o conjunto de interfaces em estudo apresentasse rugosidade significativa (Azzam e Bashara, 1979). A rugosidade é aqui definida pela

altura média de irregularidades em relação a uma linha média que caracteriza uma superfície plana. Quando a superfície é macroscopicamente rugosa, isto é, quando a altura média das irregularidades da superfície é maior do que o λ da luz incidente, ocorre espalhamento levando à redução da quantidade de luz refletida que atinge o detector do elipsômetro (Figura A-5a). Um alinhamento adequado do elipsômetro pode permitir que a intensidade do feixe seja suficiente o bastante para permitir a obtenção de Δ e Ψ . No caso de uma superfície microscopicamente rugosa, onde a altura média das irregularidades é menor do que o λ da luz, a interação da luz com cada ponto de rugosidade torna-se insignificante e a interface rugosa passa a ser considerada uma interface homogênea (Figura A-5b). Neste caso, os parâmetros espessura e índice de refração complexo são obtidos da mesma forma que seria empregada para qualquer sistema composto por uma interface lisa e homogênea (Tompkins, 1993).

Figura A - 5. Luz refletindo a partir de uma superfície: (a) macroscopicamente rugosa, onde o efeito de espalhamento faz com que apenas parte do feixe refletido alcance o detector; (b) microscopicamente rugosa, a qual pode ser considerada uma superfície plana e homogênea, desde que a altura média das irregularidades superficiais seja menor que λ . A linha tracejada representa o plano médio.

Existem muitos métodos para calcular Γ , sendo que os três mais utilizados são descritos por McCrakin (1960), de Feijter e col. (1978) e Cuypers e col. (1983). Em alguns casos, tanto índice de refração e quanto espessura do filme podem ser determinados utilizando a fórmula de Feijter.

$$\Gamma = d(n-n_0)/(dn/dc) \quad (A16)$$

onde d é a espessura da camada, n_0 é o índice de refração do ambiente, n é o índice de refração do filme e dn/dc é o incremento do n para as moléculas na camada.

II. Microscopia de Força Atômica

A base da Microscopia de Força Atômica (AFM – Atomic Force Microscopy) é a medida das forças entre uma sonda e a superfície da amostra estudada. A varredura é feita por meio de uma ponta aguda (~ 100 Å de diâmetro e de comprimento de μm) que está localizada na extremidade livre do cantiléver (~ 100 a $200\mu\text{m}$ de comprimento). O conjunto cantiléver-ponta geralmente usado é composto por nitreto de silício, mas dependendo do tipo de análise realizado pode-se usar pontas recobertas por outros materiais, como por exemplo W_2C , ouro ou mesmo monocamadas orgânicas ou proteínas. Forças repulsivas ou atrativas entre ponta e amostra fazem com que o cantiléver seja repelido ou atraído pela superfície da amostra. Um fotodetector mede a deflexão do laser causado pelo movimento do cantiléver durante a varredura, permitindo assim a geração da imagem topográfica da superfície da amostra em um computador (Figura A - 6). A aproximação entre ponta-amostra é feita pelo scanner. Este pode mover a sonda sobre a

amostra ou mover a amostra sob a sonda. O sistema de varredura de um microscópio de AFM é sensível a distâncias extremamente pequenas e isto é possível graças ao uso de cerâmicas piezoelétricas, as quais geram a movimentação necessária (nas direções x, y e z) para a obtenção de imagens tridimensionais. Estes sistemas também são usados para levar a amostra até o cantilêver ou vice-versa. As dimensões varridas podem variar desde alguns Ângstrons até centenas de micra nos eixos x e y e no eixo vertical z de décimos de Angstrom a alguns micra (Herrmann e col., 1997).

Figura A - 6. Desenho esquemático do princípio de funcionamento da técnica de AFM. O fotodetector monitora a deflexão do laser causado pelo movimento da alavanca durante a varredura através da mudança na reflexão de um feixe de Laser incidente.

O sinal de deflexão do laser, que é resultante do tipo de força de interação ponta-amostra, é utilizado pelo computador para gerar um mapa da topografia da superfície da amostra. Para isto, uma conversão de variação do sinal no fotodetector para variação de altura na amostra é

realizada pelo computador. O sistema de detecção da intensidade da força de interação ponta-superfície é simples, estável e de baixo ruído. Este sistema é composto por um laser, um espelho e um fotodetector. O feixe de laser que incide na superfície superior (espelhada) do cantilever é refletido até o espelho, atingindo em seguida o fotodetector (Figura A - 6). O fotodetector é dividido em quadrantes, denominados A, B, C e D. É possível monitorar a intensidade do feixe de laser que atinge o fotodetector na sua parte superior (A+B), inferior (C+D), esquerda (A+C) e direita (B+D). Durante a varredura, a intensidade da força de interação ponta-superfície varia de acordo com a morfologia da superfície da amostra. A deflexão do laser pelo cantilever e, conseqüentemente, a região do fotodetector atingida pelo feixe laser, depende da intensidade da força de interação ponta-superfície. A diferença entre as intensidades dos sinais que atingem a parte superior e inferior do fotodetector é utilizada pelo sistema de realimentação para definir o deslocamento vertical a que a amostra será sujeitada, de modo a manter a intensidade da força de interação ponta-superfície constante.

A amplitude da oscilação da sonda é monitorada pelo fotodetector. A amplitude rms é mantida constante. A Figura A - 7 ilustra a variação das amplitudes rms da oscilação da sonda em função da distância ponta-superfície. À medida que a ponta se aproxima da superfície, a força de interação ponta-superfície leva a redução da amplitude rms da oscilação. Enquanto a amostra é varrida sob a ponta, a amplitude rms da oscilação varia de acordo com as características morfológicas da superfície da amostra. Se a força de interação ponta-superfície aumenta, a amplitude da oscilação diminui e vice-versa. A posição vertical do scanner em cada ponto (x, y) é armazenada e as correções em z são feitas para manter a amplitude rms constante. Com estes dados a imagem topográfica da superfície da amostra é formada.

Figura A - 7. Amplitude de oscilação da ponta. (a) ponta longe da superfície e (b) ponta próxima à superfície.

O princípio de operação comum de um AFM é por meio da medida de forças entre a ponta e amostra. Estas forças dependem, em parte, da natureza da amostra, da distância ponta-amostra, da geometria da sonda usada e também de qualquer tipo de contaminante que possa existir na superfície da amostra (Herrmann e col., 1997). Muitos tipos de força contribuem para a deflexão do cantiléver em AFM. A Figura A-8a ilustra a relação entre a distância ponta-amostra e a natureza destas forças e o modo de operação do microscópio em função destas forças (Figura A-8b).

A interação entre dois corpos eletricamente neutros (e não magnéticos) separados por uma distância de até algumas dezenas de nanômetros, é dominada por forças do tipo van der Waals (forças atrativas). Neste caso, temos o microscópio operando em modo contato. Diminuindo a

distância de separação entre os dois corpos (para aproximadamente alguns Angstroms), predominam forças repulsivas e o microscópio passa a operar em modo não contato.

No modo de operação de contato intermitente (*tapping mode*[®]) a força de interação é ora atrativa, ora repulsiva. Durante a varredura, a ponta oscila sobre a superfície chegando a tocá-la sutilmente, sem, no entanto, sofrer a ação significativa de forças capilares e minimizando a interferência das camadas adsorvidas na superfície das amostras. A oscilação da ponta tem frequência próxima à frequência de ressonância da sonda. Neste modo de operação, utilizam-se sondas com constantes de elasticidades altas.

Figura A - 8. (a) Relação de forças que atuam entre a ponta e a amostra em função da distância que as separa (Herrmann e col., 1997). (b) Curva da força decorrente da separação ponta-amostra.

III. Espectroscopia de fotoelétrons com fonte de raios-X (XPS)

A técnica se baseia no efeito fotoelétrico e foi desenvolvida em meados da década de 60 por Kai Siegbahn e seu grupo de pesquisa da Universidade de Upsala (Suécia) em 1967 (Siegbahn e col., 1967). Na análise de XPS as amostras são irradiadas com uma fonte monocromática de raios-X, causando a ejeção de fotoelétrons da superfície analisada. As energias de ligação do elétron ejetado, medidas por um espectrômetro eletrônico de alta resolução, são usadas para identificar os elementos presentes e, em muitos casos, fornecem informações a respeito do(s) estado(s) de valência ou ambiente químico dos elementos detectados. Também é possível a caracterização de grupos funcionais nas superfícies.

A profundidade da análise, tipicamente em torno dos 3 nm a partir da superfície da amostra, é determinada pela intensidade de escape/fuga dos fotoelétrons e do ângulo de incidência da radiação no plano da amostra relativo ao espectrômetro (*take-off*). A análise de XPS pode ser aplicada a amostras de materiais condutores ou isolantes desde que seu diâmetro não ultrapasse 95 mm e sua espessura máxima seja de 20 mm. Como a análise é realizada em ambiente de alto vácuo ($\approx 10^{-9}$ bars), se a amostra é composta por material depositado na superfície do substrato, este não pode sofrer remoção devido à ação do vácuo (www.ncsu.edu/aif/SAL/xps_theory.htm).

I.5. Princípios básicos

A interação entre os fótons de raios-X e os átomos da superfície em estudo produz a emissão de fotoelétrons (Figura A - 9). Este fenômeno recebe o nome de efeito fotoelétrico e ocorre quando um fóton é totalmente absorvido por um elétron proveniente das camadas eletrônicas mais internas dos átomos (camada K, por exemplo). As lacunas criadas nestas camadas são preenchidas com elétrons provenientes de níveis energéticos mais altos, gerando tanto a emissão de raios-X fluorescentes quanto processos de

emissão Auger. A energia cinética dos elétrons que abandonam a superfície em estudo é então medida pelo sistema analisador/detector.

A energia cinética (E_K) do fotoelétron ejetado está diretamente relacionada a sua energia de ligação (E_B) segundo a eq. (A17):

$$E_K = h\nu - E_B - \delta E \quad (A17)$$

onde $h\nu$ é a energia do fóton de raio-X e δE é o termo que denota a presença de cargas eletrostáticas sobre a superfície (significante no caso de isolantes). A medida de E_K do fotoelétron serve para determinar E_B , a qual possui valor característico de cada elemento. Ressalta-se que E_K do fotoelétron depende da energia dos fótons gerados pela fonte.

Figura A - 9. Efeito fotoelétrico: (a) a radiação incidente é composta de fótons que possuem energia proporcional à frequência de radiação. (b) A energia do fóton é insuficiente para remover um elétron da amostra. (c) O fóton possui energia em excesso, o que possibilita a ejeção do elétron; a energia excedente é liberada sob a forma de energia cinética do fotoelétron (elétron ejetado).

1.6. O espectrômetro

A Figura A - 10 mostra os componentes básicos de um espectrômetro XPS. A seguir, uma rápida descrição de alguns dos componentes de um espectrômetro XPS.

Figura A - 10. Esquema de um espectrômetro de XPS.

- a) **Fonte de raios-X:** os raios-X são obtidos pelo bombardeando de um material de referência "branco metálico" (anticátodo) com elétrons de 10 a 15 keV, gerando uma radiação característica. A fonte deve ser suficientemente energética para arrancar elétrons das camadas atômicas mais internas ($> 1\text{keV}$) e intensidade suficiente para produzir um fluxo detectável de elétrons. Somente dois elementos, Al e Mg, geram radiação com tais

qualidades, sendo proveniente das transições 2p-1s (linhas $K\alpha$). No caso do Al, a linha $K\alpha$ ($K\alpha_1 + K\alpha_2$) corresponde a uma energia de 1253,6 eV (largura da banda = 1 eV) e o no caso do Mg essa energia é de 1486,6 eV (largura da banda = 0,8 eV).

- b) câmara de alto-vácuo: o vácuo é necessário pois a atmosfera pode interagir com a radiação ou mesmo contaminar a superfície em estudo, modificando assim o resultado da análise. O sistema de bombeamento utilizado não deve gerar contaminantes. Portanto, bombas de óleo ou difusoras não são utilizadas e no lugar destas dá-se preferência ao uso de bombas de N_2 . A câmara pode ser construída com materiais tais como vidro ou aço inoxidável. A faixa de valores do alto-vácuo é da ordem de $10^{-7} - 10^{-9}$ bar.
- c) Analisador: uma vez que os elétrons são produzidos pela interação sonda-amostra, estes devem ser analisados de acordo com sua energia. Este analisador consiste de duas esferas magnéticas concêntricas, sendo que a esfera externa possui potencial negativo e a interna possui potencial positivo. Os elétrons, previamente retardados por um conjunto de grades, entram no analisador com um determinado ângulo permitindo uma boa transmissão. Em seguida, são direcionados pelo campo das esferas e alcançam o detector (*channeltron* ou *channelplate*).
- d) Detectores: somente parte da energia de excitação resultante da interação sonda-amostra se converte em radiação emergente e alcança os detectores, os quais devem ser altamente sensíveis a fim de captar este sinal. No caso do XPS onde fótons são gerados, estes detectores são chamados de “*channeltrons*” ou “*channelplates*”.

O espectrômetro utilizado neste trabalho está instalado na Bélgica e possui características semelhantes às do espectrômetro instalado na Universidade de Illinois (EUA) ilustrado na Figura A - 11.

Figura A - 11. Instrumentação do “Center for Microanalysis of Materials Frederick Seitz Materials Research Laboratory”, Universidade de Illinois (EUA).

1.7. O espectro de XPS

Um espectro de XPS é a representação da energia cinética, E_K , ou da energia de ligação, E_B , frente ao número de elétrons registrados e amplificados (intensidade) pelo detector (*channeltron* ou *channelplate*). As medidas de E_K ou E_B se referem usualmente ao nível de Fermi. A identificação dos elementos presentes na superfície da amostra é feita através da determinação da energia de ligação referente ao pico fotoelétrico, característico de cada elemento. A área integrada do pico fotoelétrico

referente ao um nível de energia de um átomo é proporcional ao número do mesmo átomo presente no volume detectado, permitindo, portanto, a obtenção de informações sobre a composição química da superfície.

A intensidade dos picos do espectro de XPS depende, dentre outros fatores, da seção eficaz (σ), ou seja, a medida da probabilidade de emissão fotoeletrônica (probabilidade de transição por unidade de tempo) a partir de um nível energético, dependendo inclusive do número atômico (Z).

IV. Espectroscopia fotoacústica (PAS)

A técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS) utiliza detecção do sinal acústico de uma amostra gerada por absorção de radiação modulada. A amostra é colocada numa pequena câmara, a qual possui um microfone acoplado (Figura A - 12). Radiação modulada é focalizada sobre a amostra, e certas radiações que correspondem ao espectro de absorção do material que compõe a amostra são absorvidas. A radiação absorvida causa flutuações de temperatura na superfície, as quais induzem mudanças periódicas de pressão do gás na célula fotoacústica. O gás usado (geralmente He) deve ter boa condutividade térmica. Uma onda sonora é desenvolvida e então captada pelo microfone. Este sinal elétrico é convertido em interferograma e posteriormente em espectro. Se uma frequência particular não é absorvida, a amostra então não aquecerá e nenhuma onda sonora será desenvolvida.

Figura A - 12. Esquema do acessório fotoacústico no infravermelho.

As vantagens do uso do acessório fotoacústico é que a princípio ele pode trabalhar com amostras nos mais diferentes estados (líquido, sólido ou gás). Dependendo da amostra em estudo, não há a necessidade de preparação anteriormente à análise. Outra vantagem é a capacidade de analisar materiais opacos e o perfil de profundidade destes. As limitações da PAS incluem a baixa relação sinal/ruído por varredura, saturação fotoacústica relacionada à alta absorção (o uso de amostras mais finas minimiza tal efeito), um aumento artificial no sinal devido à dilatação térmica da amostra e um aumento das fontes de calor em amostras heterogêneas devido ao espalhamento de luz (Lage, 2003).

Refêrencias bibliográficas

<http://www.ncsu.edu/aif/SAL/xps_theory.htm>, acesso em setembro de 2004.

ARWIN, H. Is ellipsometry suitable for sensor applications? *Sensors and Actuators A – Physical*, v.92, n.1-3, p.53-51, 2001.

AZZAM, R.M.A; BASHARA, N.M. In: *Ellipsometry and Polarized Light*. Amsterdam: North Holland Publication, 1979.

CUYPERS, P; CORSEL, JW; JANSEN, MP; KOP, JMM; HERMENS, WT; HEMKER, HC. The adsorption of prothrombin to phosphatidyl-serine multilayers quantitated by ellipsometry. *J Biol Chem.*, v.258, p.2426-2431, 1983.

DE FEIJTER, JA; BENJAMINS, J; VEER, FA. Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air water interface. *Biopolymers*, v.17, p.1759-1801, 1978.

GONÇALVES, D.; IRENE, E.A. Fundamentals and applications of spectroscopic ellipsometry. *Quím. Nova*, v.25, n.5, p.794-800, 2002.

HERRMANN, PSP; MATTOSO, LHC; SILVA, MAP; BERNADES FILHO, R; COLNAGO, LA; FROMMER, JE. Microscopia de Varredura Por Força: Uma Ferramenta Poderosa No Estudo de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. São Carlos: , n.4, p.51 - 61, 1997.

LAGE, L.G. Poliuretanas: caracterização, avaliação estrutural e efeito induzido pela radiação gama. [Tese] São Paulo: Inst. Química da Universidade de São Paulo, 2003.

MCCRACKIN, F.L.A. *NBS Technical Note 479*, Washington DC, 1969.

SIEGBAHN, K.; NORDLING, C.; FAHLMAN, A.; NORDBERG, R.; HAMRIN, K.; HEDMAN, J.; JOHANSSON, G.; BERGMARK, T.Ç KARLSSON, S.E.; LINDBGREN, I.; LINDBERG, B. *Nova Act. Reg. Soc.Sci.*, Ser. IV, v.20, p.1, 1967.

TOMPKINS, H.G. In: *A user's guide to ellipsometry*. Academic Press, Inc. 1993.

Curriculum

Vitae

Nome: Arlete Tavares Almeida

Nascimento: São Vicente (SP) aos 26 de outubro de 1972.

Formação Acadêmica

1987 - 1990 Ensino Médio Técnico em Processamento de Dados, Escola Técnica Treinasse, Santos, SP.

1992 - 1996 Graduação: bacharelado em química plena, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP.
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

1997 - 2000 Mestrado em CIÊNCIA EM TECNOLOGIA NUCLEAR – APLICAÇÕES, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, São Paulo, SP.
Título: Obtenção de superfícies hemocompatíveis por meio da modificação de materiais poliméricos pela radiação ionizante (no de obtenção: 2000), Orientadora: Olga Zazuco Higa.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2000 - 2004 Doutoranda em Química (Físico-Química), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP.
Título: Interação entre biomoléculas e superfícies sólidas
Orientador: Denise Freitas Siqueira Petri
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

8-12/2002 Estágio no Forchungszentrum Karlsruhe (Alemanha) em microscopia de força atômica (AFM). Técnicas utilizadas: AFM de contato e tapping mode (meios: ar e líquido). Projetos: estudo da influência da umidade na preparação de filmes finos de blendas poliméricas de PS/PVB; estudo da influência da força iônica na adsorção da enzima enolase em wafer de silício (puro e modificado com filme de PS). Orientador: Prof. Dr. Thomas Schimmel.

Ocupação: Professora de Química (ensino médio) no Colégio Maria Nazareth, São Paulo, SP. Início em agosto de 2004.

Artigos completos publicados em periódicos

- 1 CASTRO, L. B. R.; ALMEIDA, A. T.; PETRI, D. F. S. The effect of water or salt solution on thin hydrophobic films. *Langmuir*, v.20, n.18; p.7610, 2004.
- 2 ALMEIDA, A. T., GLIEMANN, H., SCHIMMEL, T., DFS Petri. The adsorption kinetics of enolase studied by means of in situ ellipsometry and wet AFM. *Progress in Polymer Science*. 2004.
- 3 ALMEIDA, A. T., GLIEMANN, H., SCHIMMEL, T., DFS Petri. Adsorption kinetic of enolase on silicon studied by in situ ellipsometry and wet AFM. *Acta Microscopica*. , v.12, p.41 - 44, 2003.
- 4 ALMEIDA, A. T., MC Salvadori, DFS Petri. Enolase adsorption onto hydrophilic and hydrophobic solid substrates. *Langmuir*. v.18, n.18, p.6914 - 6920, 2002.
- 5 ALMEIDA, A. T., DFS Petri. Study of enolase biofilms formation onto solid surfaces. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, v.374, p.605 - 610, 2002.

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

- 1 ALMEIDA, A. T., DFS Petri. Efeito da água em filmes finos de poliestireno In: XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador (BA). **Livro de Resumos da XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004.
- 2 ALMEIDA, A. T., GLIEMANN, H., SCHIMMEL, T., DFS Petri. The adsorption kinetics of enolase studied by means of in situ ellipsometry and wet AFM In: 11th International Conference on Surface and colloid Science, Foz do Iguaçu (PR). **11th International Conference on Surface and colloid Science**. , 2003.
- 3 ALMEIDA, A. T., OZ Higa. Obtainment of hemocompatible surfaces by the modification of polymeric materials by ionizing radiation In: Sixth International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, 2001, Recife/PE. **VI ICFPAM - 2001**. , 2001.
- 4 ALMEIDA, A. T., DFS Petri. Study of enolase biofilm formation on bare and modified silicon wafers. In: Sixth International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, 2001, Recife/PE. **VI ICFPAM - 2001**. , 2001.
- 5 ALMEIDA, A. T., DFS Petri. Study of enzyme adsorption onto bare and modified Si wafers. In: International Workshop on Spectroscopy for Biology, 2001, São Paulo. **International Workshop on Spectroscopy for Biology (IWSB)**, 2001.

- 6 ALMEIDA, A. T., OZ Higa. Biocompatibilidade do copolímero de enxerto PET-g-PHEMA obtido por meio de radiação ionizante In: Encontro Nacional de Aplicações Nucleares, Rio de Janeiro (RJ). **V ENAN.** , 2000.
- 7 ALMEIDA, A. T., OZ Higa, SO Rogero. Silicone tubes grafted by ionizing radiation: biocompatibility tests In: II Congreso Internacional de Biomateriales, 1999, Havana. **Biomat'99.** , 1999.
- 8 ALMEIDA, A. T., ER Barrak, AAA Queiróz, OZ Higa. Estudo por TMA do PDMS após modificação por radiação ionizante para aplicação em bioengenharia In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 1998, Curitiba (PR). **CBECIMAT.** , 1998.
- 9 ALMEIDA, A. T., AAA Queiróz, OZ Higa. Obtenção do copolímero de enxerto PDMS-g-DMAA via radiação ionizante In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998, Poços de Caldas (MG). **Livro de Resumos da 21a. SBQ.** , 1998. v.1.
- 10 L.H.B. Baptistella, ALMEIDA, A. T., E.A.M. Godoi. Estudos de reações de SN_2 com epóxidos e aziridinas utilizando energia de microondas In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1996, Poços de Caldas. **Anais da 19a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** 1996.