

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia

Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos

Ernando Silva Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia

Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos

Ernando Silva Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Ernando Silva

Interação da proteína albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos. Ribeirão Preto, 2009.

150 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física Aplicada à Medicina eBiologia.

Orientador: Ito, Amando Siuti.

1. Albumina do soro bovino (BSA).
 2. Filme LBL.
 3. Fluorescência.
 4. Nanopartícula de ouro.
-

Pegadas na Areia

"Esta noite eu tive um sonho.

*Sonhei que caminhava pela praia, acompanhado do Senhor,
e que na tela da noite estavam sendo retratados os meus dias.
Olhei para traz e vi que cada dia que passava no filme da minha
vida, surgiam pegadas na areia, uma minha e outra do Senhor.
Assim continuamos andando, até que todos os meus dias se acabaram.*

Então parei e olhei para traz.

Reparei...

*Em certos lugares havia apenas uma pegada e esses lugares
coincidiam justamente com os dias mais difíceis da minha vida,
os dias de maior angústia, de maior medo de maior dor...*

Perguntei então ao Senhor:

*" Senhor, tu me disseste que estarias comigo todos os dias da
minha vida e eu aceitei viver contigo mas, por que tu me deixaste
nos piores dias de minha vida? "*

E o Senhor respondeu:

" Meu filho eu te amo.

*Eu disse que estaria contigo por toda a tua caminhada e que não
te deixaria um minuto sequer, e não te deixei...
Os dias que tu viste apenas uma pegada na areia,
foram os dias que te carreguei.. "*

Autor desconhecido

*À minha esposa Geslaine
À minha mãe Margarida
Aos meus irmãos Elaine, Evandro e Junior*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS pela vida, saúde, disposição, coragem e por todos os ensinamentos;

À minha esposa Gesline pela presença transformadora, pelos incentivos, pelo companheirismo, paciência e compreensão em momentos difíceis e, principalmente, pelo amor que tanto me fortalece e dá sentido à minha vida. TE AMO!!;

À minha filha Heloísa Fernandes Ferreira (*in memoriam*) pela lição de vida que nos deixou. TE AMAMOS MINHA FILHOTA!!

À minha família que, mesmo estando longe, sempre esteve presente em meus pensamentos e sempre me deram força para ir em frente.

À Universidade de São Paulo, pela Assistência Social;

Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, pela ética, confiança, oportunidade, paciência, confiança, amizade, orientação e pelos livros oportunos.

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevich pela colaboração e pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Elisabete D. Zaniquelli, pelas inúmeras vezes que me recebeu sempre com muita atenção e disposição.

À Dr. Ana Paula Ramos pela ajuda nas medidas de potencial zeta e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pelo treinamento na técnica de LBL e pelo fornecimento de alguns materiais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mulato pelas medidas microscopia óptica e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachman pela disposição em algumas medidas de espectroscopia de infravermelho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Serra pelas medidas de fluorescência.

Ao aluno de Química Paulo Cesar pela disposição em fazer as medidas de fluorescência.

A todos os técnicos do Departamento de Física, em especial ao Carlão, Aziane, Sérgio, Élcio, e Júlio que sempre se mostraram muito prestativos quando solicitados e pela amizade.

À todo o pessoal da Secretária do Departamento de Física, em especial à Nilza pela pelo tratamento atencioso e pela paciência em nos atender.

A todos os antigos e novos colegas e amigos da Pós pela convivência amistosa, pelos momentos de alegria e descontração, pelas conversas produtiva (às vezes nem tanto), pelo carinho e respeito, que fizeram de todos esses anos longe da família menos sofríveis e, muitas vezes, bastante prazerosos.

A todos os amigos do grupo de pesquisa, em especial à Cássia (hoje Profa. Dra.) pela imensa paciência nas orientações do laboratório e pelas discussões técnicas e filosóficas, Gustavo Parra(pudim) Marcelo Takara, Sérgio e Moisés pela assessoria em assuntos computacionais e aleatórios e Luciana, Marina, Andréia, Érica, Sérgio, Flávio (Buzina) e Jeferson pela convivência e amizade.

À Marina Berardi e Ao Gustavo Parra pela grande força na correção e impressão da Tese..

Aos amigos Silvio (compadre²), Andréia (comadre²), Rodrigo, Marcela, Ana, Rond, Carol e Claudita pela presença quase assídua nos eventuais almoços, jantares e cinemas de finais de semana, pelo carinho e amizade.

Ao Aluno de Pós-Doutorado Jorge (“o amigo mais pobre”) pelas discussões técnicas, ajuda em medidas elétricas, amizade e momentos de alegria.

A todos os moradores da casa 12 e 13 por terem me acolhido sempre que precisei e pela
Amizade.

À Capes pelo apoio financeiro.

A todos, meu sincero MUITO OBRIGADO!!

"Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor. Lembre-se. Se escolher o mundo, ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele você conquistará o mundo."

Albert Einstein

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	IV
1.	
INTRODUÇÃO	16
1.1 Proteínas e substratos sintéticos	16
1.1.1 Objetivos do trabalho.....	5
1.2 Albumina do soro bovino (BSA)	6
1.2.1 Propriedades físico-químicas da BSA.....	7
1.2.2 Propriedades funcionais da BSA.....	8
1.3 Métodos de fabricação de nanopartículas de ouro	9
1.3.1 Nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes.....	11
1.3.2 Crescimento de nanopartículas por semente e por template.....	12
1.3.3 Nanopartículas de ouro estabilizadas em polímeros ou em macromoléculas.....	13
1.3.4 Síntese de colóides de ouro em duas fases.....	15
1.3.5 Preparação de nanopartículas de ouro em formas controladas.....	16
1.3.6 Nanopartículas de ouro preparadas por ablação a laser.....	17
1.3.7 Organização de nanoestruturas de ouro em arquiteturas macroscópicas.....	33
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
2.1 A técnica LBL	21
2.2 Absorção Óptica e Emissão de Fluorescência	23
2.3 Processo de absorção óptica	25
2.4 Fluorescência com Resolução Temporal	26
2.5 Posição Espectral	29
2.6 Supressão de fluorescência	29
2.7 A influência do tamanho da partícula na absorção de plasmon	32
2.8 Influência da forma da partícula na absorção de plasmon	35
2.9 Aumento de fluorescência por ressonância de plasmon de superfície	35
2.10 Efeitos de uma superfície metálica sobre a fluorescência	37
2.11 Efeitos de partículas metálicas sobre a supressão	39

2.12 Engenharia de decaimento radiativo.....	42
2.13 Aplicações Biofísicas da RDE.....	49
2.14 Interação fluoróforo-metal.....	50
2.15 Interação fluoróforos–partículas metálicas.....	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 Preparação das soluções.....	55
3.2 Preparação dos substratos.....	55
3.3 Fabricação dos filmes.....	56
3.4 Medidas de absorção óptica.....	57
3.5 Medidas de fluorescência estática.....	57
3.6 Medidas de fluorescência com resolução temporal.....	58
3.7 Síntese das nanopartículas de ouro.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DOS MATERIAIS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	63
4.1.1 Fabricação e caracterização dos filmes de quitosana/ftalocianinas depositados sobre substrato de vidro.....	65
4.1.2 Microscopia óptica dos filmes de quitosana/ftalocianinas.....	69
4.1.3 Estudo da influência dos substratos sobre os filmes de quitosana/ftalocianina de níquel.....	69
4.1.4 Microscopia de força atômica do filme de quitosana/ftalocianina de níquel.....	72
4.2 Fabricação e caracterização dos filmes de PAH/ftalocianina de níquel.....	73
4.3 Supressão da fluorescência da BSA pela ftalocianina.....	74
4.4 Supressão da fluorescência da BSA pela quitosana.....	76
4.5 Filmes LBL de quitosana/BSA em substratos sólidos.....	77
4.6 – EFEITO DO PH SOBRE OS FILMES DE PAH/BSA.....	80
4.7 Estudo da fluorescência dos filmes de PAH/BSA.....	83
4.8 Estudo da interação de BSA e nanopartículas de ouro.....	87
4.8.1 Síntese de nanopartículas de ouro reduzida por resíduo de triptofano.....	87
4.8.2 Nanopartículas de ouro reduzida e estabilizadas por quitosana.....	104
4.8.3 Interação da NpAu-quitosana com BSA.....	106
4.8.4 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro estabilizadas por SDS.....	94
4.8.5 Nanopartículas de ouro sintetizada e estabilizada com sacarose.....	97
4.8.6 Interação de BSA com NpAu-sacarose.....	99

5-CONCLUSÕES.....	102
-------------------	-----

6 REFERÊNCIAS.....	118
--------------------	-----

Resumo

A interface formada por materiais biológicos e materiais sintéticos tem grande importância em aplicações biomédicas, tais como o desenvolvimento de biomateriais para implantes médicos, que tem como processo essencial a deposição de proteínas na superfície dos biomateriais, e ainda não é bem compreendido no nível molecular. Algumas proteínas sofrem mudanças conformacionais após a adsorção na interface sólido-líquido, afetando suas funções ou propriedades, e algumas técnicas podem medir mudanças conformacionais em interfaces sólido. É possível estudar a fluorescência intrínseca de proteínas: a posição do máximo na faixa espectral da fluorescência, a eficiência quântica e o tempo de vida de fluorescência são indicadores de mudanças no ambiente local de grupos de moléculas de proteína fluorescente. Por outro lado, Nanopartículas de ouro têm atraído muita atenção pela sua afinidade com materiais biológicos e suas propriedades ópticas. Nesta tese, estudamos a viabilidade de substratos de vidro, quartzo, mica e ITO (óxido de índio e estanho) modificado com quitosana, phtalocyanines (Ni, Fe e Ni) e poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) na adsorção de BSA em forma dos filmes produzidos pela técnica camada por camada. O sistema foi estudado por UV-Vis e espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo. A caracterização morfológica dos filmes foi realizada por microscopia de força atômica e microscopia óptica. Os resultados mostram que os filmes de BSA / HAP cresceram com eficiência quatro vezes maior do que os filmes feitos de quitosana, que o quartzo tem a melhor janela de trabalho de UV-vis e há uma relação entre o pH da BSA e o tempo vida de fluorescência do filme resultante. As nanopartículas de ouro foram produzidas pela redução química e estabilizada por quatro diferentes métodos. O crescimento das nanopartículas foi monitorado por UV-vis spectroscopy. A carga de superfície das nanopartículas e da BSA foi estimado em vários valores de pH por medidas de potencial zeta. Os resultados indicaram que as nanopartículas têm cargas negativas na faixa de pH estudada. Soluções de BSA foram preparadas em diferentes valores de pH, e levadas para interagir com as nanopartículas de ouro. Os dados de supressão de fluorescência da BSA mostraram uma maior afinidade da

BSA com nanopartículas estabilizadas com sacarose, com pH próximo do ponto isoelétrico (IP) estimado para BSA.

Abstract

The interface formed by biological materials and synthetic materials has great importance in biomedical applications such as the development of biomaterials for medical implants, which has as an essential process of protein adsorption on the surface of biomaterials, and is not yet well understood in the molecular level. Some proteins undergo conformational changes after adsorption at solid-liquid interfaces, affecting their functions or properties, and few techniques can measure conformational changes in solid interfaces. It is possible to study the intrinsic fluorescence of proteins: the position of the maximum in the spectral range of fluorescence, the quantum efficiency and lifetime of fluorescence are indicators of change in the local environment of fluorescent groups of protein molecules. On the other hand, gold nanoparticles have attracted much attention for its affinity with biological materials and their optical properties. In this thesis we study the feasibility of glass substrates, quartz, mica and ITO (Indium tin oxide) modified with chitosan, phthalocyanines (Ni, Fe and Ni) and poly (allylamine hydrochloride) (PAH) on the adsorption of BSA in the form of films produced by the layer by layer technique. The system was studied by UV-Vis and static and time-resolved fluorescence spectroscopy. Morphological characterization of the films was performed by atomic force microscopy and optical microscopy. The results indicate that the films of BSA/PAH grew with efficiency four times greater than the films made of chitosan, that the quartz has the best working window for UV-vis and there is a relationship between the pH of the BSA and lifetime of fluorescence of the resulting film. Gold nanoparticles were produced by chemical reduction and stabilized by four different methods. The growth of nanoparticles was monitored by UV-vis spectroscopy. The surface charge of nanoparticles and the BSA was estimated at various pH values by zeta potential measurements. The results indicated that the nanoparticles have negative charges in the pH range studied. BSA solutions were prepared at various pH values, were taken to interact with gold nanoparticles. Fluorescence quenching data of BSA showed a greater affinity of the BSA

with nanoparticles stabilized with sucrose, at pH near the isoelectric point (IEP) estimated for BSA.

Índice de figuras

FIGURA 1- ISOMERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DA BSA. PH 4,3- TRANSIÇÃO DA FORMA NORMAL (N) PARA A FORMA FAST (F); PH 2,7- TRANSIÇÃO DA FORMA F PARA A FORMA ESTENDIDA (E).....	21
FIGURA 2 - MODELO DE PREENCHIMENTO ESPACIAL DA MOLÉCULA DE ALBUMINA DO SORO COM RESÍDUOS BÁSICOS COLORIDOS EM AZUL, RESÍDUOS ÁCIDOS EM VERMELHO E RESÍDUOS NEUTROS EM AMARELO. (A) VISTA FRONTAL, (B) VISTA TRASEIRA, (C) LADO ESQUERDO E (D) LADO DIREITO. FIGURA RETIRADA DA REFERÊNCIA.	23
FIGURA 3- DIAGRAMA DE JABLONSKI[51].....	39
FIGURA 4 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS ÚNICOS.	74
FIGURA 5- ESTRUTURA MOLECULAR DA QUITOSANA, POLI(HIDROCLORETO DE ALILAMINA)-PAH E FTALOCIANINAS.	77
FIGURA 6- ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS FTALOCIANINAS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EM SOLUÇÃO AQUOSA. FTALOCIANINA DE COBRE; B) FTALOCIANINA DE NÍQUEL; C) FTALOCIANINA DE FERRO. AS MEDIDAS FORAM REALIZADAS COM AS CONCENTRAÇÕES VARIANDO DE 45 A 640 μ M, COM ALÍQUOTAS DE 85 μ M.	78
FIGURA 7- – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DOS POLIELETRÓLITOS E DOS SUBSTRATOS ESTUDADOS.....	79
FIGURA 8- GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FTALOCIANINAS DE COBRE, NÍQUEL E FERRO; TODAS EM SOLUÇÃO AQUOSA.	80
FIGURA 9 – ABSORBÂNCIA DAS PRIMEIRAS 24 BICAMADAS DE QUITOSANA-FTALOCIANINAS DE CU, NI E FE SOBRE VIDRO,	82
FIGURA 10 -AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA QUITOSANA, EM SOLUÇÃO, OBSERVADO NA MESMA REGIÃO DO ESPECTRO EM QUE OCORRE ABSORÇÃO PELAS FTALOCIANINAS.....	83
FIGURA 11- IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DOS FILMES DE QUITOSANA/FTALOCIANINAS DE FE, NÍ E CU. A COLUNA DIREITA É UMA AMPLIAÇÃO DA COLUNA ESQUERDA.....	84
FIGURA 12- ABSORBÂNCIAS DAS PRIMEIRAS 24 BICAMADAS DOS FILMES DE QUITOSANA/NI-FTALOCIANINA DEPOSITADOS SOBRE SUBSTRATOS DE MICA, ITO, QUARTZO E VIDRO, NA COLUNA ESQUERDA. NA COLUNA DIREITA, É MOSTRADA A VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA.....	85
FIGURA 13- COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE ABSORBÂNCIA DAS PRIMEIRAS 10 BICAMADAS DOS FILMES DE QUITOSANA/ NI-FTALOCIANINA DEPOSITADAS SOBRE MICA, QUARTZO, ITO E VIDRO.....	86
FIGURA 14- MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) DO FILME DE 24 BICAMADAS DE QUITOSANA/NI-FTALOCIANINA FABRICADAS SOBRE SUBSTRATO DE VIDRO. A) AFM NO MÓDULO DE TENSÃO DO FILME;	

B) AFM NO MÓDULO DE FASE; C) AFM NO MÓDULO DE FASE DO PERFIL DO RISCO FEITO PARA A REALIZAÇÃO DA MEDIDA DA ESPESSURA DO FILME; D) DADOS FORNECIDOS PELO EQUIPAMENTO.	87
FIGURA 15- COMPARAÇÃO ENTRE AS ABSORBÂNCIAS DAS BICAMADAS QUITOSANA/NI-FTALOCIANINA E PAH/NI-FTALOCIANINA DEPOSITADAS SOBRE SUBSTRATO DE QUARTZO.....	88
FIGURA 16- ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DA BSA NORMALIZADOS. A AMOSTRA FOI EXCITADA EM 295 NM E LEITURA OBTIDA EM 345 NM.	89
FIGURA 17- CURVA DE STERN-VOLMER DA SUPRESSÃO DA BSA (15 μ M) EM SOLUÇÃO AQUOSA (ÁGUA MILLIL-Q), USANDO NI-FTALOCIANINA COMO SUPRESSOR. A AMOSTRA FOI EXCITADA EM 295 NM E A LEITURA OBTIDA EM 345 NM.	91
FIGURA 18- CURVA DE STERN-VOLMER DA SUPRESSÃO DA BSA (15 μ M) EM SOLUÇÃO AQUOSA (ÁGUA MILLI-Q), USANDO QUITOSANA COMO SUPRESSOR. AS AMOSTRAS FORAM EXCITADAS EM 295 NM E A LEITURA OBTIDA EM 345 NM.	92
FIGURA 19- ABSORBÂNCIA DAS BICAMADAS DO FILME QUITOSANA/BSA FABRICADO SOBRE OITO BICAMADAS DE QUITOSANA/NI-FTALOCIANINA DEPOSITADAS SOBRE SUBSTRATO DE VIDRO.....	93
FIGURA 20- ABSORBÂNCIA DAS BICAMADAS DO FILME QUITOSANA/BSA FABRICADO SOBRE SUBSTRATOS DE QUARTZO E MICA.....	94
FIGURA 21- MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA PARA A DETERMINAÇÃO DO PI DA BSA.....	95
FIGURA 22- ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS FILMES DE PAH/BSA DEPOSITADOS SOBRE QUARTZO (COLUNA ESQUERDA). NA COLUNA DIRETA ESTÃO AS ABSORBÂNCIAS DAS MEDIDAS OBTIDAS EM 190 E 200 NM.	96
FIGURA 23- ABSORBÂNCIAS COM O NÚMERO DE BICAMADAS DOS FILMES DE PAH/ BSA OBTIDAS EM 276 NM.	97
FIGURA 24- CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO PAH SOBRE SUBSTRATO DE QUARTZO.	97
FIGURA 25- A) INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA DA BSA EM SOLUÇÕES TAMPÕES DE DIFERENTES VALORES DE PH. AS LEITURAS FORAM FEITAS EM 345 NM. B) ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA BSA EM ALGUNS VALORES DE PH.	98
FIGURA 26 A) ESPECTRO DE EMISSÃO DOS FILMES FABRICADOS COM BSA EM VALORES DE PH 3,4, 5,6 E 8,0; B) PERFIL DE DECAIMENTO DO TRIPTOFANO PRESENTE NOS FILMES.	99
FIGURA 27- ABSORBÂNCIAS E INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA DAS MONOCAMADAS DE PAH E BSA (PH = 5,6) DEPOSITADAS CONSECUTIVAMENTE SOBRE SUBSTRATO DE QUARTZO.	101
FIGURA 28- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO REDUZIDAS POR RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO.....	104
FIGURA 29 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS NPAU ESTABILIZADAS POR QUITOSANA.....	105
FIGURA 30 ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DAS NPAU-QUITOSANA.....	106
FIGURA 31- ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA BSA (λ_{EX} = 280 NM), QUITOSANA (λ_{EX} = 316 NM), NPAU-QUITOSANA (λ_{EX} = 316 NM), E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS NPAU-QUITOSANA.....	107
FIGURA 32- SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA BSA POR NPAU-QUITOSANA.	107
FIGURA 33- ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA SOLUÇÃO DE NPAU-QUITOSANA EM FUNÇÃO DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.	108

FIGURA 34- DEPENDÊNCIA DA MÁXIMA FLUORESCÊNCIA COM A REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.	108
FIGURA 35- A) ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA NANOPARTÍCULAS OBTIDAS EM DIFERENTES VALORES DE PH. B) CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE PH DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS E OS VALORES DE PH DA SOLUÇÃO APÓS A FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.	110
FIGURA 36- CINÉTICA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS POR SDS EM ALGUNS VALORES DE PH.	110
FIGURA 37- SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA BSA COM H ₂ O ₂	111
FIGURA 38- SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA BSA COM H ₂ O ₂	113
FIGURA 39- A) DADOS DE ESPALHAMENTO DE LUZ. B) DADOS DO POTENCIAL ZETA DAS NPAU-SACAROSE. ...	113
FIGURA 40- A) ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA BSA EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE NPAU-SACAROSE. B) GRÁFICO DE STERN-VOLMER EQUIVALENTE.....	115
FIGURA 41- COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DO PH SOBRE OS K _{Ap} OBTIDOS PARA NPAU-SACAROSE E COM SOLUÇÃO PRECURSORA.....	116

1. Introdução

1.1 Proteínas e substratos sintéticos

Interfaces de proteínas e materiais são de grande interesse em medicina e biologia, por exemplo nos campos bioimplantes e biossensores [1-4]. A adsorção de proteínas em superfícies de implantes médicos é um aspecto essencial da cascata de reações biológicas que acontecem na interface entre materiais sintéticos e o ambiente biológico. Os tipos e as quantidades de proteínas mediam a adesão subsequente, proliferação e diferenciação de células assim como a deposição de mineral. Por isso, a natureza deste processo de adsorção é de grande interesse para melhor compreender a biointegração de materiais para implantes com o objetivo de, a longo prazo, sintetizar materiais completamente biocompatíveis ou, num caso ideal, materiais verdadeiramente bioativos para substituir os materiais atuais. Isto traria a vantagem de melhorar a recuperação dos pacientes e, conseqüentemente, a qualidade de vida, um assunto de grandes interesses acadêmicos e industriais nos últimos anos, dado o envelhecimento da população [5-8]. Para sintetizar materiais completamente biocompatíveis, entretanto, é necessário mais entendimento dos aspectos fundamentais da adsorção de proteínas. Enquanto óxidos metálicos são diretamente usados para aplicações nas quais sua dureza extrema é necessária (substituição da cabeça femural), a maioria dos biomateriais metálicos é coberto por uma proteção, filmes óxidos estáveis tais como óxido de titânio sobre titânio. Nestes casos, as proteínas interagem somente com o filme óxido e não com o material recoberto.

Poderia ser questionado a importância de se estudar o processo de adsorção de proteína em detrimento da adsorção de célula ou tecidos sobre óxidos, mas foi mostrado que células de osso podem se aderir e se proliferar somente sobre superfícies nas quais, antes da adesão celular, a adsorção de proteínas tivesse acontecido [9]. O primeiro processo que ocorre, quando superfícies de materiais são expostas a sistemas biológicos, é a adsorção de proteína dentro de 20-30 minutos. Após o “tapete de proteína” cobrir a superfície dos materiais, as células podem se aderir e proliferar sobre a camada de proteína, em 1-24 horas. Não somente a quantidade de proteína adsorvida, mas também a conformação das proteínas é importante para a proliferação [8, 10, 11]. Uma mudança da estrutura da proteína pode estorvar os receptores celulares, situados dentro da membrana celular, para reconhecer uma função protéica específica. Como consequência, sobre proteínas com formas intensamente deformadas, as células não se aderirão, e nem proliferarão sobre o tapete de proteína. A célula não aceita as proteínas adsorvidas como se fossem proteínas do próprio corpo, ao invés disso, as vê como intrusas. Este erro fatal cometido pela célula é considerado como uma das razões que promovem a inflamação e mutações de tecidos [12].

As propriedades dos materiais para implantes são vitais para adsorção de proteína, os quais são, em muitos casos, óxidos e a investigação da interface proteína/óxido é de grande interesse. Entretanto, a adsorção de proteína não é desejada em todos os lugares, e em muitas aplicações biomédicas a adsorção de proteína é inevitável, por exemplo, em bombas de sangue ou em recipientes de sangue, e ainda em lentes de contato. Nestes casos, a adsorção de proteína pode, até certo ponto, ser evitada usando, por exemplo, coberturas de *Poly-L-Lysin-Polyetienoglicol* (PLL-PEG) [13, 14] ou outro surfactante [15] cuja superfície do material seja resistente a adsorção de proteína.

Num âmbito geral, no campo de biossensores, há interesse na imobilização de enzimas sobre materiais hidrofílicos, onde elas operam como catalisadores biosseletivos para a quebra

de biomoléculas específicas. A alta atividade enzimática é desejável para alcançar uma alta taxa de resposta e as moléculas quebradas podem ser detectadas, por exemplo, por métodos fotométricos. Os métodos utilizados para se estudar a proteína em interfaces consideram duas faces principais do problema: a quantidade e o tipo de proteína adsorvida, e o que acontece com a estrutura no estado adsorvido. O primeiro problema pode ser abordado convenientemente estudando a isoterma de adsorção de uma ou mais proteínas sobre um substrato bem conhecido. Experimentalmente, isto é encarado como um problema familiar na química da superfície: o de fornecer uma área superficial suficientemente grande ou que adsorvam uma quantidade mensurável de proteína, ou encontrar métodos sensíveis ou uma sonda radioativa que permita o estudo de proteína sobre áreas superficiais relativamente pequenas.

Outro método para detectar a quantidade de proteína adsorvida é a elipsometria [16]. Por esta técnica, a quantidade de proteína adsorvida é medida pela espessura da camada refratante. A técnica só é bem precisa para superfícies lisas e refletoras e tudo o que fornece é apenas informações limitadas sobre a estrutura da proteína adsorvida. Outra técnica, baseada no dicroísmo circular (DC) de superfície, pode fornecer evidências diretas da estrutura da proteína adsorvida sobre um substrato, porém ela só pode ser aplicada a substratos transparentes, rugosos, que não absorvam fortemente na região do UV, opticamente ativo e que a proteína esteja depositada na forma de filme fino [17, 18].

Para superar dificuldades como essas, tem-se explorado a aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência [19, 20]. A vantagem potencial desta técnica é a alta sensibilidade a mudanças no ambiente e na estrutura das proteínas, incluindo aquela de membranas celulares [21]. Além disso, como a fluorescência da maioria das proteínas ocorre na região de 340 nm e nenhum substrato, potencialmente útil, emite fluorescência neste comprimento de onda, a interferência do substrato é mínima; a menos que o substrato absorva

na região de absorção da proteína (~280 nm) ou na região de emissão que depende de cada proteína.

A técnica LBL (*Layer by Layer*) tem surgido como uma técnica prática, barata e eficiente na fabricação de filmes automontados de proteínas, utilizando-se principalmente do princípio de atração eletrostática entre seus componentes resultando em estruturas nas quais monocamadas de proteínas ficam inseridas alternadamente entre filmes de polieletrólitos. Por outro lado, com o uso de deposição em partículas coloidais, é possível quantificar parâmetros como cargas superficiais de partículas óxidas, seu potencial zeta, tamanho da partícula e utilizar a vantagem da alta área superficial para medidas de atividades enzimáticas. As proteínas e as partículas oxidas são carregadas em soluções aquosas, e suas primeiras interações são governadas pelas interações eletrostáticas. Assim, os parâmetros dos sistemas que devem ser controlados são o pH, força iônica e temperatura, de acordo com a teoria DLVO [22, 23].

Há porém desvantagens ao se utilizar partículas coloidais para caracterizar interações proteínas/óxidos. Para se caracterizar cuidadosamente sistemas de partículas e medir parâmetros como área específica de superfície ou fases cristalinas presentes, é preciso aplicar técnicas diferentes daquelas para superfícies planas. Adicionalmente, como consequência da redução do tamanho e da dimensionalidade dos materiais, suas propriedades eletrônicas mudam drasticamente. Nanopartículas de ouro (NpAu), por exemplo, exibem excelentes compatibilidades com biomoléculas e algumas propriedades ópticas peculiares, tais como mudança na sua cor após a agregação e a ressonância de plasmons de superfície (SPR), têm sido exploradas em química analítica, biossensores e imunoenaios. Essas propriedades criam um cenário rico e promissor no que se refere à interação de biomoléculas e substratos em geral. Por exemplo, a fluorescência de determinados fluoróforos pode ser aumentada por um fator de 10^1 a 10^3 quando colocados próximo de uma partícula metálica, atribuído ao

acoplamento da energia emitida pelo fluoróforo com a ressonância de plasmon do metal. Apesar das evidências experimentais, o completo entendimento do mecanismo que leva ao aumento da fluorescência nas proximidades de superfícies e de partículas metálicas ainda não foi alcançado.

Há basicamente dois métodos disponíveis de análise da fluorescência de proteínas adsorvidas. O primeiro método, proposto em 1977 [24], é a espectroscopia de fluorescência por reflexão interna (IRFS) que pode ser aplicada a filmes finos depositados sobre cristais refletivos. Esta técnica envolve medidas da intensidade de fluorescência na área interfacial, mas geralmente exige um fluoróforo intrínseco; o segundo método usa substratos de partículas em solução e mede a quantidade de *quenching* (supressão) de fluorescência, isto é, a redução na intensidade de fluorescência durante a adsorção. Este método utiliza a fluorescência intrínseca da proteína, que pode ser atribuída à combinação da fluorescência dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, presentes na cadeia protéica. Cada técnica possui vantagens e desvantagens. Em geral, é preferível a utilização de técnicas que lidem com fluorescência intrínseca da proteína em filmes de área limitada e de espessura razoável (10 nm). No entanto, com a técnica de espectroscopia de fluorescência também é possível o estudo da fluorescência intrínseca de uma determinada molécula, que é muito sensível a mudanças em sua estrutura terciária. Esta mudança informa sobre o ambiente e a dinâmica local do resíduo de aminoácido fluorescente. A posição do máximo espectral no espectro de fluorescência, o rendimento quântico de fluorescência, e o tempo de vida de fluorescência são indicadores da mudança no ambiente local desses grupos fluorescentes na molécula protéica.

1.1.1 Objetivos do trabalho

No contexto apresentado acima, o principal objetivo desse trabalho foi estudar a interação entre uma proteína particular, a albumina do soro bovino (BSA), e substratos sintéticos. O estudo envolve os aspectos relacionados ao uso destes substratos nas investigações sobre a adsorção de proteínas em biomateriais, analisados principalmente pela técnica de fluorescência estática. Como estratégia, procuramos criar interfaces compostas de biomoléculas fluorescentes (BSA) e substratos sintéticos, tanto na forma de filmes automontados pela técnica de LBL quanto na forma de agregados, sendo estes formados por biomoléculas com moléculas sintéticas, biopolímeros e nanopartículas de ouro. Como técnicas auxiliares, utilizamos a espectroscopia de UV-vis, espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, microscopia ótica, microscopia de força atômica e potencial zeta.

1.2 Albumina do soro bovino (BSA)

A BSA foi empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos. É a proteína mais abundante no sangue bovino (concentração típica de 50 mg/mL) e possui uma estrutura muito similar à estrutura da HSA (*Human Serum Albumin*), apresentando uma percentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76%. O peso molecular é de 66,462 g/mol, de acordo com a literatura [25, 26]. A BSA é uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios. A BSA também pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada [26]. O ponto isoelétrico (PI) da BSA está em torno de 4,70 – 5,60, dependendo da literatura [27-28]. O PI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A BSA é carregada negativamente no pH 7,0 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH entre 4 e 8 [26] (Fig.1).

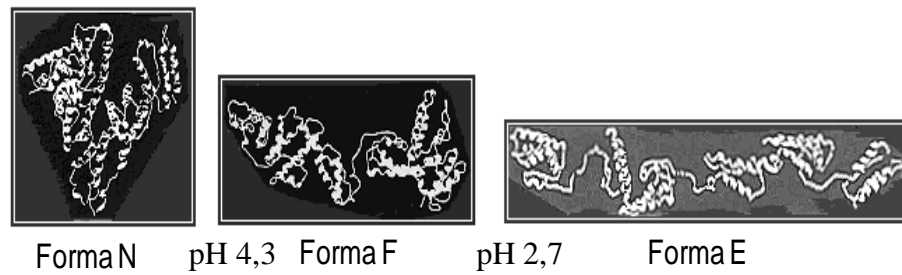


Figura 1- Isomerização conformacional da BSA. pH 4,3- transição da forma normal (N) para a forma fast (F); pH 2,7- transição da forma F para a forma estendida (E).

As albuminas são caracterizadas pelo baixo número de triptofano e metionina, alto número de cisteína e aminoácidos carregados, asparina (ácido aspártico) e ácido glutâmico, lisina e arginina.

1.2.1 Propriedades físico-químicas da BSA

A albumina de soro bovino não é carregada uniformemente na sua estrutura primária. Em pH neutro, ela possui uma rede de cargas de -10, -8 e 0 para os seus três domínios I, II, III. A distribuição de carga superficial é mostrada na Figura 2.

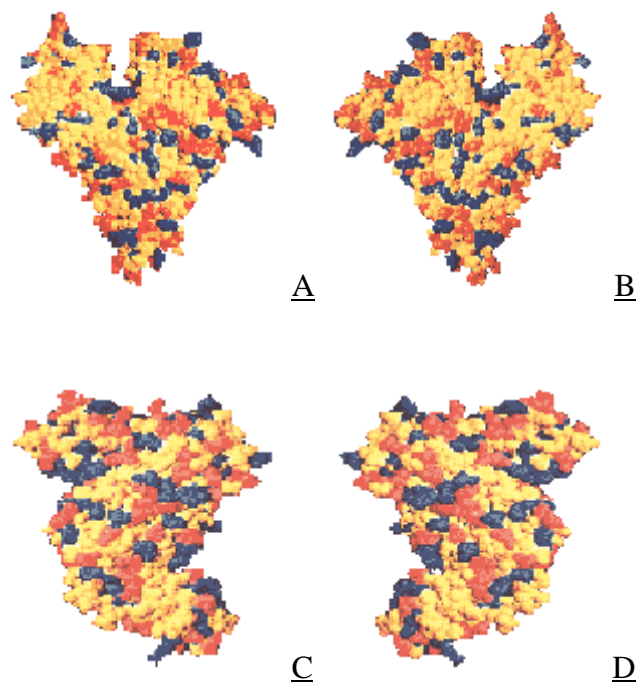


Figura 2 -Modelo de preenchimento espacial da molécula de albumina do soro com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e resíduos neutros em amarelo. (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerdo e (D) lado direito. Figura retirada da referência.

1.2.2 Propriedades funcionais da BSA

A BSA é o principal carregador de ácidos graxos, os quais são, de outra forma, insolúveis no plasma sanguíneo. Ela também realiza muitas outras funções como, eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos lipofílicos tóxicos, como bilirrubina (*bilirubin*) [27]. A albumina tem uma alta afinidade por ácidos graxos, hematinas (*hematin*), bilirrubina, e uma grande afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Ela forma ligações covalentes com fosfato de piridoxil (*Pyridoxyl phosphate*), cisteína, e vários metais, tais como Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II) e Au(I). Como uma proteína de transporte multifuncional, a albumina é o carregador chave ou reservatório de óxido nítrico, o que tem implicado em vários processo fisiológicos importantes, incluindo neurotransmissão [28].

1.3 Métodos de fabricação de nanopartículas de ouro

O campo de pesquisa em nanopartículas tem despertado muita atenção nas últimas décadas [29-33]. Como consequência da redução do tamanho de um material a escalas nanométricas, suas propriedades eletrônicas mudam drasticamente com a densidade de estados [34-38]. Os autoestados de energia são agora determinados pelos contornos do sistema, e por isso, os efeitos de superfície se tornam muito importantes [34-37, 39]. Uma transição da estrutura de banda do sólido para níveis de energia ocorre em *clusters* de tamanho subnanométrico a nanométrico, e a detecção de efeitos quânticos causados pela redução de tamanho tem sido de grande interesse para pesquisa de novos materiais com novas e curiosas propriedades [37, 40-42]. Possíveis aplicações futuras de nanopartículas incluem as áreas de comunicação ultrarrápida de dados e armazenamento óptico de dados [39], conversão de energia solar, e o uso de nanopartículas metálicas como catalisadores, por causa de sua alta razão superfície/volume.

As nanopartículas metálicas têm fascinado os cientistas por causa de suas coloridas soluções coloidais muito antes dos semicondutores e suas aplicações terem se tornado parte integrante da tecnologia moderna. A utilização de nanopartículas de ouro como pigmento de vitrais vermelho-rubi remonta ao século XVII [43]. Faraday percebeu que a cor vermelha é atribuída ao ouro metálico em forma coloidal [44], e Mie [45] foi o primeiro a explicar teoricamente esse fenômeno em 1908, ao resolver as equações de Maxwell para a absorção e espalhamento da radiação eletromagnética por partículas esféricas. Esta teoria proporcionou uma vasta aplicabilidade desde então por permitir o cálculo do espectro de absorção de uma determinada partícula, desde que a função dielétrica do material seja conhecida e o tamanho seja menor do que o comprimento de onda da luz [46-48].

A origem física da absorção de luz pelas nanopartículas metálicas está na oscilação coerente dos elétrons da banda de condução induzida pelo campo eletromagnético interagente [49]. Essa ressonância é também conhecida como ressonância de plasmons de superfície (da sigla inglesa SPR) que é, na verdade, um efeito de partículas pequenas, já que ele não existe nos átomos individuais, assim como no sólido [49]. Entretanto, o fato da ressonância de plasmons de superfície depender do tamanho da partícula não é tão facilmente explicado quanto é no caso de partículas semicondutoras [49], onde um deslocamento no HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e no LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) resulta num “gap” de banda mais larga e no deslocamento do início da absorção para o azul devido à redução do tamanho.

Nanopartículas de ouro exibem excelente compatibilidade com biomoléculas [50-53], além de suas propriedades únicas [48, 50, 54]. As duas características mais populares (a mudança de cor após a agregação e a ressonância de plasmons de superfície) têm sido exploradas em química analítica e imunoenaios entre outros [55-57]. Entretanto, a preparação de NpAu monodispersas com propriedades eletrônica, óptica e química otimizadas é um tarefa formidável ainda a ser desenvolvida. Vários métodos têm sido desenvolvidos visando alcançar este objetivo: (i) preparação de NpAu com tamanho e forma controlados [58]; (ii) modificação da estrutura da superfície da nanopartícula com moléculas orgânicas e/ou biomoléculas [51]; (iii) formação de compósitos nanoestruturados, isto é, estrutura núcleo-casca [57] e (iv) automontagem ou organização de nanopartículas em arquiteturas 2D ou 3D [59, 60].

Métodos físicos, químicos e eletroquímicos têm sido desenvolvidos e otimizados para a preparação de NpAu. Alguns métodos químicos bastante utilizados têm em comum a utilização do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) ou outros precursores como KAuCl_4 . Entretanto, eles são distintos com relação a vários aspectos envolvidos no processo de

fabricação das nanopartículas, tais como a utilização de agentes redutores ou redução fotoquímica por irradiação UV, sequência da adição dos reagentes e condições de operação, tais como concentração e temperatura [50], meio do crescimento, estabilizadores e utilização ou não de templates. Nos últimos anos, tem havido um crescimento exponencial na preparação de NpAu com propriedades óptica e eletrônica melhoradas, assim como reatividades. A seguir, discutiremos sobre alguns dos principais trabalhos realizados na fabricação de nanopartículas com as mais diversas finalidades.

1.3.1 Nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes

Nanopartículas instáveis devem ser estabilizadas por surfactantes, polímeros, alcanotióis e ácidos orgânicos [50, 61]. Intensa pesquisa tem sido realizada visando a preparação de nanopartículas metálicas com composição, forma e tamanho controlados, porque suas propriedades ópticas e elétricas dependem de tais parâmetros. Nos métodos químicos, o tamanho das nanopartículas é governado principalmente pelo número de núcleos icosaédricos formados no início da redução do sal de ouro, se comparado com a subsequente taxa de crescimento do núcleo [50]. Normalmente, moléculas que podem se ligar às nanopartículas de Au podem rapidamente e efetivamente bloquear a superfície dos *nanoclusters* recém formados, impedindo, assim, o seu crescimento subsequente. Conseqüentemente, a utilização de moléculas de tióis utilizadas como agentes estabilizantes resulta em nanopartículas de ouro muito pequenas [61, 62]. Nanopartículas de ouro estáveis com propriedades eletrônicas notáveis são interessantes aos físicos [61], enquanto os químicos visam as propriedades das monocamadas orgânicas da superfície das nanopartículas de ouro. Porém, é importante que estas sejam estáveis e ainda quimicamente ativas para determinados grupos funcionais

Nanopartículas de Au muito pequenas (0,7-3,2 nm) podem ser preparadas selecionando-se precursores e estabilizadores adequados (Schaaff e Whetten) [63].

Nanopartículas de ouro de tamanho acima de 10 nm, estabilizadas com tióis, não são estáveis. Na verdade, elas são facilmente precipitadas devido a um rápido aumento das forças atrativas de van der Waals em função do tamanho da nanopartícula [64]. Apesar disso, com agentes estabilizadores de grande grupo funcional e sítios de ligação multidentados, nanopartículas de ouro com tamanhos variando de 3 a 20 nm podem ser estabilizadas por vários meses [65, 66]. Uma das vantagens deste surfactante é que ele pode ser substituído por outro ligante [65, 66]. A preparação de nanopartículas de ouro modificadas com fulereno e seus derivados tem sido relatada nos últimos anos. Há vários métodos para ligar o C₆₀ a superfícies de nanopartículas de ouro, incluindo a formação de complexos transferidores de carga formados por Au/(*diphenyltetrathiafulvalene*) DPTTF.C₆₀, com o DPTTF agindo como doador de elétron, e o C₆₀, como aceitador de elétrons [67]; podendo ser usados derivados de C₆₀ que contenham grupos tióis [68, 69] e grupos oligopiridil [70].

Nanopartículas de Au foram modificadas com *cyclodextrins* (DC) pela adição de CD modificado com *perthiolate* em uma solução de ouro (AuCl₄⁻¹) antes de sua redução [71, 72]. O aumento da razão (CD/Au) resulta em produção de nanopartículas menores.

1.3.2 Crescimento de nanopartículas por semente e por template

No crescimento por semente, os íons de ouro (precursor) são reduzidos durante a reação, e se nucleiam na superfície das sementes. Controlando cuidadosamente a razão entre a semente do sal metálico (solução de crescimento) e a velocidade de redução, as nanopartículas variam de 5-40 nm (usando partículas de ouro de 3,7 nm como semente) podendo ser preparada com uma distribuição muito estreita de tamanhos (DP~10-15%) [73].

A irradiação ultravioleta pode proporcionar facilmente a redução controlada do sal de ouro e aumentar o tamanho das nanopartículas, obtendo-se nanopartículas de Au com tamanhos variando de 20 a 80 nm [74].

O método de template consiste em conduzir a reação de redução do sal de ouro limitado a um determinado volume ou espaço, visando controlar o tamanho e a forma das nanopartículas. Os templates podem ser divididos em dois tipos: templates moles (micelas) e templates de sólidos inorgânicos (nanotubos de carbono, sílica porosa e alumina) [75].

1.3.3 Nanopartículas de ouro estabilizadas em polímeros ou em macromoléculas

Comparado com moléculas orgânicas ou inorgânicas, moléculas poliméricas normalmente possuem grandes pesos moleculares, e dobram-se facilmente para formar estruturas tridimensionais. Moléculas poliméricas que possuem grupos funcionais, tais como SH, CN e NH₂ podem proporcionar sítios de ligação com nanopartículas de ouro e impedi-las de se agregarem. Entretanto, um dos problemas da preparação de nanopartículas de ouro distribuídas numa matriz polimérica é saber como evitar a segregação macroscópica entre polímero e fase metálica. Selvan et al.[76] foram os primeiros a sintetizar nanopartículas de ouro dentro de núcleos de micelas de copolímeros. Os íons AuCl₄⁻¹ foram ligados ao núcleo de uma micela como contra-íon do grupo piridina protonado [76].

Polímeros lineares detentores de grupos funcionais como ciano (-CN) e mercapto (-SH), que podem se ligar a nanopartículas de ouro, foram os primeiros utilizados na fabricação de nanopartículas de ouro [77]. Nanopartículas de ouro (tamanho médio < 2 nm) foram obtidas utilizando-se uma alta razão polímero/Au. Wuelfing et al.[78] e Ostuka et al.[79] relataram que derivados de *poly (ethylene glycol)* (PEG), contendo grupos mercapto ou

tiol (R-S-H) e acetal (toda molécula que apresenta o átomo de carbono ligado a dois átomos de oxigênio, por meio de ligação covalente simples e que, por sua vez, estejam presos a radicais arila ou alquila), comparado aos alcanotióis, podem melhorar significativamente a estabilidade das nanopartículas de ouro em razão dos efeitos de repulsão estérica das ramificações entrelaçadas do PEG, especialmente sob meios salinos concentrados, e induzir a solubilidade em meios aquosos. Dai et al. [80] mostraram que, usando *o*-anisidina como agente redutor, podiam produzir nanopartículas de ouro muito pequenas em fases orgânica e aquosa. Durante a reação, a polimerização do *o*-anisidina em poli(*o*-anisidina) ocorre, formando micelas e lipossomos de *o*-anisidina, fator chave para o controle do tamanho das nanopartículas de ouro.

Dendrímeros representam uma nova classe de macromoléculas caracterizadas pela estrutura ramificada em forma de árvore. Esta nova estratégia consiste em utilizar moléculas dendriméricas que contenham grupos amino para proteger as nanopartículas de ouro. Inicialmente foi sugerido que o tamanho das nanopartículas diminuiriam com o aumento da geração do dendrímero, assim como sua concentração [81]. Entretanto, Esumi et al. [82] contestaram que o tamanho das nanopartículas de ouro não seria dependente da geração do dendrímero. Os mecanismos de proteção das moléculas dendriméricas se diferem em baixas e altas gerações. Nanopartículas de ouro são circundadas por moléculas dendriméricas de baixa geração, mas são encapsuladas pelas moléculas dendriméricas de alta geração [81]. Frankamp et al. [83] verificaram um controle direto sobre o espaçamento interpartícula (Au) usando o dendrímero (poly(amidoamine)-PAMAM) como agente encapsolador, e mostraram por medidas SAXS que o espaçamento interpartículas entre nanopartículas de ouro é dependente da geração do dendrímero.

1.3.4 Síntese de colóides de ouro em duas fases

A primeira síntese de nanopartículas de ouro em duas fases foi realizada por Brust et al. [62] usando brometo de tetraoctilamônio ($C_{32}H_{68}BrN$) como agente transferidor de fase para transferir $AuCl_4^-$ para o tolueno (fase orgânica que contém alcanotiol). Após a adição do agente redutor aquoso (boro hidratado de sódio), $AuCl_4^-$ foi reduzido, e os *clusters* de ouro foram capturados imediatamente pelos alcanotóis. Para esse método, eles conseguiram colóides de ouro com tamanhos muito pequenos (1-3 nm) e estreita distribuição de tamanhos. Nos últimos anos, o sistema de duas fases tem sido estendido a outras fases orgânicas ou a outros agentes encapsuladores. Usando hexanos [84] e clorofórmio [85] como fases orgânicas, ou usando polioctiltiofeno (POT) como agente encapsulador [86], colóides de ouro com diâmetros de 2,6; 6,4 e 4-7 nm foram obtidos, respectivamente. Outros estudos relacionados podem ser obtidos da literatura [87, 88].

Outro método existente é a preparação de colóides de ouro em fase aquosa seguida pela transferência de fase para uma fase orgânica (tolueno) mediante a coordenação mediada por ácido [89]; ou usando surfactante catiônico, octadecilamina (ODA) [90]. Os colóides podem ser separados na forma de um pó pela evaporação do solvente orgânico e redispersos em diferentes solventes. Um inconveniente na utilização de surfactantes na síntese por duas fases é a possibilidade de o surfactante cobrir a superfície das nanopartículas de ouro com uma segunda camada. Yee et al. [91] resolveram tal problema utilizando *tetrahidrofurano* (THF) como solvente na síntese, conseguindo, assim, um processo de síntese em apenas uma fase, evitando o uso de surfactantes, pois o agente redutor se dissolve em THF.

1.3.5 Preparação de nanopartículas de ouro em formas controladas

O primeiro método elétrico para preparar nanobastões de ouro foi descrito por Yu et. al. [92] introduzindo um reagente indutor de forma (tetraoctilamônio) numa célula eletroquímica contendo surfactantes catiônicos (hexadeciltrimetilamônio-CTAB), que agiu tanto como eletrólito suporte quanto como principal constituinte da estrutura micelar. A razão média entre o aspecto de nanobastões e de nanoesfera de ouro pode ser ajustado experimentalmente, obtendo-se um valor de 1 a 4, apesar de ainda não haver um claro e detalhado mecanismo de formação. Irradiando os nanobastões de ouro em 512 e 1064 nm, que correspondem aproximadamente às ressonâncias de plasmons dos eixos curtos e longos dos nanobastões, respectivamente, promoveu-se a conversão de nanobastão em nanoesfera de Au [93]. Outro método muito eficiente, que pode preparar nanobastão de ouro com razões de aspecto variando de 1 a 7, é a combinação dos métodos de *crescimento por semente* e *por template* (micela como template) [94, 95]. Aditivos tais como AgNO_3 e ciclohexano exercem influência na formação de nanobastão. A razão de aspecto R (definida como a razão entre o comprimento do nanorodo e a largura do nanorodo de nanobastão) das nanopartículas pode ser prontamente controlada variando-se a razão entre a concentração de semente e a solução de sal metálico [96]. Por intermédio de procedimentos experimentais melhorados é possível obter R de nanobastão de até 18 [97].

O controle sobre a forma das nanopartículas, mediante a utilização de agentes encapsulantes, é atribuído à interação específica do agente encapsulante com diferentes fases de crescimento das partículas [97-99] e ao efeito de template das micelas, que podem limitar reação de redução do precursor do ouro num espaço limitado.

Com ácido salicílico como agente redutor pode-se obter nanopartículas de ouro com formas triangular/hexagonal [100]. Essas nanopartículas com formas especiais exibem uma

forte absorbância em 860 nm no espectro UV-vis. A irradiação ultravioleta (UV) é uma imprescindível técnica para a redução controlada do sal de ouro. Na presença de surfactantes adequados, a irradiação UV tem evoluído satisfatoriamente para um método de crescimento de nanoestruturas de ouro com formas controladas. Usando *1,2-bis(dodecyldimethylammonio) ethane dichloride* como template, Esumi et al. [101] prepararam fibras de ouro maiores do que 10 µm com micelas em forma de fios agindo como templates na síntese. Concentrações maiores de H_{Au}ClO₄ e irradiação UV mais prolongada favorecem a formação de fibras de ouro. A melhor maneira de se controlar a forma das nanoestruturas de ouro pode ser obtida usando álcool de polivinil (PVA) ou polietilenoglicol (PEG) como agente encapsulante juntamente com baixa irradiação UV [102]. Os fatores que influenciam a forma incluem a concentração de polímeros e de íons de ouro, tempo de irradiação e o tipo de polímeros.

Em métodos físicos, o crescimento de microfios de Au foi obtido por *sputtering* de ouro sobre um substrato de silício poroso, no qual os poros agem como template. Nanofios de ouro com diâmetros de 900 nm e comprimento de 80 µm foram obtidos [103-105].

1.3.6 Nanopartículas de ouro preparadas por ablação a laser

O método de ablação a laser de nanopartículas metálicas em solução foi inicialmente desenvolvido por Henglein et al. [34, 106] pela imersão de alvos metálicos. Para se obter as nanopartículas metálicas estabilizadas, geralmente algum tipo de molécula encapsulante é adicionado na solução para evitar a agregação das nanopartículas. Usando dodecil sulfato de sódio (SDS) como agente encapsulante, Kondow et al. [107] prepararam nanopartículas de ouro com tamanhos variando de 1,7 a 5,5 nm. O tamanho médio das nanopartículas de ouro é dependente da concentração de SDS e da energia do laser. Segundo Mafune et al. [108-110], provavelmente as micelas de SDS sejam formadas em solução, pois a concentração de SDS

deve ser maior do que uma concentração micelar crítica (CMC), para se obter uma redução significativa de tamanho. A alta intensidade do laser também é útil na redução do tamanho das nanopartículas. Quanto maior a intensidade do laser, menor o tamanho das nanopartículas. O modelo da dinâmica de formação das nanopartículas [108-110], sugere que durante a ablação a laser, partículas embrionárias sejam formadas muito rapidamente, seguida por um lento processo de crescimento que cessa com o encapsulamento das partículas pelo surfactante. A mais notável descoberta desse método é o efeito da irradiação do laser sobre as nanopartículas encapsuladas. Como observado por Kamat et al. [111] sob irradiação a laser, as nanopartículas primeiro sofrem um processo de fusão no qual os agregados de ouro são transformados em grandes partículas esféricas. Após um tempo maior de irradiação, as partículas fundidas quebram-se novamente em partículas menores, seguido por uma mudança de cor da solução, mudando do azul para o vermelho-rubi.

1.3.7 Organização de nanoestruturas de ouro em arquiteturas macroscópicas

A ordenação em múltiplas escalas de materiais nanoescalados é importante para aplicação de sistemas moleculares em dispositivos macroscópicos [112, 113]. A estratégia “tijolo-argamassa” para a organização de nanoestruturas de ouro em arquiteturas em escalas maiores normalmente emprega três tipos de moléculas “argamassas”: alcanotióis, polímeros, e biomoléculas. Aqui nos ateremos apenas às biomoléculas, que fazem parte do escopo deste trabalho.

As biomoléculas possuem habilidade de reconhecer (de maneira muito específica) o seu alvo correspondente, tais como as cadeias de DNA, que reconhecem suas cadeias complementares, e anticorpos, que reconhecem seus antígenos. As sequências de hibridização, que são muito específicas, existentes entre os ramos de DNA e seus

correspondentes alvos complementares podem ser usadas para organizar as nanoestruturas de ouro em estruturas estendidas preconcebidas. Inversamente, a mudança de cor devida à agregação das nanopartículas de ouro na reação de hibridização das cadeias de nucleotídeos tem sido empregada no reconhecimento de alvos complementares específicos. Mirkin et al. [59] demonstraram a viabilidade de se utilizar moléculas de DNA como “argamassa” para organizar nanopartículas de ouro em materiais macroscópicos, de modo que as partículas de ouro podem se reorganizar em estruturas 2D e 3D. As nanopartículas de ouro podem ser reversivamente montadas, alternando-se a temperatura para acima e abaixo do ponto de fusão do DNA.

Um estudo detalhado [114] sobre as propriedades ópticas de arranjos de nanopartículas ligadas a DNA revela que o crescimento dos agregados obedece o mecanismo “amadurecimento de Ostwald”, segundo o qual os agregados maiores crescem consumindo os agregados menores. As propriedades ópticas desse arranjo de nanopartículas ligadas a DNA são governadas significativamente pelo tamanho do agregado, independentemente do tamanho do oligonucleotídeo ligante. Outro método consiste em utilizar um substrato protéico que se ligue à estrutura de ouro modificada. Comparado a outras estratégias correspondentes, a conjugação baseada em proteínas oferece algumas vantagens adicionais como, por exemplo, o fato de muitas dessas estratégias serem procedimentos padrão na bioquímica e na imunologia molecular [51].

Niemeyer et al.[115] descreveram um novo método no qual se utilizou DNA/estreptavidina covalentemente conjugados como blocos de nanoestruturas biometálicas. Dessa forma, os conjugados podem ser usados como adaptadores biomoleculares para posicionar os componentes biotinizados ao longo de uma estrutura de ácido nucléico. No entanto, eles não conseguiram controlar o tamanho dos agregados. Esse problema foi resolvido por Cobbe et al. [116] usando uma montagem de nanopartículas de ouro modificada

por proteína e controlada por DNA. O tamanho dos agregados pode ser controlado pela adição de ramos simples de DNA que sejam complementares a um dos dois conjuntos de ramos do DNA presentes no conjugado DNA/estreptavidina, o que resulta num rápido processo de montagem [116]. As moléculas utilizadas na preparação de monocamadas de nanopartículas de ouro podem ser alcanotióis [117], organosilanos que contenham grupos CN, NH₂, 2-piridil, P (C₆H₅)₂ e SH [118] ou polímeros como Poly(allylamine hydrochloride (PAH) [30, 119].

2 Fundamentos teóricos

2.1 A técnica LBL

A modificação de superfície pela deposição de filmes nanométricos de proteína constitui um dos maiores objetivos da bioquímica e biotecnologia. Tal nanoconstrução também cria uma nova fronteira entre materiais e a ciência da vida. Assim, camadas de proteínas organizadas, desempenham um papel significativo em estudos biologicamente relacionados [120, 121]. Nesse aspecto, um conceito relativamente novo de arranjo camada por camada, chamado de *Layer-by-Layer* (LBL) foi desenvolvido recentemente para fabricar multicamadas pela adsorção alternada de proteínas carregadas, polieletrólitos e nanopartículas [122, 123]. A vantagem do método LBL está no fato de que a composição e a espessura da camada podem ser precisamente controladas variando o tipo da espécie carregada e o número de ciclos de adsorção, de acordo com a arquitetura desejada. A técnica LBL é também bastante simples, especialmente se comparada à técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Os filmes LBL de proteínas têm sido largamente usados em aplicações biologicamente relacionadas como síntese de enzimas, biossensores [124], entrega [125] de genes [126], etc. Particularmente, troca de elétrons entre proteínas redox e eletrodos subjacentes tem sido realizada recentemente em filmes de proteína por LBL [127]. Eletroquímica direta de proteínas redox ou enzimas em filmes LBL pode estabelecer um modelo viável para o estudo de transferência de elétrons entre enzimas e sistemas biológicos, e fornecer as bases para a fabricação de um novo tipo de biossensores e bioreatores, dispositivos médicos sem usar mediadores [128]. Filmes de proteínas LBL apresentaram propriedades similares àquela de filmes fabricados por *casting*, mas permite o controle da espessura em escala nanométrica e melhor estabilidade [129].

A incorporação controlada de proteínas em filmes LBL exige primeiramente o conhecimento dos mecanismos de adsorção. Usualmente, é considerado que a principal força motora ou interação estabilizadora nas camadas alternadas dos filmes LBL possa ser a atração eletrostática [130]. Entretanto, a situação efetiva é mais intrigante quando proteínas estão envolvidas. Enquanto em muitos casos, quando a rede de cargas superficiais das proteínas e a rede de cargas totais dos políons ou das nanopartículas são opostas, uma quantidade considerável de adsorção de proteínas sobre a superfície dos políons, ou das nanopartículas, é observada em filmes LBL. Entretanto, em alguns casos, quando as proteínas e polieletrólitos, ou nanopartículas, carregam a mesma rede de carga total dos polieletrólitos, uma quantidade considerável de proteínas sobre as superfícies dos polieletrólitos, ou nanopartículas, também é observada. Até agora, poucos estudos têm sido dedicados a este intrigante fenômeno. Ladam e co-autores [131-133] estudaram a interação entre proteínas e polieletrólitos de diversos tipos e com diferentes cargas superficiais por meio de reflectometria angular de varredura (SAR). Eles descobriram que as proteínas interagem fortemente com os polieletrólitos, independentemente de suas cargas totais. Enquanto a rede de carga total das proteínas era, por exemplo, negativa, as proteínas ainda podiam possuir sítios positivos sobre sua superfície, o que permitia a ligação localizada das proteínas à superfície carregada negativamente. Schenkman e co-autores descobriram que enzimas (citocromo P540) podem ser adsorvidas em camadas de políons carregados, tanto positivamente quanto negativamente, devido a sítios carregados opostamente e localizados em diferentes lados da enzima [134].

Além da interação eletrostática, outras forças tais como ligação de hidrogênio e atração hidrofóbica podem também desempenhar um papel importante em alguns casos, como conhecido nos arranjos polímero-polímero por LBL [135]. Entretanto, relativamente poucos estudos sistemáticos sobre a natureza das interações, ou sobre as forças presentes nos arranjos LBL de proteína e polieletrólitos, têm sido realizados até agora. O entendimento da interação

não só será importante para a confecção de novas arquiteturas de multicamadas de proteínas, mas também permitirá mais discernimento sobre o papel das cargas superficiais no processo de adsorção de proteína.

2.2 Absorção Óptica e Emissão de Fluorescência

Segundo o ponto de vista clássico, o processo de absorção de luz ocorre quando a frequência da onda eletromagnética é igual ou próxima à frequência natural da molécula. Porém, isto não explica a existência de linhas espectrais agudas, nem relaciona a quantidade de energia absorvida por um átomo ou molécula com a frequência de radiação. Estas questões são melhor explicadas com a teoria da mecânica quântica, onde há basicamente dois pontos pelos quais ela se difere do ponto de vista clássico: (a) a energia do fóton disponível para a absorção deve se relacionar com a frequência de radiação ν através da relação de Einstein:

$$E = h\nu \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck. Não há equivalente clássico e é imposto um aspecto corpuscular à radiação. (b) Como consequência natural do aspecto mecânico-ondulatório da matéria, átomos e moléculas só podem existir a determinados níveis de energia. Tais níveis de energia (estados eletrônicos) são subdivididos em níveis de energia vibracional e estes, por sua vez, podem ter uma transição para estados excitados de maior energia, ao absorver radiação. As transições podem ocorrer entre os níveis eletrônicos (espectro UV- visível) entre os níveis vibracionais (infravermelho) e entre os níveis rotacionais (microondas) [136]. Estando no estado excitado, a molécula pode voltar ao estado fundamental por diferentes caminhos. O processo de desativação, no qual se observa a emissão de fótons provenientes de

transições entre estados singletos, é chamado de fluorescência. Na Figura 3, estão ilustrados os processos de absorção e emissão de fluorescência.

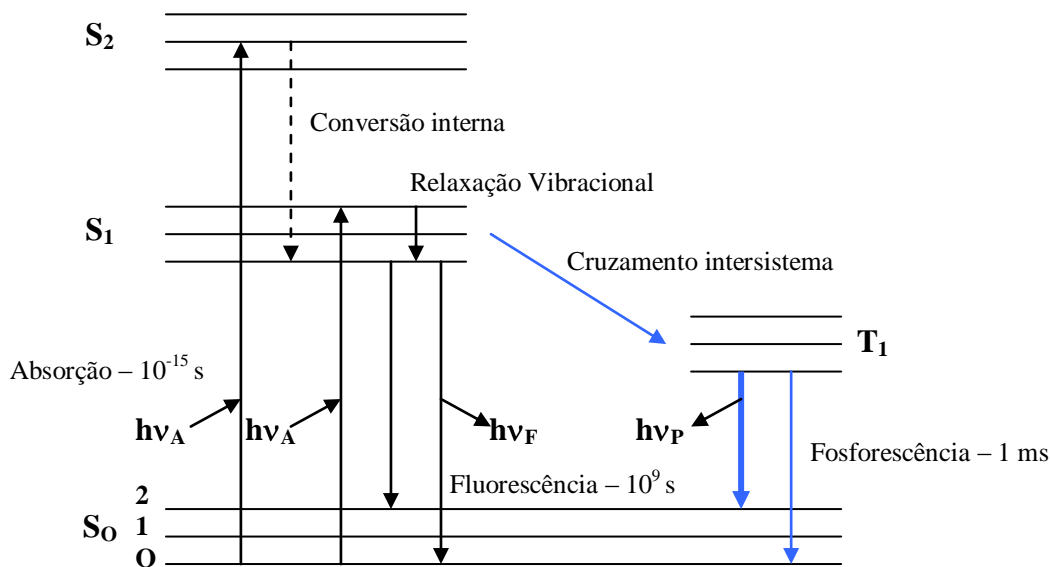


Figura 3- Diagrama de Jablonski[51].

A absorção de radiação ocorre em tempos da ordem de 10⁻¹⁵ segundos. Após a absorção, vários processos podem ocorrer, uma vez que, à molécula é permitido estar em níveis vibracionais mais altos, em um mesmo nível eletrônico S₁ ou S₂. Ocorre então a relaxação para o nível vibracional de menor energia (relaxação vibracional), ainda nesse mesmo nível eletrônico, em um tempo da ordem de 10⁻¹² segundos. Como o tempo de vida médio de um estado eletrônico excitado é da ordem de 10⁻⁸ segundos, tal processo de relaxação interna se completa antes da emissão fluorescente. São possíveis ainda, transições de um nível eletrônico para outro de menor energia através de processos não radiativos, como colisões com moléculas do solvente. O processo de relaxação entre níveis eletrônicos excitados é denominado *conversão interna*. As transições para o estado fundamental (singlete), a partir de um estado tripleto dão origem ao fenômeno da fosforescência, envolvendo tempos de até milisegundos.

2.3 Processo de absorção óptica

A intensidade de luz que passa através de um material absorvedor é reduzida de acordo com a lei de Beer [137]:

$$I=I_0e^{-\alpha l} \quad (2)$$

onde I é a medida de intensidade após a passagem da luz pelo material, I_0 é a intensidade inicial, α é a o *coeficiente de absorção* e l é o comprimento do caminho percorrido. Isto pode ser escrito de uma forma mais conveniente:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3)$$

onde A é a absorbância da amostra que também pode ser expressa por $A = \alpha l / \log_{10}(e) = 0,43\alpha l$. O coeficiente de absorção α está relacionado à parte imaginária n'' do índice de refração complexo por:

$$\alpha = \frac{4\pi n''}{\lambda} \quad (4)$$

onde λ é o comprimento de onda da luz.

A lei de Beer-Lambert introduz a concentração de uma espécie absorvedora na relação acima e é usada nos trabalhos com soluções. A absorbância de uma amostra pode ser expressa por:

$$\varepsilon.c.l = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = A \quad (5)$$

onde ε é o coeficiente de absorção molar [litros/(mol.cm)], c é a concentração molar da solução [mol/litro] ou [M] e l é o comprimento do caminho em centímetros. O valor de ε é normalmente medido no máximo de absorção. Como a absorbância é proporcional à concentração da solução, a curva de A versus c deve levar a uma reta. Entretanto, em concentrações altas, mudanças na posição ou intensidade do máximo de absorção, causada pela formação de agregados moleculares tais como *dímeros* ou *trímeros*, frequentemente resulta num desvio da lei de Beer-Lambert. A interação entre as moléculas e o solvente (solvatocromismo) pode também gerar desvios dessa lei.

2.4 Fluorescência com Resolução Temporal

O tempo de vida de fluorescência de uma substância geralmente representa o valor médio de tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental [136]. Medidas de tempo são freqüentemente necessárias na espectroscopia de fluorescência. Esses dados podem revelar a taxa de transferência de energia e a taxa de reações no estado excitado. A natureza precisa do decaimento fluorescente pode revelar detalhes sobre as interações dos fluoróforos com a vizinhança.

Medições do tempo de vida fluorescente são difíceis, pois esses tempos se encontram tipicamente na faixa de nanosegundos, fazendo-se necessário o uso de dispositivos eletrônicos de alta velocidade e detectores adequados. Existem três métodos amplamente usados para medir tempos de vida de fluorescência: o método de pulsos, método estroboscópico e o método harmônico ou modulação de fases. No método de pulsos, que utilizamos neste

trabalho, a amostra é excitada com um breve pulso de luz e é medido o intervalo de tempo transcorrido entre a absorção e a emissão da fluorescência.

Considere a excitação de um fluoróforo com um pulso de luz infinitamente curto, resultando em uma população inicial (N_0) de fluoróforos no estado excitado. A taxa de decaimento da população inicialmente excitada é:

$$\frac{dN}{dt} = -(\gamma + k)N(t) \quad (6)$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t seguinte à excitação; γ é a taxa emissiva, e k é a taxa de decaimento não radiativo [136]. Lembrando que $N(t) = N_0$ em $t = 0$, a integração da Eq. (18) fica:

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7)$$

onde $\tau = (\gamma + k)^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado. Como consequência, espera-se que a intensidade de fluorescência $F(t)$, que é proporcional à população no estado excitado [$F(t) = \gamma N(t)$], decai exponencialmente.

O tempo de vida também pode ser considerado o valor médio de tempo que um fluoróforo permanece no estado excitado. Essa média é dada por:

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i t_i N_i(t)}{\sum_i N_i(t)} \quad (8)$$

Para um grande número de fluoróforos e pequenos intervalos de tempo, essa soma fica:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t_i N_i(t) dt}{\int_0^{\infty} N_i(t) dt} = \frac{\int_0^{\infty} t e^{-\frac{t}{\tau}} dt}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt} \quad (9)$$

O denominador é igual a τ . Seguindo com a integração por partes, o numerador é igual a τ^2 . Daí, para um decaimento exponencial, o tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado é igual ao tempo de vida:

$$\langle t \rangle = \tau \quad (10)$$

É importante notar que a Eq.(22) não é verdadeira para as leis de decaimento muito complexas, tais como decaimentos multi-exponenciais ou não-exponenciais. Na maioria das vezes, os decaimentos observados são multi-exponenciais, sendo ajustados por uma soma de exponenciais do tipo:

$$F(t) = \sum \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (11)$$

onde τ_i é o tempo de vida da componente i do decaimento, e α_i é o correspondente fator pré-exponencial. Assim, o tempo de vida médio é dado por:

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (12)$$

2.5 Posição Espectral

Para moléculas fluorescentes em solução, observa-se uma diferença entre as energias de excitação e emissão. A energia de emissão é sempre menor que a energia de excitação, ou a emissão ocorre em comprimentos de onda maiores que aqueles da absorção. Esse efeito é conhecido como deslocamento de Stokes. Essa perda de energia entre a excitação e a emissão pode ocorrer devida a efeitos do solvente, reações no estado excitado, formação de complexos e transferência de energia.

Deslocamentos observados na emissão fluorescente são informações acerca do ambiente ao redor da sonda. No caso do resíduo triptofano em proteínas, por exemplo, a emissão ocorre em comprimentos de onda maiores quando o mesmo se encontra exposto ao solvente, e em comprimentos de onda menores quando o resíduo está no interior da proteína. Essa propriedade é observada na maioria das sondas fluorescentes intrínsecas, e permite obter informações sobre a polaridade do meio ao redor da sonda.

Compostos *o*-Abz-peptídeos apresentam deslocamentos para o vermelho entre 5 e 8 nanômetros na banda de absorção e, entre 20 e 30 nanômetros na banda de emissão, em relação ao *o*-Abz isolado. Essas mudanças ocorrem em decorrência das alterações na estrutura eletrônica do fluoróforo promovidas pela ligação covalente entre seu grupo carboxila e o terminal amino dos peptídeos.

2.6 Supressão de fluorescência

A intensidade de fluorescência pode ser reduzida por vários processos. Tal redução na intensidade é chamada *quenching* ou supressão. A supressão pode ocorrer por diversos mecanismos, principalmente por supressão colisional ou dinâmica, supressão estática,

transferência de energia, transferência de elétrons, etc. A supressão colisional ocorre quando os fluoróforos do estado excitado são desativados após contato com alguma outra molécula, o qual é chamado de *quencher* ou supressor. Nesse caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um eventual encontro com o supressor. As moléculas não são quimicamente alteradas nesse processo. Para supressão colisional, a redução na intensidade é descrita pela a equação de Stern-Volmer [136]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q]. \quad (13)$$

Nesta expressão, K_D é a constante de supressão de Stern-Volmer, k_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida sem a supressão, e $[Q]$ é a concentração do supressor. O mecanismo de supressão varia com o par fluoróforo-supressor. Os dados relativos à supressão são usualmente apresentados como um gráfico de F_0/F versus $[Q]$. A razão disto é porque se espera que F_0/F tenha uma dependência linear com a concentração do supressor.

A supressão estática ocorre quando o fluoróforo forma um complexo não fluorescente com o supressor. Quando este complexo absorve luz, ele retorna imediatamente ao estado fundamental sem emissão de um fóton. A expressão que descreve esse processo é dada por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (14)$$

A dependência de F_0/F com $[Q]$ é linear e idêntica à dependência observada para o *quenching* dinâmico, exceto que a constante de supressão é agora a constante de associação. Há basicamente duas maneiras bem conhecidas de se determinar qual dos dois processos é o

responsável pela supressão da fluorescência. O primeiro consiste em variar a temperatura. Se, com o aumento da temperatura, o coeficiente de inclinação da reta aumentar, se trata de supressão dinâmica, mas se a inclinação diminuir, então se trata de supressão estática. O método mais definitivo para distinguir a supressão estática da dinâmica é aquele no qual se utiliza medidas do tempo de vida de fluorescência. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos da observação. Os fluoróforos que formam complexos não são fluorescentes; nesse caso, a única fluorescência observada é a dos fluoróforos não complexados. A fração não complexada não é perturbada e, portanto, o tempo de vida τ é o próprio τ_0 . Por isso, para a supressão estática, a razão $\tau_0/\tau = 1$; do contrário, $\tau_0/\tau = F_0/F$.

Em alguns casos, o fluoróforo pode ser suprimido tanto por colisões quanto por formação de complexos com o mesmo supressor. A característica peculiar do gráfico de Stern-Volmer é um gráfico com curvatura para cima. Então, a expressão que descreve esse processo é dada por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (15)$$

A porção dinâmica da supressão observada pode ser determinada por medidas de tempos de vida da fluorescência. Isto é, $\tau_0/\tau = 1 + K_D[Q]$.

A supressão também pode ocorrer por mecanismos triviais, tais como atenuação da luz incidente pelo fluoróforo ou por outra espécie absorvedora, chamados de efeito filtro [136]. Este se dá pela absorção ou espalhamento da fluorescência emitida, promovendo uma falsa impressão da existência de supressão estática e dinâmica. Neste caso, a curva obedecerá à equação:

$$y = (1 + Ax)e^{Bx}, \quad (16)$$

na qual A é a taxa de supressão estática ou dinâmica, e B é o coeficiente de atenuação da fluorescência devido à absorção ou espalhamento promovido pelo supressor. É importante falar que o efeito filtro pode estar presente em todos os processos de supressão mencionados. Portanto, sempre que houver suspeita de sua existência, os dados devem ser corrigidos com o fator e^{Bx} .

2.7 A influência do tamanho da partícula na absorção de plasmon

O coeficiente de absorção total de partículas metálicas é dado pela teoria de Mie como sendo a somatória sobre todas as oscilações de multipolos elétricos e magnéticos que contribuem para a absorção e espalhamento do campo eletromagnético [45, 46, 49]. Para nanopartículas de dimensões abaixo de 25 nm, que obedecem à aproximação de serem muito menores do que o comprimento de onda da luz incidente, somente o termo de dipolo contribui para a absorção (aproximação de dipolo [49]). No regime quase-estático, o coeficiente de absorção κ para N partículas de volume V é dado pela seguinte equação:

$$\kappa = \frac{18\pi N V \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon_2}{[\epsilon_1 + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2^2} \quad (17)$$

γ é o comprimento de onda da radiação incidente e ϵ_m , a constante dielétrica do meio (assumida como independente da frequência). ϵ_1 e ϵ_2 representam as partes real e imaginária da função dielétrica do material, respectivamente ($\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$, onde ω é a frequência angular da luz). A absorbância de uma solução coloidal que contenha N partículas na célula óptica com um caminho ótico L é $A = (\kappa/\ln 10)L$.

A condição de ressonância para que ocorra a absorção de plasmon é aproximadamente alcançada quando $\epsilon_2(\omega) = -2\epsilon_m$, se ϵ_2 for pequeno ou fracamente dependente de ω . A largura

da banda de plasmon depende principalmente de $\epsilon_2(\omega)$. Conforme a equação 1, a absorção de plasmon independe do tamanho da partícula numa aproximação de dipolo. Entretanto, experimentalmente é observado que o tamanho da partícula afeta a absorção de plasmon de superfície, visto que a largura da banda de absorção aumenta com a redução do tamanho da partícula. É um fato bem estabelecido que a largura da banda é inversamente proporcional ao raio r da partícula para tamanhos menores do que 20 nm [49, 138-140]. No regime quase-estático, a ressonância de plasmon passa a ter uma dependência do tamanho da partícula [46-49] ao ser introduzida na equação 1, uma função dielétrica dependente do tamanho $\epsilon(\omega, R)$ [49, 140, 141]. A função dielétrica pode ser escrita como uma combinação de um termo interbanda $\epsilon_{IB}(\omega)$, que leva em conta a resposta dos elétrons d, com um termo Drude $\epsilon_D(\omega)$, que considera somente os elétrons livres de condução ($\epsilon(\omega) = \epsilon_{IB}(\omega) + \epsilon_D(\omega)$) [142, 143]. Este último é representado, segundo o modelo de elétrons livres, pela seguinte expressão [143]:

$$\epsilon_D(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (18)$$

onde $\omega_p^2 = [ne^2 / \epsilon_0 m_{ef}]$ é a frequência de plasmon, expressa em termos da densidade de elétrons livres n , da carga elétrica e , da permissividade do vácuo ϵ_0 e da massa efetiva do elétron m_{ef} ; γ é uma constante de amortecimento fenomenológico, igual à largura da banda plasmônica para o caso de um gás perfeito de elétrons livres no limite de $\gamma \ll \omega$. A constante de amortecimento γ está relacionada com os tempos de vida do processo de espalhamento de elétrons no volume do material, que são devidos principalmente aos espalhamentos elétron-elétron, elétron-fônon, e espalhamento de elétrons por defeitos. Para uma partícula pequena, o espalhamento elétron-superfície também se torna importante, já que o livre caminho médio dos elétrons de condução (tipicamente na ordem de dezenas de nanômetros em metais nobres)

é limitado por causa da vizinhança da partícula. Por isso, γ se torna dependente do raio r da partícula [138, 139],

$$\gamma(r) = \gamma_0 + \frac{Av_F}{r}, \quad (19)$$

onde γ_0 é a constante de amortecimento do volume, v_F é a velocidade dos elétrons na energia de Fermi, e A é um fator, que depende da teoria, inclui detalhes do processo de espalhamento (espalhamento difuso ou isotrópico [49]).

É importante mencionar que existem muitas outras teorias com o mesmo propósito da Teoria de Mie [49, 144-147], todas apresentando dependência de $1/r$, refletindo a importância da razão entre a área superficial e o volume das nanopartículas.

Para nanopartículas maiores (> 25 nm para partículas de ouro) o coeficiente de absorção depende explicitamente do tamanho da nanopartícula quando os termos de ordem maior são levados em consideração, as quais são funções de r . Para estas partículas maiores, a largura da banda de plasmon aumenta com o aumento do tamanho, quando o comprimento de onda da luz incidente se torna comparável ao tamanho da partícula. Isso leva a uma polarização heterogênea das nanopartículas pelo campo eletromagnético. O alargamento da banda plasmônica é, então, atribuído a efeitos retardados [49]. O aumento na largura de linha é também causado pela excitação de diferentes multipolos, que absorvem energias diferentes [46]. Esse comportamento é considerado um efeito extrínseco por utilizar a expressão completa da teoria de Mie [49].

2.8 Influência da forma da partícula na absorção de plasmon

A absorção de plasmon de superfície é extremamente sensível a alterações na forma da nanopartícula [49, 92, 148-151]. Para nanobastões, a absorção plasmônica se divide em duas bandas [92, 149-151], as quais correspondem à oscilação dos elétrons livres nos sentidos longitudinal e transversal do nanobastão. O modo transversal exibe uma ressonância em torno de 520 nm, que é coincidente com a banda plasmônica de partículas esféricas, enquanto a ressonância do modo longitudinal é deslocada para o vermelho e depende fortemente da razão R do aspecto de nanobastão [92, 149-151]. Nanorodos de ouro podem ser sintetizados por meios eletroquímicos na presença de surfactantes orgânicos que formam micelas protetoras na forma de fio em volta do nanorodo de ouro.

2.9 Aumento de fluorescência por ressonância de plasmon de superfície

Os primeiros indícios teóricos e experimentais sobre a intensificação de fluorescência por metais surgiram nas décadas de 70 e 80 [152-156] com trabalhos sobre a forte intensificação de sinal observado em SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) [157-162]. Este método proporciona a intensificação de sinais em fatores de 10^3 a 10^5 , podendo chegar a 10^{14} , em casos ainda mais específicos (*hot-spots*), o que permite a detecção de uma única molécula [163]. SERS eficientes exigem que a molécula estudada esteja a uma distância da superfície metálica menor do que 20-30 Å. A esta distância, a fluorescência da molécula é significativamente suprimida, a princípio por transferência de energia para a superfície do metal. No que diz respeito à fluorescência, a intensificação do sinal é muito menor do que o observado para o SERS. Motivados por esse fenômeno, Lakowicz, J. R., et al., perceberam a

possibilidade de intensificar a fluorescência de fluoróforos depositados próximos a partículas de prata na forma de filmes de ilhas de prata (SIF), em condições cuidadosamente otimizadas [164-167]. Observaram que, em distância de até 50 Å das partículas de prata, a emissão do fluoróforo é fortemente suprimida pela superfície da partícula. Neste caso, a emissão do fluoróforo localizado próximo do SIF, mas fora da região de supressão depende de dois importantes fatores: do campo local intensificado e do aumento da taxa de decaimento Γ intrínseca do fluoróforo. O primeiro fator proporciona taxas de excitação maiores. O segundo, muda o rendimento quântico e o tempo de vida do fluoróforo [164]. No caso de SIF, a intensificação da fluorescência é atribuída ao aumento do rendimento quântico do fluoróforo nas proximidades dos SIF's. A intensificação da fluorescência é dada por:

$$G \sim G_{ex} G_{QY}, \quad (20)$$

onde $G_{QY} = Q_m/Q_o$ é o aumento no rendimento quântico do fluoróforo perto de um SIF. Na ausência do SIF, o rendimento quântico e o tempo de vida são dados por:

$$Q_o = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}) \quad (21)$$

$$\tau_o = 1 / (\Gamma + k_{nr}), \quad (22)$$

onde Γ é a taxa de decaimento radiativo e k_{nr} são as taxas de decaimento não radiativas. Na presença de SIFs, o rendimento quântico e o tempo de vida são dados por:

$$Q_m = \Gamma_m / (\Gamma_m + k'_{nr}) \quad (23)$$

$$\tau_m = 1/(\Gamma_m + k'_{nr}), \quad (24)$$

onde Γ_m e k'_{nr} são as taxas de decaimento radiativo e não radiativo, na presença de partículas metálicas, respectivamente. Aumento nas taxas de decaimento radiativos ($\Gamma_m > \Gamma$) dos fluoróforos nas proximidades dos SIFs resulta em aumento das eficiências quânticas e em redução dos tempos de vida [164]. A completa emissão detectável de um fluoróforo é, normalmente, limitada pela sua fotoestabilidade [168]. A degradação fotoquímica ocorre no estado excitado, de modo que a redução do tempo de vida induz o fluoróforo a sofrer mais ciclos de excitação-emissão antes do fotocclareamento.

2.10 Efeitos de uma superfície metálica sobre a fluorescência

Há na literatura uma quantidade moderadamente grande de trabalhos a respeito dos efeitos dos metais sobre os fluoróforos. Muitos desses estudos usam ilhas metálicas, colóides metálicos, superfícies metálicas e espelhos. Os efeitos mais severos foram encontrados para ilhas e colóides do que para superfícies metálicas contínuas.

A possibilidade de alterar as taxas de decaimento radiativo foi demonstrada com medidas do tempo de decaimento do európio (Eu^{3+}) posicionado a várias distâncias de um espelho plano de prata [152, 169-171]. Em um espelho, a camada metálica é mais espessa do que o comprimento de onda óptico. Os tempos de vida oscilam com a distância, mas permanece uma exponencial simples a cada distância. Esse efeito pode ser explicado pela mudança de fase do campo refletido com a distância e pelo efeito desse campo refletido sobre o fluoróforo. A redução no tempo de vida ocorre quando o campo refletido está em fase com o dipolo oscilante. Com o aumento da distância, a amplitude de oscilação diminui. Os efeitos de um espelho plano ocorrem em distâncias comparáveis aos comprimentos de onda de

excitação e emissão. Para distâncias abaixo de 20 nm a emissão é suprimida. Esse efeito é atribuído ao acoplamento do dipolo com os elétrons que oscilam coletivamente na superfície do metal, chamados de ressonância de plasmon de superfície (da sigla inglesa SPR). Mais notável ainda é o comportamento de estados excitados entre dois espelhos planos. Se a distância entre os espelhos for menor que $\lambda/2$, então o estado excitado não decai; ou seja, o tempo de vida se torna teoricamente infinito. Assim, é esperado um aumento significativo no tempo de decaimento com essa configuração geométrica moderadamente simples.

Os efeitos de superfícies metálicas sobre os espectros ópticos são fortemente dependentes da natureza da superfície metálica e/ou de partículas metálicas. Em muitos casos, efeitos mais dramáticos são observados em colóides metálicos em vez de superfícies planas espelhadas. Por exemplo, os sinais Raman são consideravelmente amplificados por colóides ou ilhas [172, 173], o que resultou no campo de SERS. Filmes de ilhas de prata são feitos de prata depositada sobre substrato de vidro. Sob condições adequadas, o vidro se torna coberto com ilhas aproximadamente circulares, com diâmetro em torno de 200 Å e espessura de aproximadamente 40 Å. Cerca de 40% da superfície é coberta por prata. Os filmes de ilhas de prata são diferentes de superfícies metálicas semitransparentes. Estas superfícies contínuas possuem espessuras maiores, porém com espessuras menores do que o comprimento de onda óptico.

Um dos efeitos mais intrigantes das ilhas de prata foi observado com ilhas de prata cobertas com um filme fino de $\text{Eu}(\text{ETA})_3$, onde ETA é um ligante que quelata európio. Este quelato desloca o rendimento quântico para próximo de 0,4. As amostras continham um revestimento inerte entre as ilhas, de modo a impedir a emissão dos quelatos de Eu^{3+} posicionados entre as ilhas. Quando o quelato $\text{Eu}(\text{ETA})_3$ foi depositado sobre o substrato de silício, sem as ilhas de prata, ele apresentou um tempo de decaimento de 280 μs , obedecendo a uma exponencial simples, com um rendimento quântico de 0,4. Entretanto, quando

depositado sobre filmes de ilhas de prata, a intensidade aumentou cerca de 5 vezes, e o tempo de vida diminuiu cerca de 100 vezes, até próximo de 2 μ s. Além disso, o decaimento não é mais uma exponencial simples [153]. Tal efeito pode ser explicado por um aumento na taxa radiativa. O aumento no rendimento quântico do $\text{Eu}(\text{ETA})_3$ é considerado impossível. O alto rendimento quântico é atribuído a um provável aumento no campo de excitação local próximo da partícula metálica. Por esta razão, é importante reconhecer que as intensidades medidas em superfícies representam um rendimento quântico “aparente” que pode incluir um fator desconhecido, devido a uma amplificação do campo incidente. Este aumento na intensidade local não pode explicar a redução do tempo de vida, porque um quelato imperturbável, excitado por um campo amplificado, ainda decairia com o tempo de vida de 280 μ s. O tempo de vida reduzido pode ser devido ao acoplamento eletromagnético entre Eu^+ e as ilhas de prata.

2.11 Efeitos de partículas metálicas sobre a supressão

A supressão colisional ocorre largamente com fluoróforos, e a supressão é usada para caracterizar moléculas [174, 175]. A supressão por supressor exógeno como oxigênio, iodo e acrilamida é frequentemente usada para medir os coeficientes de difusão local e determinar até que ponto os fluoróforos são protegidos do solvente pela macromolécula. Quando a colisão ocorre, tanto o rendimento quântico como os tempos de vida são reduzidos pela presença de uma taxa adicional ($k_q[\text{Q}]$) de um processo que desativa o estado excitado. Não encontramos qualquer relato sobre o efeito de uma superfície metálica sobre a supressão colisional. Parece improvável que as superfícies metálicas tenham qualquer efeito sobre $k_q[\text{Q}]$, exceto se a concentração do supressor for alterada pela superfície.

Consideremos que um fluoróforo esteja presente numa solução contendo supressores, e que se meça a intensidade de emissão em várias distâncias das partículas metálicas. Lembrando que a supressão colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer (Eq. (13)): Essa equação mostra um resultado bem conhecido: o de que fluoróforos com tempos de vida maiores são suprimidos mais do que aqueles com tempos de vida menores. A intensidade deve aumentar nas proximidades da superfície devido ao aumento da taxa de emissão radiativa que concorre mais eficientemente com a supressão. Portanto, a emissão de fluoróforos suprimidos será observável perto de partículas metálicas. Se desejado, pode-se usar maiores concentrações de supressor para minimizar a emissão de todas as regiões da amostra, exceto daquelas adjacentes ao metal. Alternativamente, suponha que a solução contenha um segundo fluoróforo, que não seja acessível ao supressor, ou que exiba um alto rendimento quântico. Nesse caso, um aumento na taxa de decaimento radiativo não resultará em maiores intensidade desse segundo fluoróforo. Assim as partículas metálicas podem ser usadas para detectar as espécies suprimidas pelo aumento seletivo de seus rendimentos quânticos.

Moléculas biológicas possuem alguns fluoróforos intrínsecos. Uma fração substancial de fluoróforos intrínsecos é suprimida. A tirosina é frequentemente suprimida em proteínas, assim como os resíduos de triptofano são suprimidos por resíduos de aminoácidos vizinhos, tais como ligações dissulfetos, histidina, ou cadeias laterais de fenilalanina [176-178]. Outro exemplo bem conhecido é o DNA, nucleotídeos, e as bases individuais. Apesar de alguma emissão intrínseca ter sido reportada [179, 180], a fluorescência intrínseca das cinco bases comuns de ácido nucléico é muito fraca e de pouca utilidade prática.

Acredita-se que os efeitos superficiais possam resultar em emissão intensa e útil de todos esses fluoróforos intrínsecos. Flavoproteínas adjacentes às superfícies metálicas tornam-se fluorescentes quando o aumento das taxas radiativas torna-se comparável, em magnitude,

às taxas de decaimento não radiativo. Similarmente, resíduos suprimidos de proteínas e DNA podem emitir de forma útil se as taxas puderem ser comparáveis às taxas de decaimento não radiativo. Visto que aumentos significativos de fluorescência têm sido observados para fucsina básica, com seu baixo rendimento quântico próximo de 0,02, há razão para se esperar resultados similares para o DNA.

É instrutivo considerar o seguinte exemplo: suponhamos que uma proteína tenha dois resíduos de triptofano e que a superfície exposta seja fortemente suprimida por uma interação de supressão local. na ausência de metal, a emissão será observada a partir do resíduo de maior rendimento quântico que emite em comprimentos de onda menores. Quando a proteína está próxima ao metal, ambos os resíduos emitem mais rápido. Entretanto, o rendimento quântico do resíduo será aumentado para um valor maior. Portanto, a forma espectral mudará por causa do aumento na intensidade dos menores comprimentos de onda, em consequência do aumento do rendimento quântico dos resíduos suprimidos.

Taxas radiativas aumentadas por superfície podem também resultar em fosforescência. A fosforescência não é usualmente observável em soluções à temperatura ambiente devido à supressão, mesmo em baixas concentrações de impureza, por isso, a baixa taxa de emissão de uma molécula no estado tripleto não pode incluir as taxas de decaimento mais rápidas (Eq.(5)). Se a superfície aumenta a taxa radiativa de uma molécula no estado tripleto, então o rendimento quântico para fosforescência deve aumentar. Adicionalmente, o aumento do tempo de vida deve reduzir o grau de supressão pelo oxigênio e outros supressores. A fosforescência de proteínas pode se tornar uma observação comum para proteínas perto de superfícies, mesmo na presença de oxigênio. Alternativamente, pode haver uma subclasse de resíduos de triptofano que estejam à beira de manifestar fosforescência e que, próximo de superfícies, torna-se prontamente observável.

2.12 Engenharia de decaimento radiativo

A espectroscopia de fluorescência é uma das principais ferramentas usada em pesquisas bioquímicas e tem se tornado o método dominante, permitindo a revolução no sequenciamento genômico e de DNA. Os princípios básicos da fluorescência são bem entendidos, incluindo fatores que afetam a emissão, tais como supressão, efeitos do ambiente, transferência de energia por ressonância (RET) [181] e movimentos rotacionais. Todos estes efeitos são usados para estudar a estrutura e a dinâmica de macromoléculas e a interação de macromoléculas entre si. Por exemplo, a supressão pode revelar a exposição do fluoróforo ao solvente ou a outro grupo de supressor dentro da mesma macromolécula. O RET revela a proximidade entre doador e aceitador localizados em regiões de interesse na macromolécula, e a anisotropia de decaimento revela a dinâmica interna e movimentos segmentais de proteínas e membranas. Medidas de intensidade, transferência de energia e anisotropia são também amplamente usadas em medidas de hibridização de DNA, em descoberta de drogas e em imunoenaios fluorescentes.

Na maioria das aplicações de fluorescência as propriedades espectrais dos fluoróforos são alteradas por processos que modificam as taxas de decaimento não radiativo da população do estado excitado. Tanto a supressão colisional quanto a transferência de energia promovem caminhos para o decaimento não radiativo, isto é, a taxa espontânea pela qual os fluoróforos emitem fótons. A taxa emissiva de um fluoróforo no espaço livre (meio homogêneo e não condutor) é determinada principalmente pelo coeficiente de excitação e pelo espectro de absorção do fluoróforo [181]. Entretanto, uma oportunidade de controlar as taxas não radiativas surge das interações de fluoróforos com partículas ou com superfícies metálicas próximas. São consideradas superfícies metálicas: metais condutores, íons não metálicos ou óxidos. A habilidade de modificar a taxa de decaimento pode gerar profundas implicações no

uso de fluorescência em pesquisas básicas e em aplicações tecnológicas. Este efeito não é comum e, por isso, as implicações de aumentar as taxas radiativas de fluorescência não têm sido consideradas.

Lakowicz [164] refere-se à habilidade de controlar as taxas de decaimento radiativo com o termo *engenharia de decaimento radiativo* (RDE), por considerar provável que a taxa de decaimento radiativo seja o efeito mais incomum de uma superfície metálica, embora considere que partículas e superfícies metálicas também possam concentrar o campo da luz incidente e, assim, alterar a taxa de excitação.

Estes fenômenos não têm sido coletivamente explicados pela estrutura de espectroscopia de fluorescência. Progresso no entendimento e aplicações de RDE exigirá esforços interdisciplinares de físicos, químicos, engenheiros e biólogos. Será necessário desenhar e construir dispositivos em nanoescala, e interpretar as complexas observações espectrais.

Os espectroscopistas estão acostumados a realizar experimentos usando fluoróforos de 5 a 10 Å em soluções. Tipicamente as soluções são transparentes à radiação emitida. Pode haver razoáveis mudanças no índice de refração, tais como para um fluoróforo em uma membrana, mas tais mudanças causam somente um pequeno efeito sobre as propriedades espectrais da fluorescência. Em tais soluções homogêneas, os fluoróforos emitem no espaço livre e são observados num campo distante. Normalmente os efeitos locais não são observados por causa do tamanho reduzido dos fluoróforos relativamente à câmara experimental. As propriedades espectrais são bem descritas pelas equações de Maxwell para um dipolo oscilante no espaço livre. Entretanto, a interação da radiação eletromagnética com objetos físicos pode ser considerada mais complexa. Numa escala macroscópica, o tamanho e a forma de uma antena de transmissão de rádio são projetados com o objetivo de direcionar a radiação para o receptor, e para levar em conta as interações da radiação com objetos

próximos, tais como a superfície da Terra. No entanto, é importante notar que não se consideram a reflexão dos fótons emitidos das superfícies metálicas. A reflexão ocorre após a ocorrência da emissão. Neste caso, são considerados os efeitos da superfície vizinha sobre a condição de “espaço livre” e suas conseqüentes modificações nas equações de Maxwell para o novo espaço livre [182]. Assim como uma antena de transmissão, um fluoróforo é um dipolo oscilante, porém um dipolo que oscila em alta freqüência e irradia pequenos comprimentos de onda. As superfícies metálicas podem responder ao dipolo oscilante e modificar a taxa de emissão e a distribuição espectral da energia irradiada. O campo elétrico sentido por um fluoróforo é afetado pelas interações da luz incidente com a superfície metálica, e também pela interação do dipolo oscilante do fluoróforo com a superfície metálica. Adicionalmente, o dipolo oscilante do fluoróforo induz um campo no metal. Estas interações podem aumentar ou reduzir a taxa de decaimento radiativo. Estes efeitos são, às vezes, descritos em termos de densidade de modos fotônicos. Grandes densidades fotônicas proporcionam mais caminhos de decaimentos radiativos e, conseqüentemente, altas taxas de decaimento radiativo. Note que a teoria para tais efeitos é complexa.

Há vários exemplos de mudanças espectrais severas em diferentes áreas da espectroscopia. Um exemplo bem conhecido é o SERS [158-162], cujo sinal de um cromóforo, nas proximidades de uma superfície metálica, pode ser aumentado por um fator de 10^3 a 10^5 , podendo detectar o sinal Raman até mesmo de uma única molécula [163]. A presença de um filme metálico semitransparente nas proximidades de um fluoróforo pode gerar supressão de fluorescência. É o caso da “fluorescência por reflexão interna total” (TIRF), na qual a emissão de fluoróforos a 50 Å de uma superfície metálica é quase completamente suprimida. Este efeito pode ser utilizado em microscopia de fluorescência com excitação de onda evanescente. Em microscopia com TIRF, o filme metálico suprime a emissão de determinadas regiões de membranas celulares próximas à interface água-quartzo,

permitindo a observação da emissão de regiões citoplasmáticas mais distantes da interface água-quartzo.

Além de suprimir, partículas e superfícies metálicas podem provocar o aumento da fluorescência. Dependendo da distância, da geometria, das partículas e superfícies metálicas pode haver supressão ou amplificação da fluorescência por um fator de até 10^3 [183, 184]. Os efeitos das superfícies metálicas sobre fluoróforos são devidos a, no mínimo, três fatores: o primeiro é a supressão por transferência de energia com uma dependência com d^3 [183]. A supressão pode ser entendida como o amortecimento dos dipolos oscilantes pelo metal próximo. O segundo mecanismo é um aumento na intensidade de fluorescência, atribuído à intensificação do campo incidente gerada pelo metal, que tem sido observado em colóides metálicos [184-186]. A amplificação pode ser entendida como uma concentração da intensidade do campo local promovida pelas partículas metálicas. O terceiro efeito, menos conhecido, é a interação fluoróforo-metal. Neste efeito, é esperado que o metal possa aumentar a taxa de decaimento radiativo intrínseca do fluoróforo; o que é considerado um efeito altamente incomum [164]. Em espectroscopia de fluorescência, geralmente não se tem controle significativo sobre a taxa radiativa (Γ). Os espectros observáveis do rendimento quântico e do tempo de vida são governados pelas amplitudes da taxa radiativa (Γ) e da soma das taxas de decaimento não radiativas (k_{nr}). Para o entendimento da importância de se controlar a taxa de decaimento radiativo (Γ) é informativo considerar como esta taxa afeta o rendimento quântico Q_0 e o tempo de vida τ_0 do fluoróforo na ausência de uma superfície metálica. Considere o diagrama de Jablonski na Figura 2. O rendimento quântico do fluoróforo na ausência de outras interações de supressão é dada por:

$$Q_0 = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}). \quad (25)$$

O tempo de vida natural de um fluoróforo (τ_N) é o inverso da taxa de decaimento radiativa ($\tau_N = \Gamma^{-1}$) ou o tempo de vida que será observado se seu rendimento quântico for unitário ou, equivalentemente, se $k_{nr} = 0$. O rendimento quântico é a fração dos fluoróforos excitados que decaem por emissão (Γ) pelo decaimento total ($\Gamma + k_{nr}$). Os fluoróforos com altas taxas radiativas possuem alto rendimento quântico e curtos tempos de vida. A taxa radiativa é determinada pelo coeficiente de absorção da transição eletrônica [181]. Os coeficientes de absorção dos cromóforos são levemente dependentes do ambiente. A taxa de decaimento radiativo é essencialmente constante para qualquer fluoróforo. Portanto, o rendimento quântico pode aumentar somente por meio da redução da taxa não radiativa k_{nr} , que normalmente ocorre em temperaturas mais baixas. O tempo de vida de um fluoróforo é determinado pela soma das taxas que desativam o estado excitado. Na ausência de outras interações supressoras o tempo de vida é dado por:

$$\tau_o = 1/(\Gamma + k_{nr}). \quad (26)$$

O tempo de vida de um fluoróforo pode ser aumentado ou reduzido pela mudança do valor de k_{nr} . Quase sempre, o tempo de vida e o rendimento quântico aumentam ou diminuem juntos.

Muitos experimentos em fluorescência envolvem mudanças nas taxas de decaimento não radiativo. Por exemplo, na supressão colisional, a constante bimolecular k_q reduz o rendimento quântico e o tempo de vida por:

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k_{nr} + k_q [Q]), \quad (27)$$

onde [Q] é a concentração do supressor. O tempo de vida do fluoróforo suprimido é reduzido em decorrência dos caminhos não radiativos adicionais disponíveis ao estado excitado que ocorrem a uma taxa $k_q[Q]$

$$\tau = (\Gamma + k_{nr} + k_q[Q])^{-1}. \quad (28)$$

Similarmente, a transferência de energia por ressonância (RET) consiste num processo adicional que desativa a população do estado excitado por:

$$k_T = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (29)$$

O tempo de decaimento na presença de transferência de energia é dado por:

$$\tau = (\Gamma + k_{nr} + k_T)^{-1}. \quad (30)$$

Tanto a supressão quanto o RET reduzem o rendimento quântico e o tempo de vida do fluoróforo. A taxa não radiativa Γ não é mudada por esses processos.

Os brilhos absoluto e relativo de um fluoróforo são dependentes dos valores das taxas de decaimento radiativas e não radiativas. Em geral, não há maneiras de se controlar o tempo de vida ou o rendimento quântico de um fluoróforo senão alterando os valores de k_{nr} , k_q , $k_q[Q]$ ou k_T .

A concepção de se alterar a taxa de decaimento radiativo não é comum em espectroscopia de fluorescência. É importantes considerar efeitos espectrais inéditos esperados pelo aumento da taxa radiativa. A presença de uma superfície metálica (m) nas proximidades de um fluoróforo aumenta a taxa radiativa por uma nova taxa Γ_m .

Desconsiderando os efeitos de supressão do metal (k_m), o rendimento quântico e o tempo de vida do fluoróforo perto do metal são dados, respectivamente, por:

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (31)$$

$$\tau_m = (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr})^{-1} \quad (32)$$

Estas equações resultam em predições incomuns para o fluoróforo perto de uma superfície metálica. À medida que o valor de Γ_m aumenta, o rendimento quântico aumenta, enquanto o tempo de vida diminui. Como Γ_m é a taxa de retorno do fluoróforo para o estado fundamental, o tempo de vida diminui na medida em que Γ_m se torna maior do que Γ . Este é um resultado típico, similar àquele que ocorre com supressão colisional. Entretanto, um efeito inusitado ocorre com o rendimento quântico. Na medida em que Γ_m aumenta, o rendimento quântico também aumenta. As mudanças relativas mais drásticas são encontradas para fluoróforos com eficiência quântica mais baixa. Se $Q = 1$, então as mudanças em Γ_m não surtem efeito. Se Q for baixo, tal como 0,1, a taxa Γ_m induzida pelo metal aumenta o rendimento quântico. Para valores de Γ_m suficientemente grandes, o rendimento quântico de todos os fluoróforos se aproxima de 1. Examinando a Figura 2, pode-se verificar que para haver mudança no tempo de vida ou no rendimento quântico de fluoróforos de baixo rendimento quântico é necessário valores maiores de Γ_m/Γ . Este efeito ocorre porque, para o mesmo tempo de vida τ_0 , rendimentos quânticos menores implicam em valores de k_{nr} maiores. Assim, são exigidos valores maiores de Γ_m para competir com os altos valores de k_{nr} .

Comparando-se os efeitos do aumento dos valores de Γ_m com os efeitos de supressão colisional, em termos do gráfico de Stern-Volmer, é possível observar que os efeitos da taxa

Γ_m são drasticamente diferentes dos efeitos da taxa de supressão colisional $k_q [Q]$. No caso da supressão colisional, tanto o tempo de vida como o rendimento quântico diminuem, ao passo que os efeitos do colóide metálico são muito diferentes. Neste caso, o tempo de vida diminui, mas o rendimento quântico aumenta com o aumento dos valores da Γ_m . O aumento no rendimento quântico que ocorre próximo a superfícies metálicas é diferente daquele que ocorre quando um fluoróforo sensível ao solvente é dissolvido em um solvente de baixa polaridade, ou se liga a uma proteína. Nestes casos, o rendimento quântico aumenta por causa de um aumento na taxa de decaimento não radiativo k_{nr} .(Eq.(25)).

2.13 Aplicações Biofísicas da RDE

Na sessão anterior, foram resumidos os efeitos da superfície metálica e de partículas sobre fluoróforos. Esses efeitos são altamente dependentes da distância e da natureza da superfície do metal. Em curtas distâncias do metal, a fluorescência dos fluoróforos é suprimida. Em distâncias apropriadas de 50-200 Å, há um aumento nas taxas de decaimento radiativo. Além disso, para taxas radiativas aumentadas, os fluoróforos podem ser expostos a campos locais mais intensos devido às interações do metal ou das partículas com a luz incidente. Finalmente, esses efeitos são supostamente dependentes da orientação do dipolo oscilante relativo às superfícies metálicas. Estes efeitos podem ser usados em aplicações medical e bioquímicas da fluorescência. Entretanto, a aplicação bem sucedida da engenharia de decaimento radiativo exigirá considerável esforço na fabricação de sistemas em meso e nanoescalas, coberturas de superfície e acoplamento de fluoróforos e macromoléculas a superfícies. Dada a complexidade desses esforços, e a necessidade de colaborações interdisciplinares, é razoável especular as potenciais aplicações de RDE.

2.14 Interação fluoróforo-metal

Há várias interações entre fluoróforos e superfícies metálicas [156, 187-189]. Estas incluem supressão, amplificação do campo da luz incidente, e um aumento na taxa de decaimento radiativo do fluoróforo. A supressão ocorre por transferência de Förster para a absorção de plasmon de superfície do metal. Este efeito cai com o cubo da distância (d) entre a superfície metálica e o fluoróforo [183]. A supressão é descrita também como uma interação ôhmica que dissipa energia. Além da supressão, há dois efeitos que determinam o rendimento quântico aparente Y :

$$Y = |L(\omega_{ex})|^2 Z(\omega_{em}) \quad (33)$$

O primeiro termo descreve a intensidade local. O campo local é proporcional ao campo incidente (E_0) que pode ser concentrado em regiões próximas às partículas metálicas. O termo “rendimento quântico aparente” diz respeito à intensidade relativa a uma amostra de referência, medida com a mesma intensidade da luz incidente. Por causa da mudança na intensidade do campo incidente atribuída às partículas metálicas, é necessária a distinção entre os rendimentos quântico aparente (Y) e real (Q). Esta distinção não é necessária na ausência de metais, pois a redução do campo promovida pelos fluoróforos é sempre a mesma para a amostra e para a referência. Entretanto, as partículas metálicas concentram os campos metálicos. Estes efeitos foram modelados para partículas elipsoidais e a amplificação máxima prevista para a amplitude do campo local é de 140 [156]. O primeiro termo na Eq.(33) é proporcional ao produto do rendimento quântico Q pela amplificação da intensidade do campo. Como a intensidade da luz é proporcional ao quadrado do campo, as partículas metálicas podem proporcionar uma intensidade de excitação local muito amplificada.

O segundo termo $Z(\omega_{em})$ descreve a partição da energia em caminhos de decaimentos radiativos e não-radiativos; quando modificado por partículas metálicas. Na ausência de metal, este rendimento quântico é dado pela Eq.(25). O rendimento quântico na presença do metal é dado pela Eq.(31). A presença de uma superfície metálica resulta no *aumento da taxa de decaimento radiativo*. Portanto, o rendimento quântico aumenta. No entanto, a forma precisa da Eq. (31) não está clara. É claro que o metal proporciona um aumento na taxa radiativa. Entretanto, não se sabe se a taxa é aditiva (Eq.(31)), ou se a radiação induzida pelo metal é proporcional à taxa radiativa adicional intrínseca. Nesse caso, em que $\Gamma_m = \lambda\Gamma$, a equação se torna:

$$Q_m = \frac{\Gamma(1+\gamma)}{\Gamma(1+\gamma)+k_{nr}} \quad (34)$$

Onde $\gamma\Gamma$ é uma taxa de decaimento radiativa induzida por metais, proporcional à taxa radiativa intrínseca Γ . Em ambos os casos, a intensificação do campo e o aumento das taxas radiativas ocorrem em distâncias maiores para o metal do que para a supressão. Portanto, existe uma região de 50-200 Å a partir da superfície metálica onde a emissão é aumentada [164].

É interessante considerar como a superfície metálica afeta os fluoróforos com altos e baixos rendimentos quânticos (Q_0). Há dois casos limites. Se o corante tem um alto rendimento quântico ($Q \rightarrow 1$), então a taxa de decaimento radiativo adicional não pode aumentar substancialmente o rendimento quântico. Nesse caso, a supressão devida à transferência de energia para o metal vai dominar, e $Z(\omega_{em})$ será menos que um. O caso mais interessante é para o cromóforo de baixo rendimento quântico. Nesse caso, $Z(\omega_{em})$ pode ser $1/Q_0$ [189]. Por essa razão é de interesse estudar as interações fluoróforo-metal usando fluoróforos com baixo rendimento quântico. Enquanto o mecanismo efetivo é complexo,

pode-se imaginar que as partículas sirvam como uma antena que, em combinação com o cromóforo, irradie (decaia) mais rápido que k_{nr} . Isto sugere que a emissão de substâncias fracamente fluorescentes possa ser aumentada se elas forem posicionadas a uma distância apropriada de uma superfície metálica ou coloidal [164].

A importância das interações cromóforo-metal em espectroscopia óptica foi demonstrada por SERS, no qual as linhas de Raman são drasticamente aumentadas pela superfície metálica. A importância desse aumento pode ser vista em publicações sobre a detecção de DNA utilizando SERS, sem efeitos de ressonância [189-191]. O aumento é tão significativo que um único fluoróforo e um único nucleotídeo tem sido detectado por SERS [163, 192]. Adicionalmente, o aumento pode ser devido a uma pequena fração das partículas que exibem aumentos de até 10^{15} (*hot-dot*) [193, 194]. O SERS exige o contato da molécula com a superfície metálica. Parece provável que tais partículas também sejam descobertas por fluorescência intensificada por metal. Além disso, é provável que a fluorescência intensificada por metal (MEF) desenvolverá um campo análogo ao SERS. Note que o termo “fluorescência intensificada por superfície (SEF)” usualmente refere-se ao efeito da concentração do campo incidente, e não à modificação das taxas de decaimento radiativo dos fluoróforos.

2.15 Interação fluoróforos-partículas metálicas

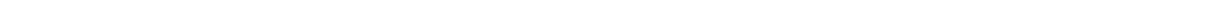
Vários grupos têm considerado os efeitos de esferóides metálicos sobre as propriedades espectrais de fluoróforos vizinhos [156, 187, 188]. Um modelo típico, assume a partícula como uma elipsóide metálica de razão de aspecto a/b , com um fluoróforo posicionado próximo dela. O fluoróforo está posicionado fora da partícula a uma distância r do centro da partícula e a uma distância d da superfície. O fluoróforo está posicionado no eixo maior e pode ser orientado paralela ou perpendicularmente à superfície metálica [164].

A presença da partícula pode ter efeitos dramáticos sobre a taxa de decaimento radiativo de um fluoróforo vizinho. O efeito mais notável é para um fluoróforo perpendicular à superfície de um esferóide com $a/b = 1,75$. Nesse caso a taxa radiativa pode aumentar por um fator de 1000 ou mais. O efeito é muito menor para uma esfera com $a/b = 1,0$, e muito menor ainda para um esferóide mais alongado com $a/b = 3,0$; quando a transição óptica não está em ressonância com a partícula. Nesse caso, a taxa de decaimento pode ser reduzida por um fator de 1000. Se o fluoróforo mostra um alto rendimento quântico ou pequeno valor de k_{nr} , esse efeito pode resultar em tempo de vida 100 vezes menor. As amplitudes desses efeitos dependem da localização do fluoróforo em torno da partícula e da orientação de seus momentos de dipolo relativos à superfície metálica. Presume-se que o efeito dominante da orientação perpendicular seja atribuído a um aumento do campo local ao longo do eixo maior da partícula.

Espera-se que a taxa de decaimento de um fluoróforo próxima a uma superfície de prata, por exemplo, dependa da orientação do dipolo relativa à superfície [170]. Na orientação paralela, o dipolo do metal cancela o dipolo do fluoróforo, o,0 que diminuiu o decaimento. Na orientação perpendicular, o dipolo do fluoróforo e o dipolo do metal são sinérgicos e aumentam a taxa de decaimento. Esse efeito de orientação resulta numa possibilidade incomum. Em quase todos os casos conhecidos, o decaimento de anisotropia de um fluoróforo representa o movimento do fluoróforo e é independente da intensidade. Para um fluoróforo próximo de uma superfície metálica plana ou de uma partícula metálica [164], o decaimento da intensidade estará acoplado ao decaimento de anisotropia. Por exemplo, o fluoróforo orientado principalmente na direção perpendicular à superfície de uma partícula decairá 1000 vezes mais rápido se ele puder rotacionar em vez de permanecer estacionário.

Para resumir essa sessão, superfícies metálicas podem aumentar as taxas de decaimento radiativo, aumentar os rendimentos quânticos, reduzir os tempos de vida, e

concentrar a emissão em pequenas distribuições angulares. O uso bem sucedido desses efeitos pode ter implicações que resultem numa larga variedade de métodos fluorescentes inéditos.



3 Materiais e métodos

3.1 Preparação das soluções

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água fornecida pelo sistema Milli-Q (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Nos experimentos que envolveram ajustes do pH do meio, a titulação foi feita com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, 1 M, 0,5 M e 0,25 M, através da adição de pequenas alíquotas (da ordem de alguns μL) na solução contendo a amostra. O pH foi monitorado pelos medidores de pH das marcas Tecnopon e Micronal, disponíveis em nossos laboratórios. As soluções de pHs foram adquiridas da Azlabor. Na preparação das soluções foram utilizadas vidrarias previamente lavadas com solução “piranha”. A quitosana (pó), soluções de ftalocianinas de cobre, zinco e ferro (1g/L) foram gentilmente fornecidas pelo Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos- IFSC/USP. BSA, sacarose, água oxigenada (H_2O_2), poli(hidrocloreto de alilamina)(PAH) (PM = 70 kg/mol), ácido fórmico e acetato de sódio, SDS, KAuCl_4 e triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.2 Preparação dos substratos

Foram utilizados substratos de vidro, ITO (Óxido de estanho dopado com índio), mica e quartzo, todos com dimensões em torno de 1 x 2 cm. Com exceção da mica e ITO, todos os outros substratos foram previamente tratados para obtermos uma superfície com caráter hidrofílico. O tratamento consiste de duas etapas: na primeira etapa, os substratos são colocados numa solução ácida de HCl, H_2O_2 e H_2O , na proporção de 1:1:6. Então, a solução foi aquecida e mantida entre 75-80°C por 10 minutos, e lavados em seguida com água milli-Q.

Na segunda etapa, os substratos foram levados a uma solução básica de NH_2OH , H_2O_2 e H_2O , na proporção 1:1:5, já previamente aquecida à temperatura de 75-80°C, e deixada nesta condição por 10 minutos. Após estas etapas, os substratos foram novamente lavados com água destilada, e secos com fluxos de vapor de nitrogênio. Os substratos foram adquiridos por intermédio do Grupo de Polímero do IFSC/USP.

3.3 Fabricação dos filmes

Todos os filmes foram fabricados pela técnica de automontagem (do inglês *Layer-by-Layer self assembly*, ou simplesmente LBL), que permite a obtenção de multicamadas em que as propriedades específicas de dois ou mais materiais podem ser controladas em nível molecular de maneira simples e versátil. A técnica de automontagem baseia-se na adsorção alternada de camadas nanométricas de materiais com cargas de sinais opostos. Desta forma, podem-se adsorver alternadamente espécies aniônicas e catiônicas sobre substratos sólidos de qualquer forma ou tamanho. Experimentalmente, um substrato sólido carregado negativamente, por exemplo, é imerso na solução catiônica e deixado por um certo intervalo de tempo, de maneira que uma camada de polycation se adsorva na superfície do substrato. Em seguida, o substrato é lavado com mergulhos em água Milli-Q para tirar o excesso de material, e seco com fluxo de gás de nitrogênio. No passo seguinte, o substrato é imerso na solução aniônica e deixado pelo mesmo intervalo de tempo envolvido na etapa anterior, promovendo a adsorção do poliânion na camada de polycation previamente adsorvida. O substrato, agora com duas monocamadas, é novamente lavado e secado. Obtém-se assim uma bicamada. A repetição do processo leva à fabricação de filmes compostos por quantas bicamadas forem desejadas.

Na fabricação dos filmes de quitosana/ftalocianina, o tempo de imersão nas soluções catiônicas e aniônicas foi de 5 minutos para cada uma delas. Este tempo foi escolhido baseado na literatura, a qual garante que, para os polieletrólitos utilizados por nós, a taxa de crescimento das monocamadas é zerada antes de 5 minutos; a mesma metodologia foi adotada na fabricação dos filmes de PAH/BSA. As leituras de absorção ópticas foram feitas a cada bicamada depositada para a verificação do crescimento, ou não, das bicamadas subsequentes. Todos os filmes foram fabricados no Laboratório de Fotobiofísica do DFM (FFCLRP-RP/USP).

3.4 Medidas de absorção óptica

Todas as medidas de absorção ópticas, tanto das soluções quanto dos filmes, foram realizados no espectrofotômetro UV –visível ULTROSPEC 2100 disponível no Grupo de Fotobiofísica do Departamento de Física e Matemática (FFCLRP/RP-USP). O equipamento opera no intervalo de comprimento de onda de 190- 900 nm. Sua fonte de luz é uma lâmpada de Xenônio. A luz emitida pela lâmpada passa por um monocromador e, posteriormente, é direcionada e focada no compartimento da amostra. O feixe de luz transmitido é enviado para a unidade detectora. Antes de cada leitura é necessária a eliminação do efeito do solvente ou do substrato quando for o caso. Para tanto, o programa responsável pela aquisição dos dados (Swift II) o faz mediante a prévia obtenção do espectro do solvente ou do substrato.

3.5 Medidas de fluorescência estática

As medidas de fluorescência estática foram realizadas no espectrofluorímetro SLM AMINCO 8100. O aparelho consiste de uma lâmpada de Xenônio, responsável pelo feixe de

excitação da amostra, que emite nos comprimentos de onda UV-Vis e de um sistema de detecção composto por três fotomultiplicadoras, das quais uma é utilizada apenas para o controle do espectro de emissão da lâmpada. As demais podem ser usadas tanto na geometria T (ambas simultaneamente) quanto como na geometria L (individualmente). Para a leitura em filmes, o porta amostra foi substituído por um porta filme. Os filmes são dispostos num ângulo de 23° com a linha de detecção do equipamento. Este é o ângulo que otimiza a relação fluorescência /reflexão. Dessa forma, podemos melhorar o sinal em detrimento à redução do feixe refletido.

A intensidade da luz incidida sobre a amostra é controlada através de um conjunto de três fendas, dispostas no caminho do feixe de excitação. Monocromadores no caminho do feixe de excitação e emissão permitem a seleção do comprimento de onda desejado.

Como toda proteína, a BSA absorve na região de 190-200 nm devido à ligação peptídica. Ela também absorve em 276 nm por causa das tirosinas, e tem uma banda de 280 a 300 nm por causa dos triptofanos. Porém, devido a limitações na lâmpada de excitação do fluorímetro com resolução temporal, fomos forçados a usar um comprimento de onda de excitação de 295 nm, apesar da BSA possuir o máximo de absorção em 276 nm. Por isso, a maioria dos experimentos de excitação no fluorímetro estático foi executada também em 295 nm. Para evitar o efeito de espalhamento, utilizamos o “branco” que é sempre descontado dos valores medidos para a amostra.

3.6 Medidas de fluorescência com resolução temporal

As medidas de decaimento da intensidade de fluorescência das soluções e dos filmes foram feitas com um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de correlação temporal de fótons (TCSPC). O método consiste em excitar a amostra com pulsos

de luz, onde os fótons da excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. Os princípios dessa técnica podem ser compreendidos examinando-se o esquema experimental da Figura 4.

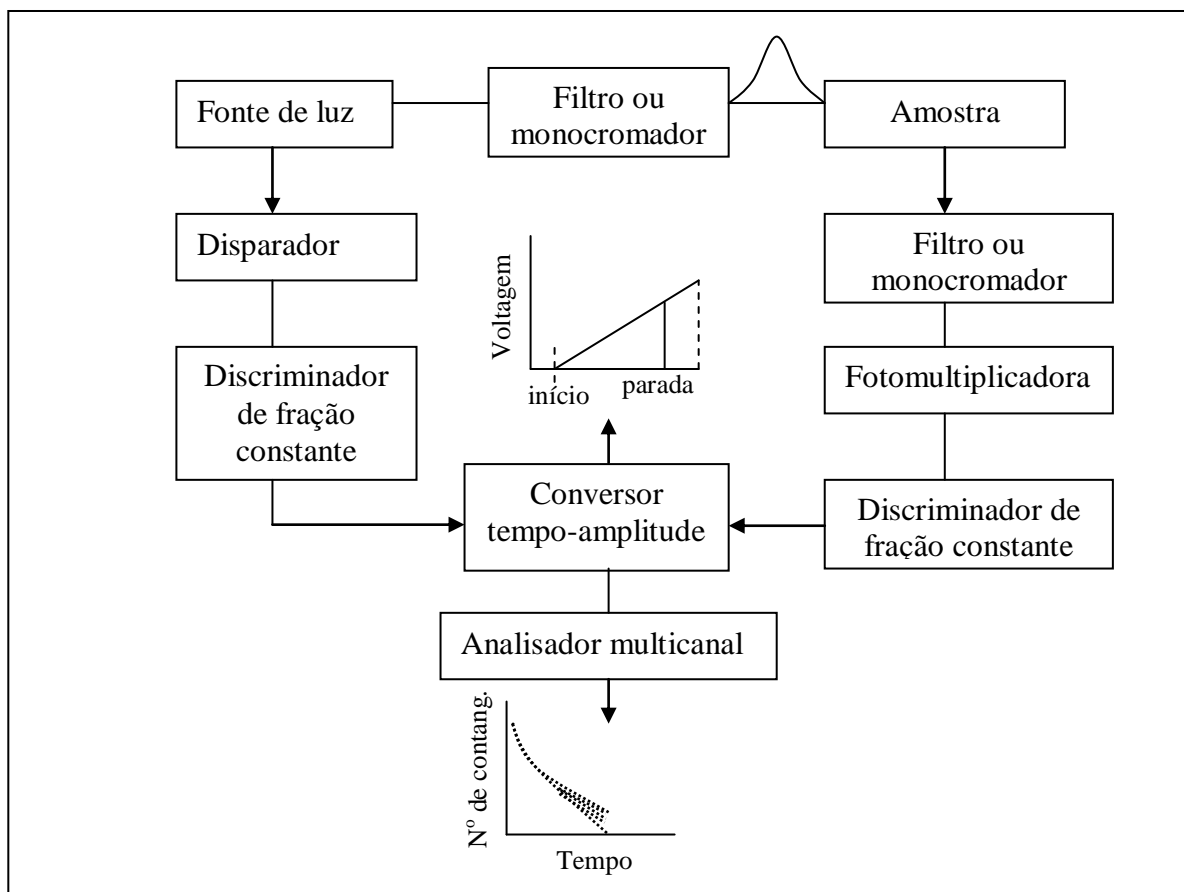


Figura 4 Representação esquemática da técnica de correlação de fótons únicos.

Para as medidas com os filmes, o porta-amostra foi alterado para permitir que o feixe de luz incidisse diretamente na superfície dos filmes.

O experimento começa com um pulso de excitação incidindo sobre a amostra. O TCSPC é uma técnica digital que conta fótons correlacionados temporalmente em relação ao pulso de excitação. O ponto central do método está no conversor tempo-amplitude, ou *Time-to-Amplitude Convert* (TAC). A amostra é excitada repetitivamente usando-se uma fonte de luz pulsada, geralmente um laser. Cada pulso é opticamente monitorado por um fotodiodo ou fotomultiplicadora para produzir um sinal inicial que é usado para disparar a rampa de tensão

do TAC. A rampa de tensão pára quando o primeiro fóton proveniente da fluorescência da amostra é detectado (sinal de parada). O TAC gera então um pulso de saída, cuja voltagem é proporcional ao tempo entre o sinal inicial e o sinal de parada. Um analisador multicanal (MCA) converte esse valor de tensão em uma entrada digital em um canal de tempo usando um conversor analógico-digital. Somando sobre todos os pulsos, o analisador multicanal constrói um histograma de contagens versus canais de tempo. O experimento continua até que se tenha coletado aproximadamente 10000 contagens no canal do pico. Durante a aquisição dos dados, não deve haver mais de um fóton detectado a cada cem pulsos de laser. Isso porque a eletrônica dessa técnica permite somente a detecção do primeiro fóton que chega. Uma vez que esse primeiro fóton é detectado, o tempo morto da eletrônica impede a detecção de outro fóton proveniente do mesmo pulso de excitação. Logo após o pulso de excitação, são emitidos muito mais fótons com tempos curtos do que fótons com tempos longos. Se todos pudessem ser medidos, então o histograma dos tempos de chegada representaria o decaimento da intensidade. No entanto, se muitos fótons chegam e somente o primeiro é contado, o decaimento da intensidade seria distorcido e apresentaria um tempo muito curto. Por isso é que se faz necessária a detecção de somente 1% dos fótons de chegada em relação aos fótons do pulso de excitação.

O sistema utilizado para a excitação consiste de um conjunto de lasers. No início do processo, um laser de diodos que emite dois feixes em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO₄-*Millenia Xs-Spectra Physics*) que, por sua vez, emite em 1064 nm. Em seguida, este feixe passa por um cristal dobrador de frequências; o feixe resultante, de comprimento de onda igual a 532 nm e cuja potência pode chegar a 10 W, bombeia um laser de titânio-safira (*Tsunami-Spectra Physics*); o cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com larguras de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-

refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída; passando por um sistema selecionador de frequência, onde ondas eletromagnéticas estacionárias em um cristal atuam como uma rede de difração. Tais pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequência entre 0,01 e 8 MHz, que são mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos. Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de várias amostras biológicas, que vai de 280 até 330 nm. O sinal detectado com o pulso de excitação, chamado IRF (*instrument response function*), tem largura total a meia altura de 60 ps.

3.7 Síntese das nanopartículas de ouro

Todas as nanopartículas de ouro foram sintetizadas por meio de redução química e estabilizadas em quatro sistemas distintos. Em metade deles, o próprio agente redutor agiu como estabilizador. A formação das nanopartícula foi acompanhada pela mudança de cor da solução de amarelo para vermelho vinho e pela forte presença da banda plasmônica em torno de 530 nm. O tempo de formação das nanoparticulas pode durar de poucos segundos a algumas horas. Mais detalhes sobre cada método de fabricação será apresentado nos resultados e discussões.

4 Resultados e discussões

A proposta do nosso trabalho é estudar a interação entre biomoléculas e substratos sintéticos na forma de filmes e na forma de agregados em solução por meio da técnica de fluorescência.

Dentre as técnicas de incorporação de biomoléculas em superfícies sólidas existentes, escolhemos a técnica LBL devido à sua simplicidade e baixíssimo custo de implantação, além da possibilidade de combiná-la à espectroscopia de UV-VIS, disponível no nosso grupo, utilizada na observação do crescimento dos filmes.

É importante salientar que a viabilidade de parte do nosso estudo está profundamente ligada à adsorção das proteínas (adsorbato) nos substratos em quantidades que gerem principalmente sinais de fluorescência mensuráveis. Assim, o primeiro passo foi estudar os potenciais candidatos a substratos quanto à influência destes na taxa de adsorção do adsorbato sobre as suas superfícies, uma vez que há vários trabalhos que evidenciam a importância da superfície do substrato na interação com os polieletrólitos, principalmente nas primeiras bicamadas dos filmes LBL.

É bem conhecido que as biomoléculas são biopolímeros que possuem ponto isoelétrico (PI) peculiares. Dependendo do PI, podemos deixá-la carregada positiva ou negativamente variando apenas o pH de sua solução. Dessa forma, é possível combiná-las com polieletrólitos, tanto positivos como negativos via interação eletrostática sobre um determinado substrato por meio da técnica LBL. Neste contexto, inicialmente estudamos três eletrólitos bastante citados na literatura: os polieletrólitos positivos quitosana, poli(alilamina hidrocloreto)(PAH) e os eletrólitos negativos ftalocianinas de níquel, cobre e zinco (eletrólito negativo), cujas estruturas são mostradas na Figura 5, os quais são muito frequentemente utilizados em filmes automontados pela técnica já mencionada. Isso foi feito com o objetivo de se estudar a possibilidade da substituição de um dos eletrólitos pela BSA na confecção

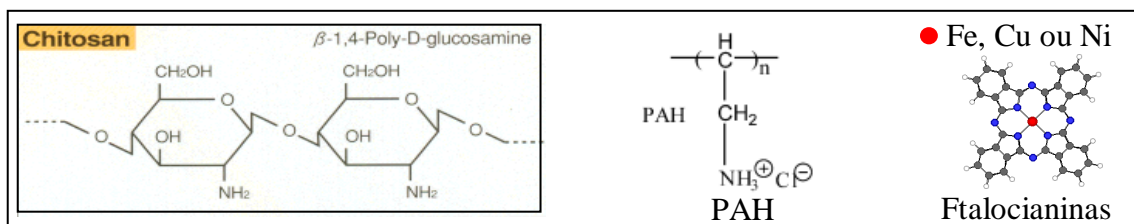


Figura 5- Estrutura molecular da quitosana, poli(hidrocloro de alilamina)-PAH e ftalocianinas.

dos filmes LBL. Os substratos estudados foram o vidro, quartzo, ITO e mica. O vidro foi escolhido por seu baixo preço e facilidade de aquisição; o quartzo, por possuir uma grande janela ótica; o ITO, por suas propriedades de condutividade, úteis em eventuais medidas elétricas; e a mica, por suas propriedades topográficas que são ideais para a microscopia de força atômica.

4.1 Caracterização óptica dos materiais por espectroscopia UV-Vis

Uma vez que o crescimento dos filmes automontados será observado por intermédio das propriedades ópticas (absorbância) de seus componentes, torna-se indispensável o conhecimento das regiões do espectro eletromagnético nas quais estes absorvem. A Figura 6 mostra os espectros de absorção das soluções de ftalocianinas de cobre, níquel e ferro, obtidos em função do aumento de suas concentrações. A Figura 7 mostra os espectros dos substratos

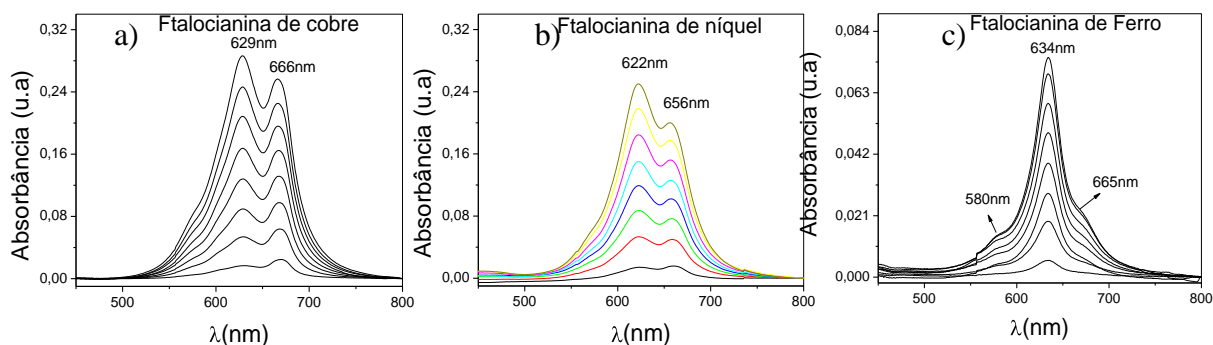


Figura 6- Espectros de absorção das ftalocianinas em função da concentração em solução aquosa. Ftalocianina de cobre; b) ftalocianina de níquel; c) ftalocianina de ferro. As medidas foram realizadas com as concentrações variando de 45 a 640 μ M, com alíquotas de 85 μ M.

de vidro, ITO, mica e quartzo.

As Figuras 6(a) e 6(b) mostram um aumento considerável das bandas de absorção em 629 nm e 622 nm, respectivamente, com o aumento de suas respectivas concentrações, promovendo uma inversão dos picos principais de absorção. Muito provavelmente, as mudanças de perfil observadas nesses espectros sejam devidas à formação de agregados tipo H[195]. Isto indica que a concentração destas ftalocianinas poderá interferir positiva ou negativamente na sua taxa de adsorção. Ao contrário das demais ftalocianinas discutidas, a ftalocianina de ferro manteve a posição do máximo de absorção em 634 nm. Note que as ftalocianinas possuem uma larga banda de absorção na região compreendida entre 500 e 800 nm (Fig. 6), enquanto a quitosana absorve muito pouco nesta região (Fig. 7). Assim, utilizamos essa região para monitorar, via medidas de absorbância, o crescimento dos

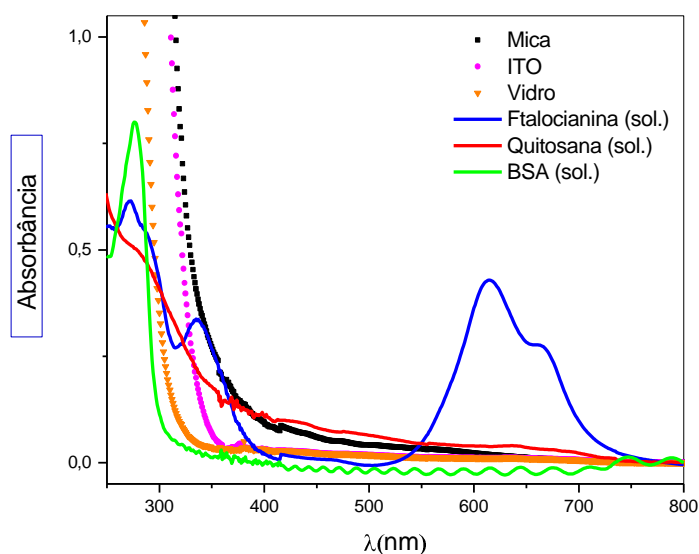


Figura 7- – Espectros de absorção UV-Vis dos polieletrólitos e dos substratos estudados.

filmes automontados com quitosana e ftalocianinas. Observe também que a BSA possui um pico de absorção situado em 276 nm, muito antes da janela de trabalho dos substratos de mica, ITO e vidro. A utilização da espectroscopia UV-vis no acompanhamento do crescimento de filmes de BSA fica condicionada, então, à utilização de um polieletrólito que possua bandas de absorção situadas em regiões acima de 350 nm, como as ftalocianinas, por

exemplo. Com relação à quitosana, é notável a sua baixa absorvência na região de interesse. Isto a torna pouco indicada para o monitoramento do crescimento do filme, muito embora ela seja um bom polieletrólito para a fabricação desse tipo de filme.

A Figura 8 mostra a comparação entre os coeficientes de absorção relativos (inclinação das retas) das ftalocianinas de cobre, ferro e níquel. A ftalocianina de ferro possui o menor coeficiente de absorção dentre as outras três, sendo que as ftalocianinas de cobre e níquel são as que possuem maiores coeficientes de absorção, apresentando valores próximos. Portanto, a resposta do espectrofotômetro ao crescimento dos filmes é mais eficiente para estas.

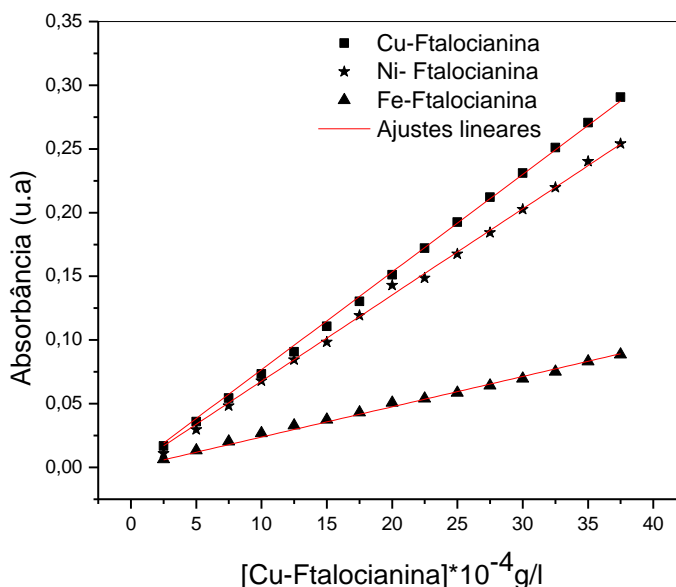


Figura 8- Gráfico da variação da absorvência em função da concentração das ftalocianinas de cobre, níquel e ferro; todas em solução aquosa.

4.1.1 Fabricação e caracterização dos filmes de quitosana/ftalocianinas depositados sobre substrato de vidro.

É bem conhecido da literatura [196, 197] que o substrato promove vários efeitos sobre as primeiras camadas dos polieletrólitos depositados pela técnica de automontagem. Os efeitos mais citados são: redução ou aumento na espessura das bicamadas, e variação na taxa

de deposição, que pode ser reduzida ou até mesmo aumentada. Assim, experimentos foram realizados para averiguar qual, dentre os substratos aqui estudados, proporcionaria maior taxa de crescimento. Na Figura 7, podemos notar que todos os substratos absorvem significativamente somente abaixo de 350 nm, nos proporcionando uma grande liberdade para executarmos as medidas de absorção óptica de filmes que possuam componentes que absorvam em comprimentos de onda maiores que 350 nm.

Monocamadas alternadas de quitosana e ftalocianinas de cobre, níquel e ferro foram fabricadas sobre substratos de vidro a partir de soluções a 0,5 g/L em $\text{pH} = 4,0$. Estes parâmetros foram adotados por causa da quitosana, que se dissolve em água somente em pHs baixos e em baixas concentrações. Para cada monocamada, o substrato, previamente hidrofiliado, foi imerso nas soluções iônicas por 5 min, e secados por aproximadamente 1,5 minutos. Esses parâmetros foram obtidos da literatura[198]. A cada bicamada, os filmes foram levados para medidas de absorbância. Os resultados obtidos dos experimentos são mostrados na Figura 9. Comparando as Figuras 6 e 9, podemos observar que os filmes fabricados com ftalocianinas de cobre e níquel exibiram máximos de absorbância deslocados de 10 nm, em média, para a região do azul. A banda de maior intensidade é a de menor comprimento de onda, mesmo com pequeno número de bicamadas, e não houve inversão nas intensidades das bandas de absorção em nenhuma das ftalocianinas, ao contrário do observado em solução. Isto reforça a suposição inicial de que a inversão das bandas de absorção, observada na Figura 6, possa ser atribuída à formação de agregados tipo H, visto que, no substrato, os monômeros estão muito mais próximos do que em solução, possibilitando, assim, a formação de agregados maiores, o que explica o deslocamento do máximo da banda principal nos filmes. Por outro lado, como os filmes foram fabricados com soluções de ftalocianinas a concentrações consideravelmente altas, onde há uma maior concentração de agregados, é possível também que os filmes sejam formados por agregados previamente

formados na solução. Observamos que o crescimento se deu quase linearmente em todos os casos. Pequenos desvios na

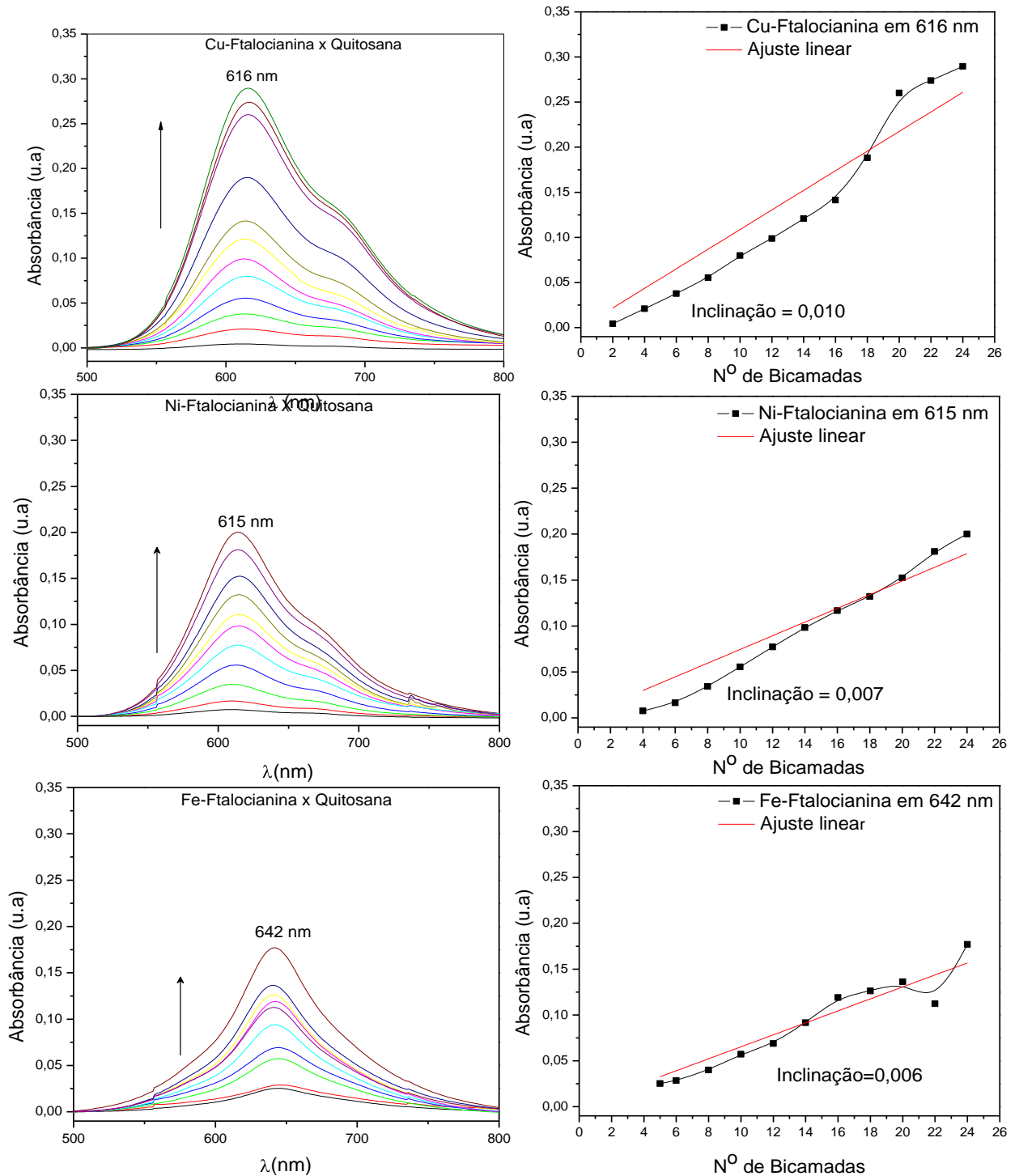


Figura 9— Absorbância das primeira 24 bicamadas de Quitosana-Ftalocianinas de Cu, Ni e Fe sobre vidro, mostradas na coluna à esquerda e de cima para baixo, respectivamente. A coluna à direita mostra os picos de absorvâncias em função do n° de bicamadas dos filmes.

são atribuídos a erros operacionais. Quanto ao filme fabricado com ftalocianina de ferro, ao contrário dos outros dois, e apresentou um deslocamento de 8 nm para a região do vermelho em seu máximo de absorção. Isso nos leva a acreditar que o filme tenha sido formado com agregados do tipo J [195].

Não podemos deixar de mencionar a presença da quitosana no espectro de absorção, pois ela possui uma larga banda de absorção, compreendida em todo o intervalo do espectro estudado, como mostrado na Figura 10. Isso pode modificar, ainda que moderadamente, o perfil do espectro de absorção dos filmes.

O filme fabricado com ftalocianina de cobre apresentou maior absorção, após 24 bicamadas, seguido do filme fabricado com níquel e ferro (Fig. 9). No entanto, não se pode afirmar que isto se deva à formação de uma maior quantidade de ftalocianina de cobre depositada relativamente às demais utilizadas. Isto é atribuído ao fato da ftalocianina de cobre possuir maior coeficiente de absorção (Fig. 8), visto que este é diretamente proporcional à inclinação da reta formada pela variação da absorbância em função da concentração. Dentre os filmes fabricados, o que apresentou um crescimento mais ordenado, ou seja, a mesma quantidade de material depositado a cada ciclo foi o filme fabricado com Ni-ftalocianina (Fig. 9).

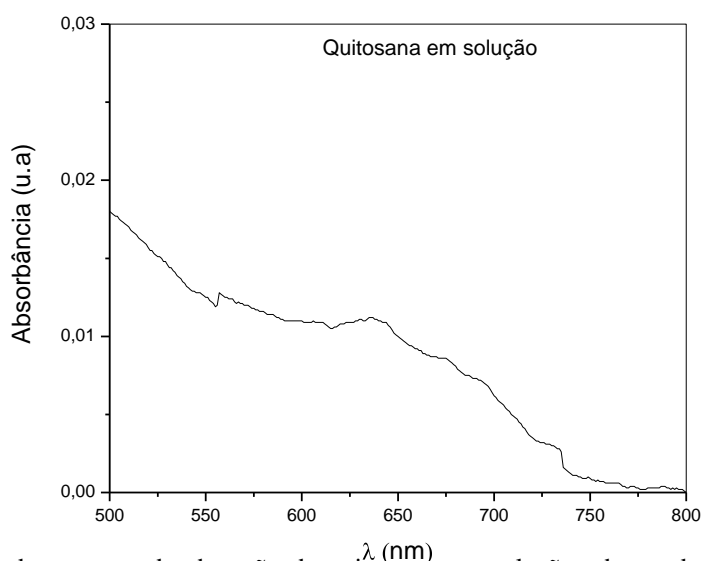


Figura 10 -Ampliação do espectro de absorção da quitosana, em solução, observado na mesma região do espectro em que ocorre absorção pelas ftalocianinas.

4.1.2 Microscopia óptica dos filmes de quitosana/ftalocianinas

As imagens de microscopia óptica são mostradas na Figura 11. O filme fabricado com ftalocianina de níquel é visivelmente mais homogêneo. Além disso, a ftalocianina de níquel possui o segundo maior coeficiente de absorção entre as três ftalocianinas estudadas.

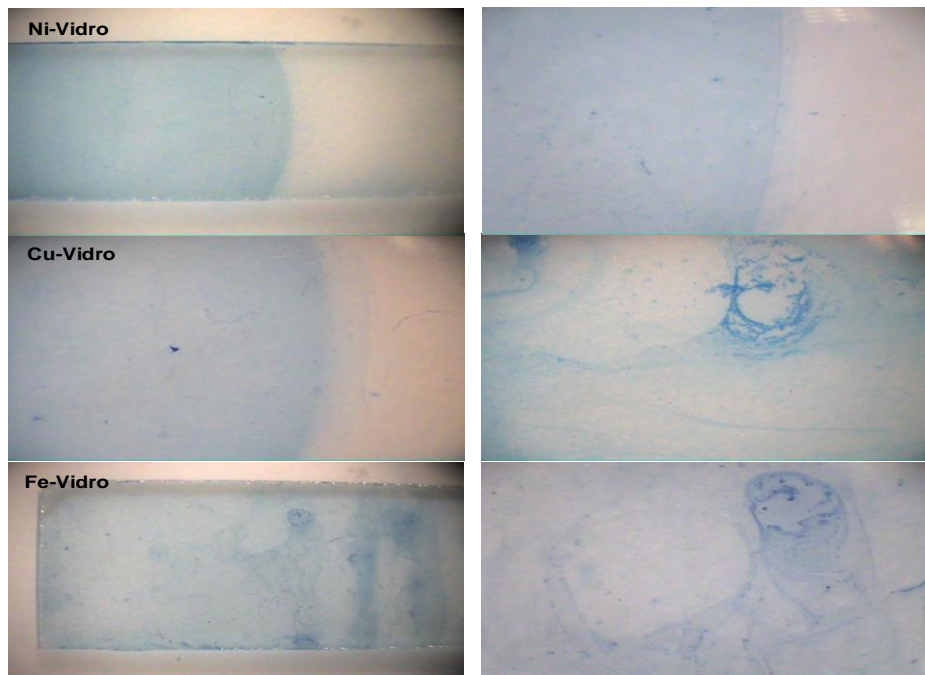


Figura 11- Imagens de microscopia óptica dos filmes de quitosana/ftalocianinas de Fe, Ní e Cu. A coluna direita é uma ampliação da coluna esquerda.

4.1.3 Estudo da influência dos substratos sobre os filmes de quitosana/ftalocianina de níquel

O estudo da influência dos substratos de mica, ITO, quartzo e vidro na taxa de crescimento dos filmes foi realizado com a ftalocianina de níquel devido às características citadas anteriormente. A Figura 12 mostra os resultados de absorção óptica destes experimentos. Os dados não apresentam evidências claras de mudanças na taxa de deposição das bicamadas com o crescimento do número de bicamadas em nenhum dos substratos

utilizados, visto que as inclinações das curvas de deposição basicamente se mantiveram constantes ao longo do crescimento dos filmes. O crescimento se deu de forma razoavelmente

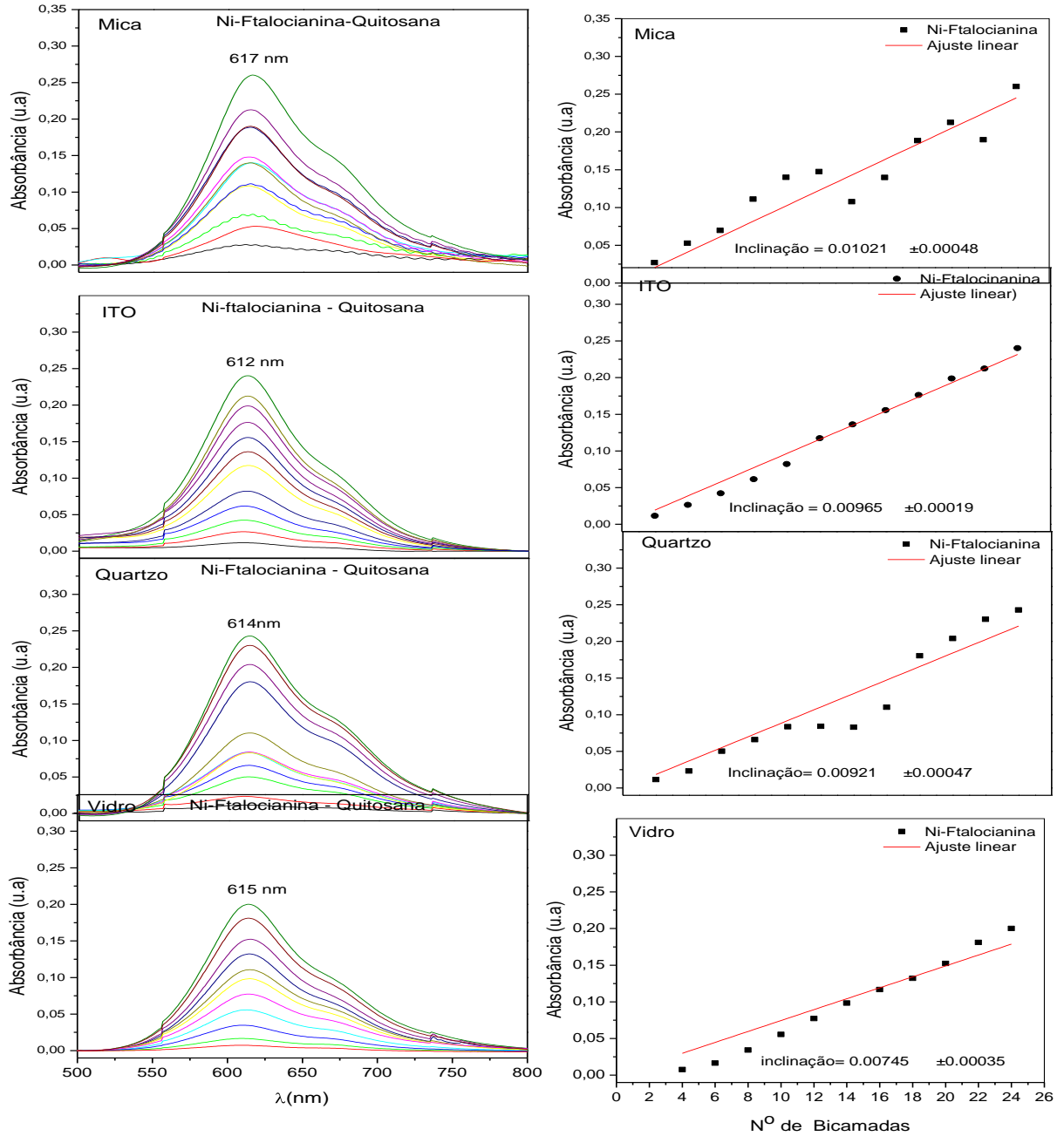


Figura 12- Absorbâncias das primeiras 24 bicamadas dos filmes de quitosana/Ni-ftalocianina depositados sobre substratos de mica, ITO, quartzo e vidro, na coluna esquerda. Na coluna direita, é mostrada a variação da absorbância.

linear, pelo menos nas primeiras 10 camadas (Fig. 13), e as inclinações das curvas para cada substrato são notavelmente distintas entre si nessa região. Isto é uma evidência do efeito dos substratos nas primeiras bicamadas. Uma possível explicação para o fato de a mica apresentar

maior taxa de deposição, em relação aos demais substratos, pode ser dada com base no número de sítios carregados. Assim, a mica teria o número de sítios ligantes maior do que aquele para os demais substratos, aumentando o número de monômeros do policátion

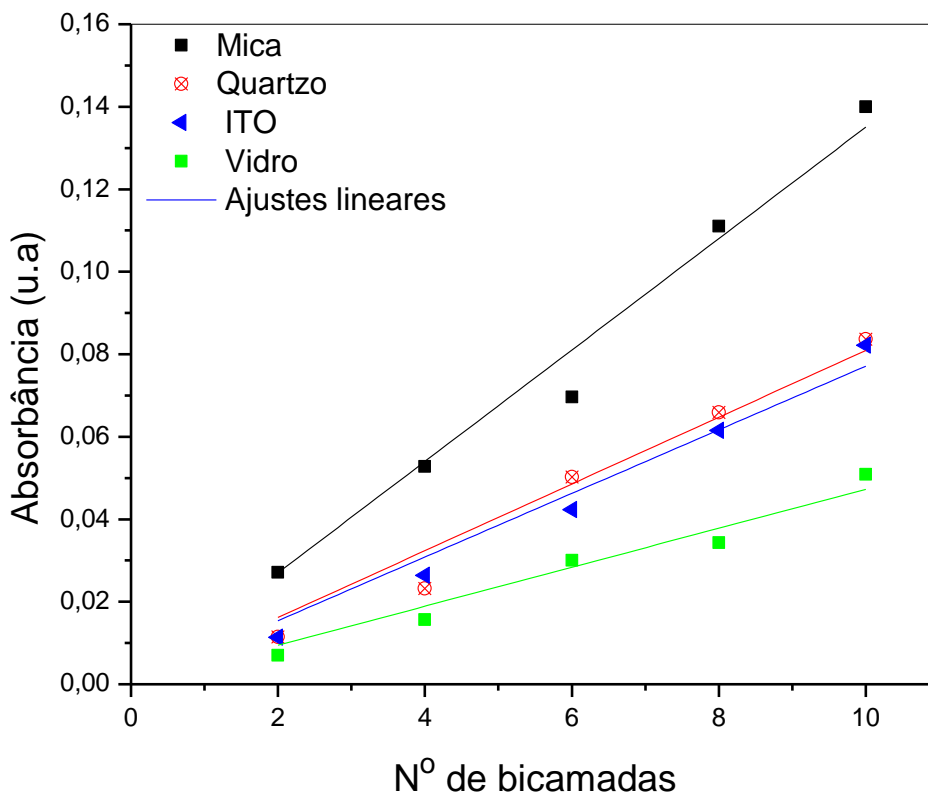


Figura 13- Comparação entre as curvas de absorbância das primeiras 10 bicamadas dos filmes de quitosana/Ni-Ftalocianina depositadas sobre mica, quartzo, ITO e vidro.

depositados na primeira monocamada, o que se refletiria nas monocamadas subsequentes, resultando numa maior quantidade de monômeros no final das dez camadas e, conseqüentemente, maior absorbância. A divergência nas absorbâncias das camadas seguintes, em relação as primeiras, pode estar associada à redução do efeito do substrato, ou ao fato delas terem sido fabricadas no dia seguinte, onde o equipamento foi desligado, havendo a necessidade de um novo “branco”, porém de um outro substrato.

4.1.4 Microscopia de força atômica do filme de quitosana/ftalocianina de níquel

A Figura 14 mostra imagens de microscopia de força atômica (AFM) de 24 bicamadas de quitosana/Ni-ftalocianina depositadas sobre vidro. As imagens da Figura 12-a), mostram um filme com rugosidade muito baixa, quando obtidas pelo módulo de tensão. Porém, quando obtidas no módulo de fase (Fig.12-b), o filme apresenta duas regiões distintas. Estas duas regiões podem ser sítios de quitosana e ftalocianina, mas não podemos afirmar com certeza, apenas com base em medidas de AFM.

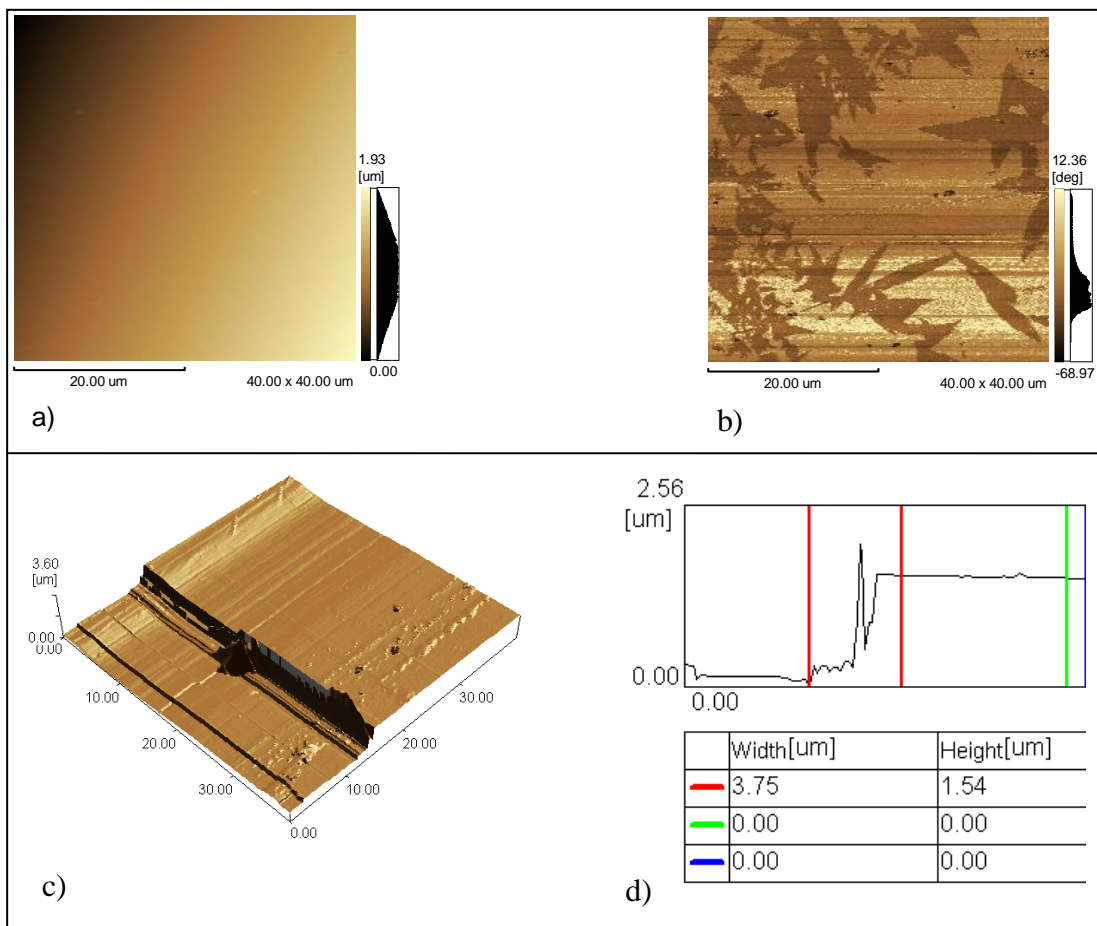


Figura 14- Microscopia de força atômica (AFM) do filme de 24 bicamadas de quitosana/Ni-ftalocianina fabricadas sobre substrato de vidro. a) AFM no módulo de tensão do filme; b) AFM no módulo de fase; c) AFM no módulo de fase do perfil do risco feito para a realização da medida da espessura do filme; d) dados fornecidos pelo equipamento.

Para medir a espessura, o filme foi riscado com uma gilete e, então, feita a medida de seu perfil (Fig. 14c). A espessura foi estimada em 1540 nm, o que dá uma média de 64 nm por bicamada.

4.2 Fabricação e caracterização dos filmes de PAH/ftalocianina de níquel

Sempre com o objetivo de maximizar a taxa de deposição da BSA nos substratos, fabricamos filmes de ftalocianina de níquel com poli(alilamina hidroclorada)(PAH) (2g/L) em pH 8,0 e quitosana depositados sobre substrato de quartzo. Em ambos os casos, foram utilizadas soluções de ftalocianina e quitosana em concentrações a 0,5 g/L, em pH 4,0. A Figura 15 mostra os resultados dos dois filmes. Com apenas 6 bicamadas PAH/Ni-Ftalocianina, a absorbância quase se iguala àquela de 24 bicamadas de quitosana/Ni-Ftalocianina. Isto indica que o PAH, como policátion, é quase 4 vezes mais eficiente que a quitosana.

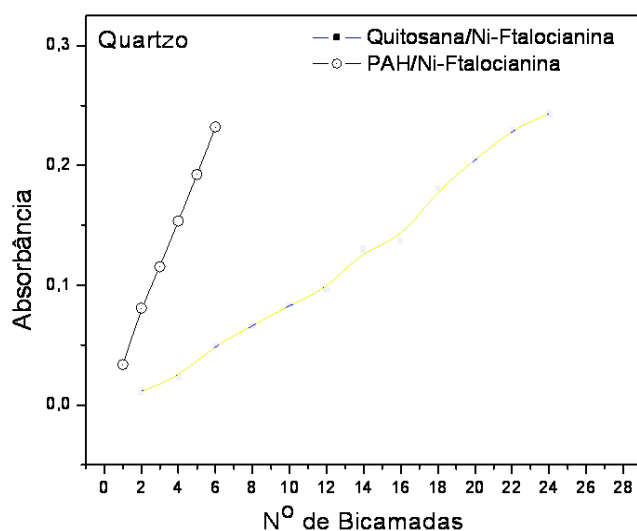


Figura 15- Comparação entre as absorbâncias das bicamadas quitosana/Ni-ftalocianina e PAH/Ni-ftalocianina depositadas sobre substrato de quartzo.

4.3 Supressão da fluorescência da BSA pela ftalocianina

Um fator importante para o crescimento de filmes LBL está relacionado com a capacidade de seus componentes em se complexarem em solução. Nesse sentido, foram realizados experimentos para averiguar a possibilidade de formação de complexos de BSA com ftalocianina e de BSA com quitosana. O estudo se deu pela supressão de fluorescência da BSA, tendo como supressores a ftalocianina e a quitosana. Nessa seção estudamos a ftalocianina como supressor da BSA.

A Figura 16 mostra os espectros normalizados de absorção e emissão da BSA em solução aquosa, pH em torno de 7,0. Embora o pico de absorção da BSA esteja em 276 nm, as amostras foram excitadas em 295 nm, visando a utilização da intensidade máxima do harmônico do fluorímetro dinâmico, e a leitura foi obtida em 345 nm.

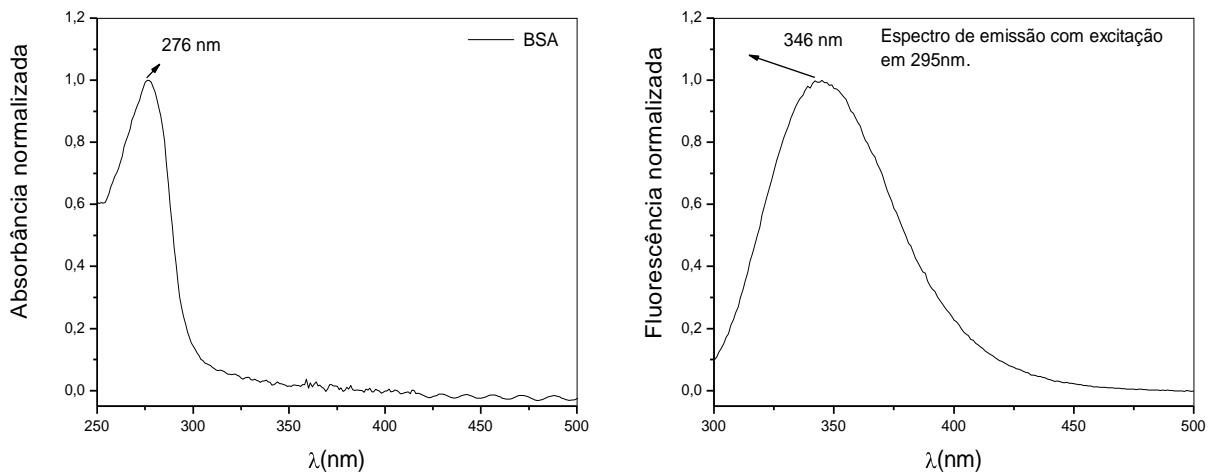


Figura 16- Espectros de absorção e emissão da BSA normalizados. A amostra foi excitada em 295 nm e leitura obtida em 345 nm.

Os experimentos de supressão foram realizados com concentração de ftalocianina variando em alíquotas de 0,85 μ M numa solução de BSA (15 μ M). A Figura 17 mostra as curvas de Stern-Volmer da fluorescência estática e dinâmicas da solução de BSA, com a Ni-

ftalocianina agindo como supressor de fluorescência. Segundo a teoria, caso a curva de Stern-Volmer seja uma reta inclinada, sua inclinação será proporcional à taxa de supressão, que pode estar associada ao processo de formação de complexos ou ao processo colisional. Por outro lado, se em vez de uma reta, a curva obedecer a um polinômio de grau dois, então pode estar acontecendo simultaneamente os dois processos com taxas distintas, ou pode estar havendo ainda o efeito filtro. Neste caso, a curva obedecerá à equação do tipo $y = (1 + Ax).e^{Bx}$, na qual A é a taxa de supressão estática ou dinâmica, e B é o coeficiente de atenuação da fluorescência devido à absorção ou espalhamento promovido pelo supressor.

A curva de Stern-Volmer obtida com o fluorímetro estático (curva vermelha) pode ser ajustada tanto com a um polinômio de grau dois quanto com a equação que descreve o efeito filtro, o que deixa uma margem de dúvida. Com os experimentos de fluorescência dinâmica é possível verificar a presença ou não da supressão estática. Se a curva de Stern-Volmer, construída com o tempo de vida médio da fluorescência, resultar numa reta de inclinação nula, indicará que há formação de complexos não fluorescentes (supressão estática); do contrário, a supressão é dinâmica. Os resultados indicam que há supressão estática, já a inclinação da curva foi aproximadamente zero (curva em quadrados, Fig. 17). Com isso, concluímos que há formação de agregados estáveis de BSA e Ni-ftalocianina em pH próximo de 7,0. Além disso, a Ni-ftalocianina possui uma banda de absorção bastante intensa na região de emissão da BSA. Isto fortalece a hipótese da existência concomitante do efeito filtro na solução.

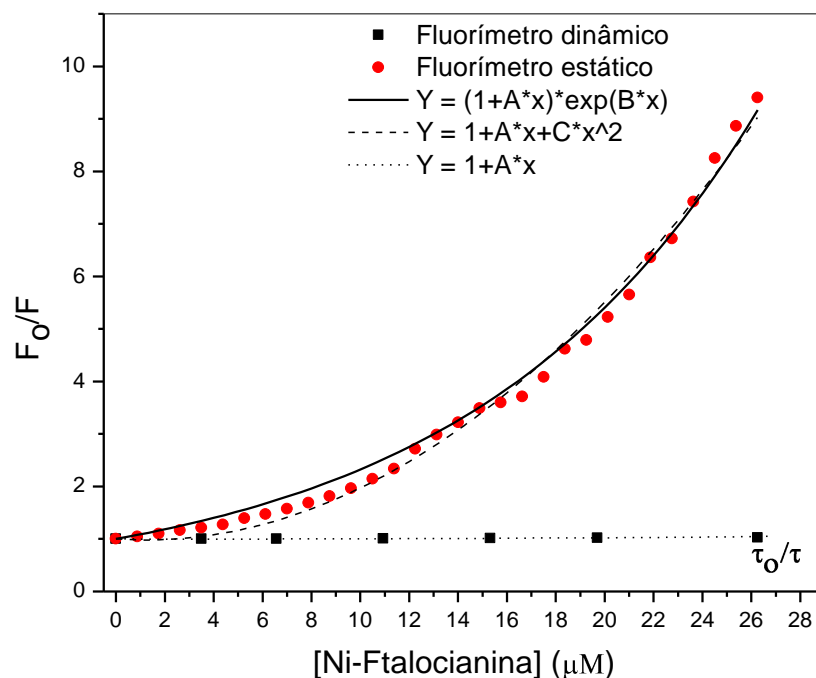


Figura 17- Curva de Stern-Volmer da supressão da BSA (15μM) em solução aquosa (água Millil-Q), usando Ni-ftalocianina como supressor. A amostra foi excitada em 295 nm e a leitura obtida em 345 nm.

4.4 Supressão da fluorescência da BSA pela quitosana

Os dados do experimento realizado com quitosana (1g/L) agindo como supressor da BSA são apresentados na forma de curva de Stern –Volmer, na Figura18. Os parâmetros experimentais foram os mesmos do experimento anterior. Note que, no geral, a curva é linear. Isto sugere a ausência total ou parcial do efeito filtro, já que a quitosana absorve muito pouco na região de emissão da BSA. Além disso, podemos inferir que existe apenas um tipo de supressão, provavelmente aquela resultante da formação de complexos BSA/quitosana.

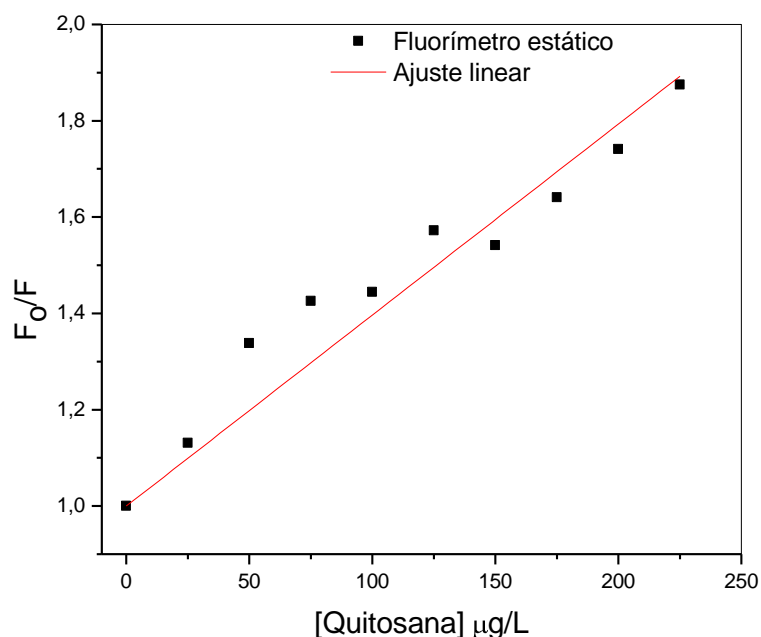


Figura 18– Curva de Stern-Volmer da supressão da BSA (15 µM) em solução aquosa (água Milli-Q), usando quitosana como supressor. As amostras foram excitadas em 295 nm e a leitura obtida em 345 nm.

4.5 Filmes LBL de quitosana/BSA em substratos sólidos

Segundo a literatura[199, 200], a BSA possui PI em torno de 4,7 a 5,0, portanto, está carregada negativamente em pH = 7,0. Isto sugere a possibilidade dela se ligar eletrostaticamente à quitosana (policátion)[198] num filme automontado. Então, fabricamos primeiramente um filme de oito bicamadas de quitosana/Ni-ftalocianina, terminado em quitosana, para aumentar as chances de o substrato estar completamente coberto, reduzindo, assim, o efeito do substrato e aumentando a densidade de carga na superfície. Foi feito o branco das oito bicamadas. A partir daí, o crescimento do filme se deu com BSA e quitosana por mais 10 bicamadas. O tempo de imersão em cada solução foi mantido em 5 min. As medidas foram obtidas em 285 nm. A Figura 19 mostra um tímido aumento de aproximadamente 0,08 na absorbância do filme após dez bicamadas. Note que a

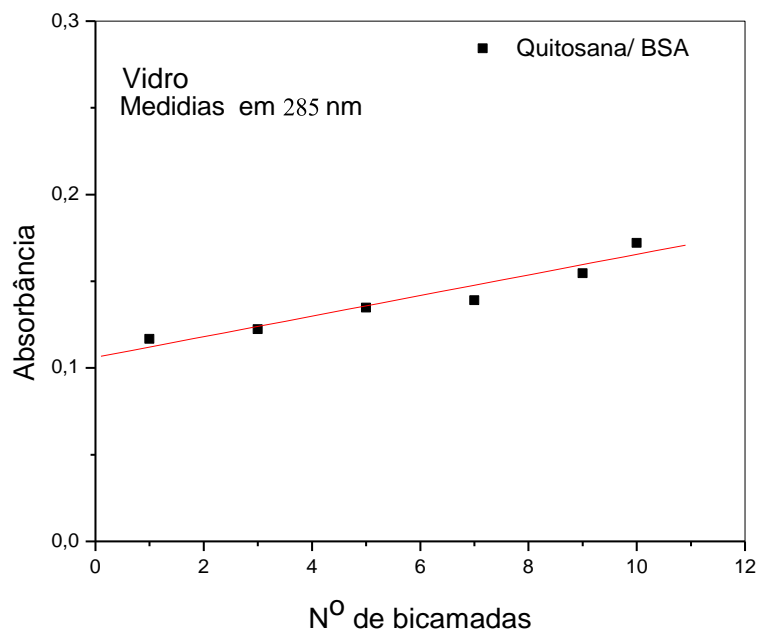


Figura 19- Absorbância das bicamadas do filme quitosana/BSA fabricado sobre oito bicamadas de quitosana/Ni-ftalocianina depositadas sobre substrato de vidro.

absorbância da primeira bicamada indica uma deposição efetiva relativamente boa. No entanto, a taxa de crescimento foi muito baixa. O aumento da absorbância após as dez bicamadas poderia ser maior se as medidas tivessem sido obtidas na região de absorção máxima da quitosana: em 276 nm. Mas isto não é possível, quando se lida com vidro, devido à sua fortíssima absorção nesta região, o que lhe confere uma transparência de menos de 10 % (Fig. 7). Este problema pode ser resolvido se o substrato for substituído por quartzo, que é completamente transparente para quase toda a região do UV-Vis. Repetimos, então, o mesmo experimento, mas com a diferença de as bicamadas serem depositadas diretamente sobre o quartzo e sobre mica (Fig. 20). Nos filmes depositados sobre a mica, as medidas de absorbância foram tomadas em 305 nm porque, para comprimentos de onda imediatamente menores, a absorbância da mica atinge o limite máximo de confiabilidade do equipamento (Fig. 7). Sobre o substrato de mica, o filme cresceu a uma taxa muito pequena, enquanto o filme crescido sobre o substrato de quartzo não apresentou evidência claras de crescimento, apesar de a leitura ter sido obtida na região de máxima absorção da quitosana. Acreditamos

que, apesar dos estudos indicarem a afinidade da quitosana com a BSA em solução, nos filmes a dinâmica possa ser diferente, visto que a primeira monocamada de BSA depositada é submetida posteriormente a uma solução de quitosana em pH 4,0. O efeito do pH da solução da quitosana pode estar reduzindo ou anulando as cargas da BSA depositada. Assim, nas condições nas quais os filmes foram fabricados, a quitosana parece não ser um bom polieletrólito para a adsorção de BSA em filmes automontados.

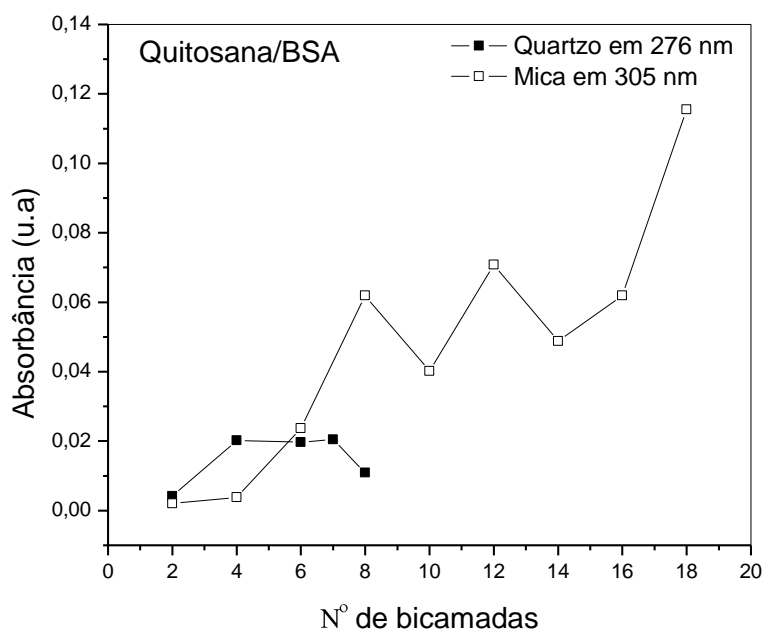


Figura 20– Absorbância das bicamadas do filme quitosana/BSA fabricado sobre substratos de quartzo e mica.

Outro ponto a ser levantado é se o PI da BSA utilizada é realmente igual ao citado na literatura, assim estaríamos realizando experimentos com BSA carregada de forma diferente daquela suposta inicial. Para verificar isso, fizemos medidas de potencial zeta. A Figura 21 mostra o resultado do experimento. Note que os dados indicam um PI obtido a um pH em torno de 8,0. Portanto, nas condições nas quais os experimentos foram realizados a proteína estaria carregada positivamente. Isso pode explicar a taxa significativamente baixa do crescimento do filme. Vale mencionar que embora a oposição de cargas entre os componentes dos filmes LBL seja um fator importante, há trabalhos com evidências de que isso de fato é

apenas um elemento, principalmente quando se trata de filmes que envolvam polímeros e proteínas[197].

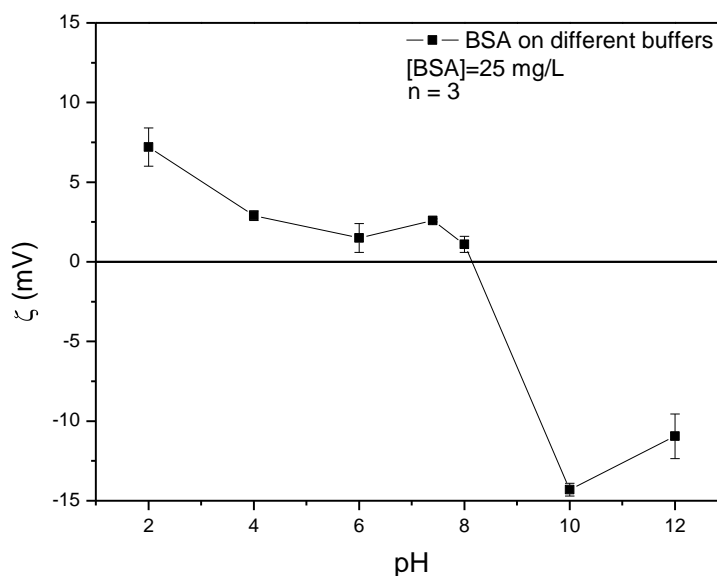


Figura 21- Medidas de potencial zeta para a determinação do PI da BSA.

4.6 – Efeito do pH sobre os filmes de PAH/BSA

Até o momento, as tentativas de incorporar a BSA em substratos sólidos por intermédio dos polieletrólitos quitosana e ftalocianinas não se mostraram muito eficientes. Uma exigência das medidas de fluorescência resolvida no tempo é que se tenha uma quantidade mínima de fluoróforo capaz de gerar um número significativo de fótons.

Os experimentos seguintes foram realizados com a BSA (2g/L) em três pHs distintos (3,4; 5,6 e 8,0) e PAH (2g/L) em pH = 8,0, depositados sobre quartzo. A Figura 22 mostra os espectros de absorção dos filmes obtidos. A coluna da direita mostra os dados graficados na região de 190 nm (região de absorção da ligação C = O, presente na BSA) e em 276 nm (região de absorção do triptofano da BSA). O pH da solução de BSA apresentou um papel importante no crescimento dos filmes. Como era de se esperar, já que a carga (Fig.21) e sua estrutura terciária (Fig.1) são sensíveis ao pH. Em pH 3,45, a absorbância foi baixa em ambos

os comprimentos de leitura, indicando uma quantidade de material depositado relativamente baixa. Nesse pH, a superfície da proteína assume um caráter positivo,

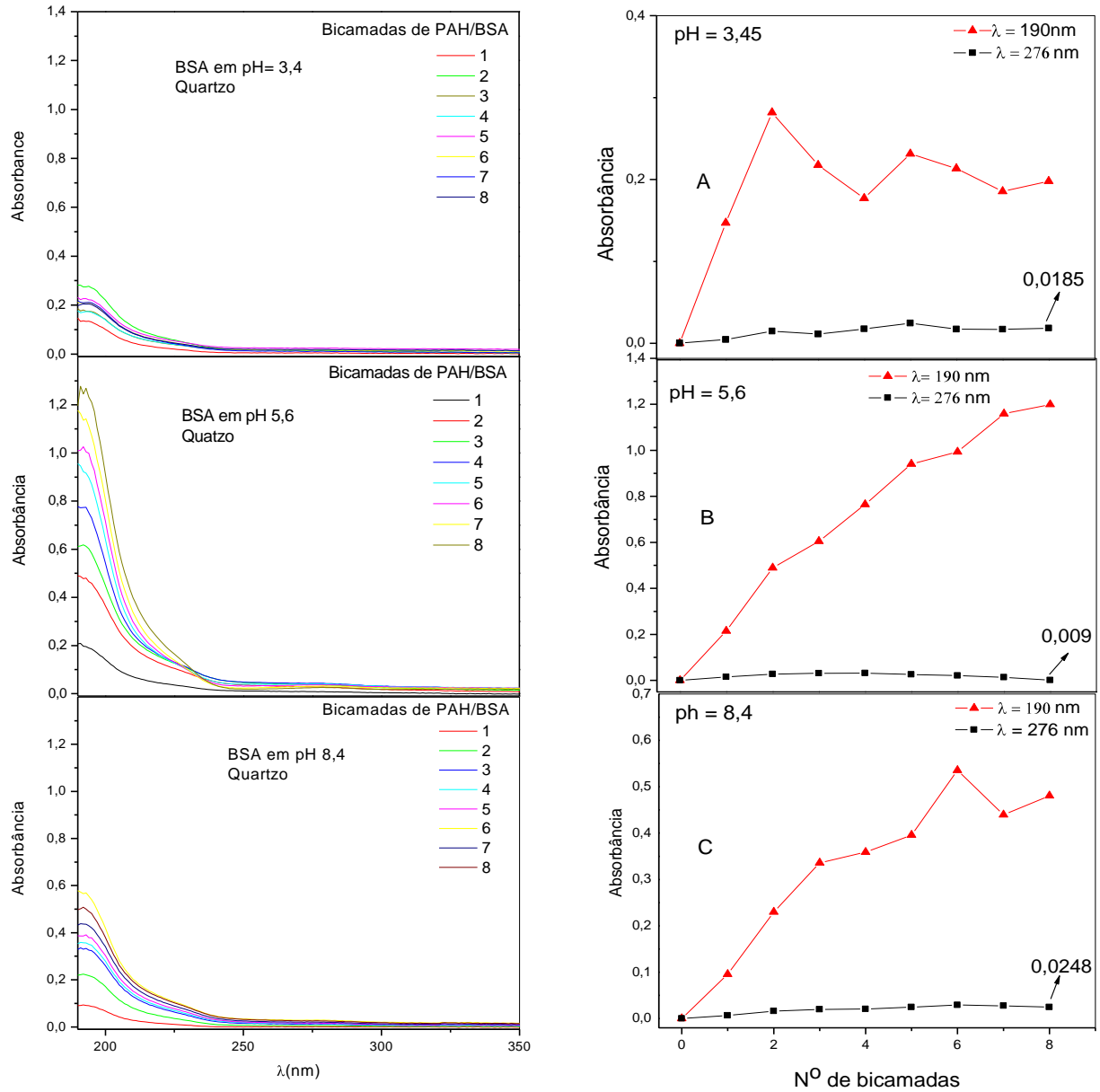


Figura 22- Espectros de absorção dos filmes de PAH/BSA depositados sobre quartzo (coluna esquerda). Na coluna direita estão as absorbâncias das medidas obtidas em 190 e 200 nm.

melhor resultado, com absorção em 190 nm crescente com o número de bicamadas, indicando a adição da BSA. No entanto, uma ampliação do gráfico das absorbâncias obtidas em 276 nm (ver Fig. 23) indica um crescimento inicial na quantidade de BSA e, posteriormente, uma redução

na quantidade de BSA depositada. Cabe lembrar que se isso fosse verdade, a absorvância em 190 nm também deveria ser reduzida na mesma proporção, já que o filme depende da BSA para continuar crescendo. Em outras palavras, a quantidade de PAH depositada não aumenta por si só a cada ciclo. Esse fato é mostrado na Figura 24. Ela mostra a cinética de crescimento da PAH sobre o substrato de quartzo. Observamos que o polímero é depositado numa certa quantidade na primeira camada, e esta se mantém praticamente a mesma com o tempo. Os pontos foram obtidos, deixando o substrato imerso na solução de PAH por um curto intervalo de tempo, seguido por intervalos sucessivos, utilizando – se o procedimento da técnica de

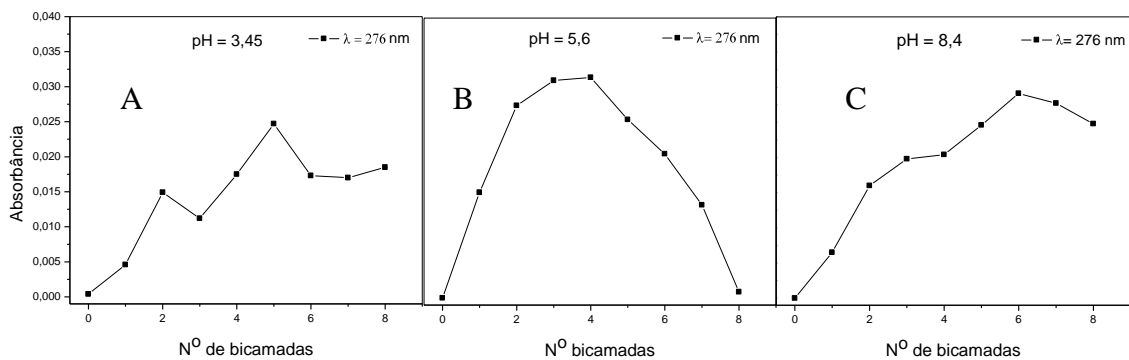


Figura 23- Absorbâncias com o número de bicamadas dos filmes de PAH/ BSA obtidas em 276 nm.

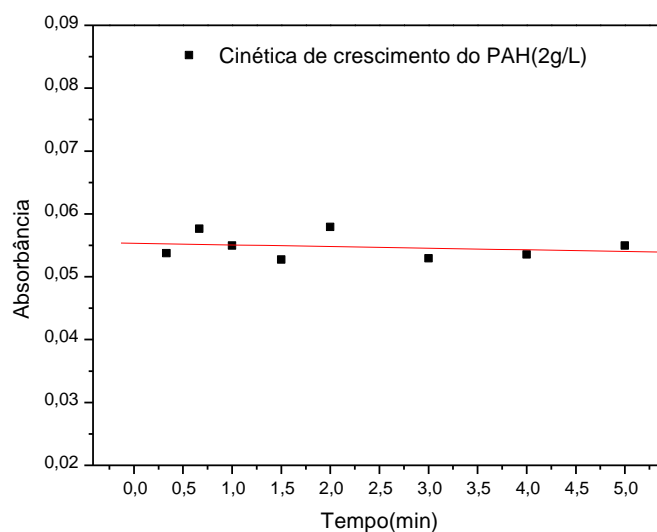


Figura 24- Cinética de crescimento do PAH sobre substrato de quartzo.

LBL, ou seja, lavagem e secagem. Além disso, a BSA pode ter sofrido uma mudança estrutural, o que afetaria o seu coeficiente de absorção nessa região de absorção e isso se refletiria em sua fluorescência. No caso do pH 8,4, o perfil de crescimento da absorbância obtida em 190 nm é similar àquele obtido em o pH 5,6, indicando crescimento do filme. No entanto, os valores de absorbância obtidos em 276 nm apresentaram um crescimento quase linear, a uma taxa de crescimento menor do que em pH 5,60, até a sexta bicamada, onde começou a ser reduzido. Deve ser mencionado que este processo é muito mais complicado, pois nele está presente também a questão do envelhecimento do polímero e a modificação das bicamadas ao longo do crescimento do filme.

4.7 Estudo da fluorescência dos filmes de PAH/BSA

Antes da análise da fluorescência dos filmes fabricados em diferentes valores de pH, é importante o conhecimento do efeito do pH sobre a fluorescência do fluoróforo em solução. A Figura 25a) mostra a resposta da intensidade de fluorescência da BSA, medida em 345 nm, à

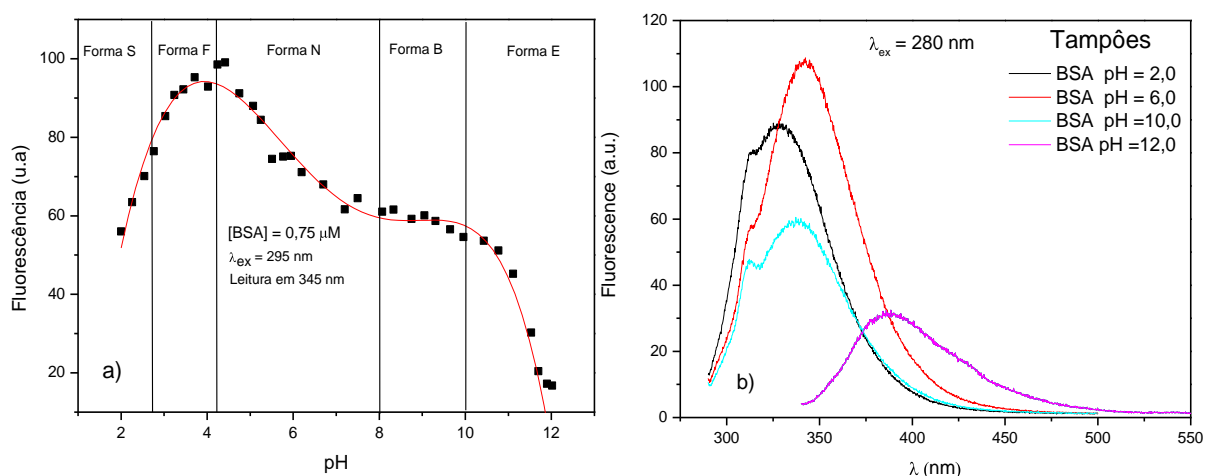


Figura 25– a) Intensidades de fluorescência da BSA em soluções tampões de diferentes valores de pH. As leituras foram feitas em 345 nm. b) Espectros de fluorescência da BSA em alguns valores de pH.

variação do pH em suas diversas estruturas representadas pelas as regiões S, F, N, B e E. A Figura 25b) mostra o comportamento do espectro de fluorescência da BSA em algumas dessas formas. Note que dependendo da forma assumida pela BSA, tanto a intensidade como a posição do máximo de fluorescência associados a ela são sensíveis ao pH. Nessa seção estudamos a fluorescência estática e fluorescência resolvida no tempo dos filmes discutidos anteriormente para observar os efeitos do pH sobre o tempo de vida do estado excitado do triptofano presente na BSA.

As medidas de fluorescência estática dos filmes estudados, mostradas na Figura 25a), destacam um aumento na banda situada em torno de 320 nm, em detrimento da redução da banda situada em 420 nm, para os filmes fabricados com pHs diferentes de 5,60. O aumento da banda de emissão em 320 nm reflete o efeito observado na absorção óptica (Fig.22), ou seja, como os filmes A e C possuem mais triptofano depositado do que possui o filme B, estes absorvem mais em 276 nm, portanto emitem mais fluorescência em 340 nm, como observado na Figura 26-a). Isto explicaria o aumento da fluorescência na banda situada em 320 nm para os filmes A e C, quando comparada ao filme B.

Por meio dos experimentos de fluorescência com resolução temporal, determinamos

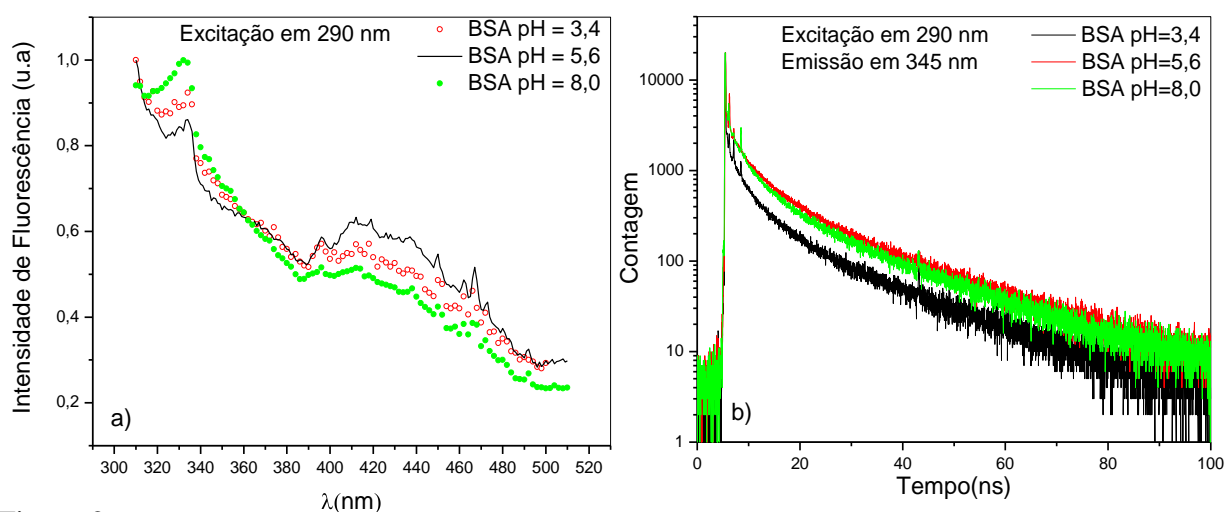


Figura 26 a) Espectro de emissão dos filmes fabricados com BSA em valores de pH 3,4, 5,6 e 8,0; b) perfil de decaimento do triptofano presente nos filmes.

os tempos de vida de fluorescência dos três filmes, bem como suas respectivas contribuições para o decaimento total. Os resultados estão na Tabela 1. A Figura 26-b) mostra o perfil de decaimento da fluorescência dos três filmes. Os filmes foram excitados em 290 nm e a emissão foi lida em 345 nm. Os resultados indicam a existência de três tempos de vida de fluorescência para o decaimento de fluorescência dos filmes. Cada tempo de vida pode ser atribuído aos dois triptofanos presentes na BSA; cada um situado em regiões diferentes da proteína. Comparando os resultados expostos na Tabela 1 com os valores de absorção dos filmes A, B, e C, parece haver

BSA(pH)	τ_1	τ_2	τ_3	$\tau_{\text{médio}}$	P1	P2	P3
3,4	16,31	2,799	0,013	8,347	45,23	34,57	20,2
5,6	19,35	4,843	1,009	11,862	51,7	35,89	11,41
8,0	17,88	3,653	0,644	10,569	50,46	40,78	8,76

Tabela 1- Resultado dos ajustes feitos dos decaimentos de fluorescência dos filmes. τ_1 , τ_2 , τ_3 são os tempo de vida de fluorescência encontrados; P1, P2 e P3 são as contribuições percentuais de cada tempo para o decaimento total da fluorescência.

uma relação entre os tempos de vida médios e a absorbância dos filmes, ou seja, os filmes que apresentaram maiores valores de absorção também tiveram os maiores tempos de vida médios de fluorescência. Os três tempos de vidas podem ser as identidades de cada uma das três conformações assumidas pela BSA em cada valor de pH.

As medidas feitas com as fluorescências estáticas e resolvida no tempo foram realizadas sobre os filmes, após todas as bicamadas terem sido depositadas. Portanto, observamos um fenômeno estático, mas é sabido que, durante o processo de deposição, as bicamadas sofrem alteração e, assim, o que é observado em duas bicamadas, por exemplo, pode não corresponder ao observado para seis bicamadas. Dessa forma, fizemos experimentos

nos quais, a cada monocamada dos materiais envolvidos depositada, foram feitas medidas de absorvância e de fluorescência estática. Os resultados estão na Figura 27. A absorvância foi lida em 276 nm, e as medidas de fluorescência foram lidas em 340 nm, com excitação em 276 nm. Os dados indicam uma redução gradativa na taxa de deposição do material depositado a cada ciclo. O efeito se repete tanto para as monocamadas de BSA quanto para monocamadas de PAH. A cada monocamada de PAH depositada, há uma redução tanto na absorvância como na fluorescência do filme, indicando que o filme perde BSA e ganha mais PAH, visto que o filme continua a crescer. Os dados indicam que embora seja possível depositar BSA nas condições estudadas, há um limite para o número de bicamadas depositadas, geralmente em torno de 10 bicamadas. Isso torna as medidas de decaimento de fluorescência muito demoradas, chegando a ser impraticável para as primeiras bicamadas. Assim, é crucial que se intensifique a quantidade de fluoróforo depositada no filme.

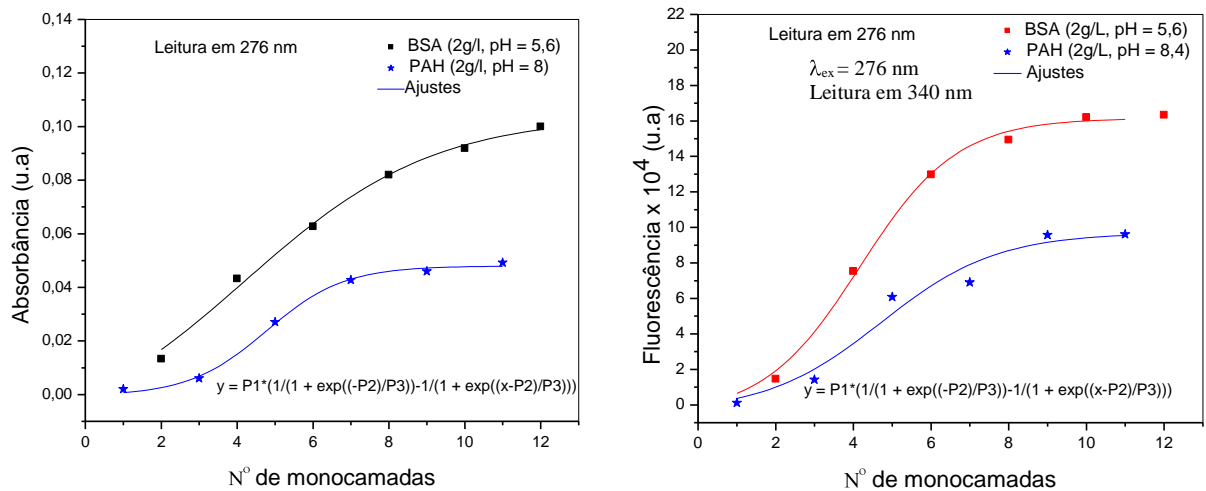


Figura 27- Absorbâncias e intensidades de fluorescência das monocamadas de PAH e BSA (pH = 5,6) depositadas consecutivamente sobre substrato de quartzo.

4.8 Estudo da interação de BSA e nanopartículas de ouro

Como já mencionadas, as nanopartículas metálicas são de grande interesse em diversas áreas da ciência. O nosso interesse em particular pelas nanopartículas de ouro se dá pela sua afinidade com moléculas biológicas e por sua potencialidade em intensificar o sinal de fluorescência de fluoróforos. A água foi escolhida como meio de suspensão das nanopartículas por ser o principal constituinte do meio biológico.

Apesar dos diversos métodos de fabricação de nanopartículas citados na literatura, escolhemos apenas alguns, levando em conta aspectos tais como facilidade de execução, tempo de fabricação, reprodutibilidade, eficiência do método e estabilidade das nanopartículas de ouro. Almejando, então, investigar a interação da BSA com nanopartículas de ouro, após a fabricação, as nanopartículas foram caracterizadas qualitativamente por absorção óptica e, oportunamente, por fluorescência estática e medidas de potencial zeta. A seguir, apresentaremos a caracterização das nanopartículas obtidas pelos diversos métodos utilizados

4.8.1 Síntese de nanopartículas de ouro reduzida por resíduo de triptofano

O nosso interesse por nanopartículas reduzidas com triptofano surge do fato da fluorescência de a BSA ser, em parte, atribuída a esse aminoácido. Esperaríamos, portanto obtermos nanopartículas de ouro fluorescentes. As nanopartículas foram fabricadas pelo método citado por Selvakannan et al. [201]. Porém, utilizamos KAuCl_4 e *N-acetyl-L-tryptophan* em vez HAuCl_4 e *L-tryptophan*, por causa de sua disponibilidade em nosso laboratório. Todos os procedimentos seguintes foram seguidos. O método consiste em reduzir 90 mL de uma solução de KAuCl_4 (10^{-4} M) pela adição de 10 mL de solução aquosa de

resíduo de triptofano (10^{-3} M). A solução resultante é então aquecida a 50° C até a formação das nanopartículas, que pode ser observada pela mudança de cor da solução, do amarelo para uma solução azul escuro, embora a banda plasmônica das nanopartículas esteja associada normalmente à cor vermelho-vinho [202]. A reação também pode ser realizada à temperatura ambiente, mas o tempo de redução da solução será maior e a eficiência, menor. Medidas de NMR [201] indicam que a redução dos íons metálicos pelo triptofano é acompanhada pela polimerização oxidativa do grupo indol do triptofano, que se liga então à superfície da nanopartícula. A Figura 28 mostra o espectro de absorção das nanopartículas fabricadas à temperatura ambiente e a 50° C, mostrando pico de absorbância em 570 e 600 nm, respectivamente. Esta banda é atribuída à ressonância de plasmons de superfície das nanopartículas [203]. O pico de absorbância das nanopartículas fabricadas à temperatura ambiente está de acordo com o previsto na literatura [201]. Porém, as nanopartículas fabricadas a 50° C apresentaram um deslocamento de 30 nm para a região vermelha do espectro eletromagnético. A coloração azulada é atribuída à agregação das nanopartículas, evidenciada também pelo deslocamento da banda plasmônica para a região do vermelho [31]. Por isso, o tamanho das nanopartículas deve ser maior do que os 31 nm mencionado na literatura [201] para esse sistema. Isso torna o sistema pouco estável. As nanopartículas começaram a se precipitar em poucas horas, e em poucos dias a solução se precipitou por inteiro. Além disso, as nanopartículas não apresentaram fluorescência. Assim, o método se mostrou inapropriado para as nossas medidas.

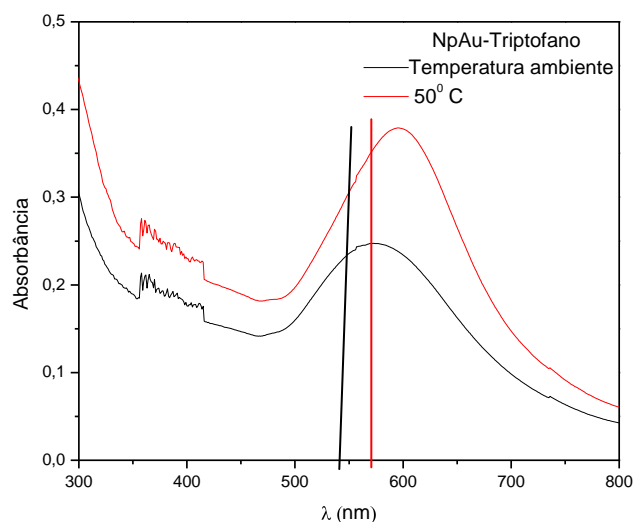


Figura 28- Espectro de absorção das nanopartículas de ouro reduzidas por resíduos de aminoácido.

4.8.2 Nanopartículas de ouro reduzida e estabilizadas por quitosana

Há três motivos principais que nos levaram a procurar nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana: o fato de a quitosana ser uma molécula biológica, que já vem sendo usada em aplicações tais como entrega de drogas, controle de obesidade, engenharia de tecido, fabricação de filmes LBL, etc [204, 205]; o fato de sua utilização para reduzir e estabilizar as nanopartículas não introduzir qualquer toxicidade ao ambiente ou dano biológico; e a possibilidade de se conseguir nanopartículas de ouro fluorescentes [206].

O método adotado na fabricação das nanopartículas de ouro fluorescente foi o utilizado por Huang et al. [206]. Como no método anterior, substituímos o HAuCl_4 por KAuCl_4 . O método consiste em misturar 1,5 mL da solução de KAuCl_4 (2 mM) com 15 mL de uma solução de quitosana (2 g/L) previamente preparada com ácido acético a 1% e aquecer a 70 °C, sob agitação magnética constante. Após 15 minutos, a solução começa a ficar vermelha, atingindo o tom vermelha vinho após duas horas. O pH da solução final foi 3,1. A Figura 29 mostra o espectro de absorção da solução final de NpAu-quitosana. Note que o pico de absorção da banda plasmônica, situada em 530 nm, é aproximadamente quatro vezes maior

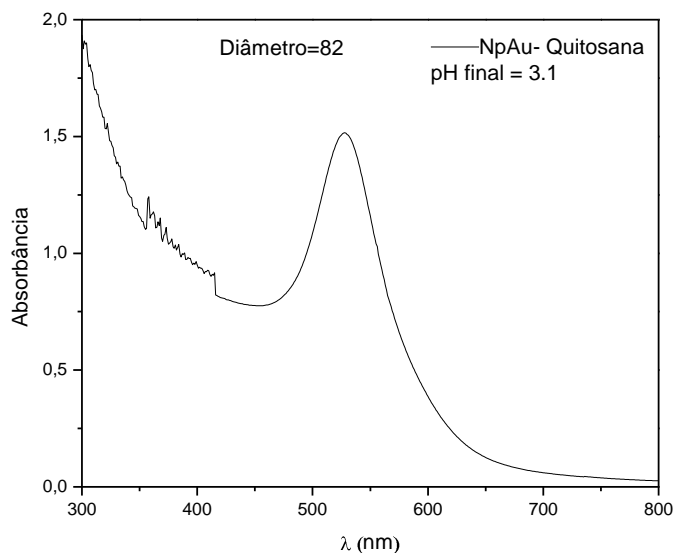


Figura 29 Espectro de absorção das NpAu estabilizadas por quitosana.

do que aquela obtida no experimento anterior e mais estreita. O valor de $\lambda_{\text{máx}}$ está diretamente relacionado à concentração de nanopartículas na solução e a largura da banda com a dispersão do tamanho das nanopartículas. Maiores concentrações de nanopartículas de tamanhos menores é importante para a redução do tempo máximo de cobertura da superfície do substrato em processos de adsorção controlado por difusão [30, 207].

Além disso, as nanopartículas fabricadas por esse método apresentaram fluorescência em 489 nm, quando excitadas em 316 nm, como obtido por Huang et al. [202] irradiando a solução com luz UV. A Figura 30 mostra o espectro de fluorescência da NpAu-quitosana. O pequeno “ombro” em torno de 355 nm é atribuída ao espalhamento Raman da água[208]. A seguir apresentaremos os dados do experimento de supressão de fluorescência da BSA utilizando as nanopartículas como supressor.

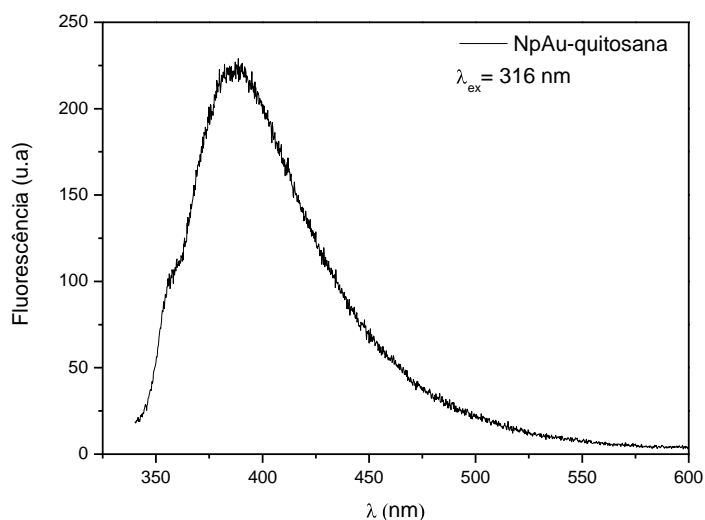


Figura 30 Espectro de fluorescência das NpAu-quitosana.

4.8.3 Interação da NpAu-quitosana com BSA

A Figura 31, que mostra os espectros de fluorescência da BSA, quitosana e NpAu-quitosana, bem como o espectro de absorção das NpAu-quitosana, sugere a possibilidade de ocorrer supressão de fluorescência por FRET entre a BSA e as NpAu-quitosana, visto que parte do espectro de emissão da BSA se sobrepõe ao espectro de absorção nas nanopartículas. Note que o espectro de fluorescência da solução de NpAu-quitosana é praticamente idêntico ao espectro de fluorescência da quitosana. Isso nos deixa em dúvida se a fluorescência mencionada na literatura [202] pode ser realmente atribuída às nanopartículas ou se esta é resultado da quitosana suspensa na solução. Para investigar essa possibilidade, adicionamos alíquotas de NpAu-quitosana a uma solução de BSA (7.5 μM) e obtivemos os seus respectivos espectros de fluorescência excitando em 316 nm. Os dados são mostrados na Figura 32. Os resultados mostram que com a adição de 250 μL de solução de NpAu, a fluorescência da BSA é suprimida completamente, dando lugar a uma banda em 389 nm, que cresce muito timidamente com o aumento da concentração de NpAu-quitosana. O surgimento da fluorescência em 390 nm poderia ser explicado por uma baixa taxa de transferência de

energia da BSA para as nanopartículas, mas achamos mais provável que o fato seja devido ao efeito do pH (3,1) da solução e/ou à alta concentração de NpAu-quitosana sobre da fluorescência da BSA. O vermelho intenso da solução deve estar contribuindo fortemente para o aumento brusco do efeito filtro que, juntamente com o efeito do pH, contribui para a supressão. Assim, a completa supressão da fluorescência deixaria

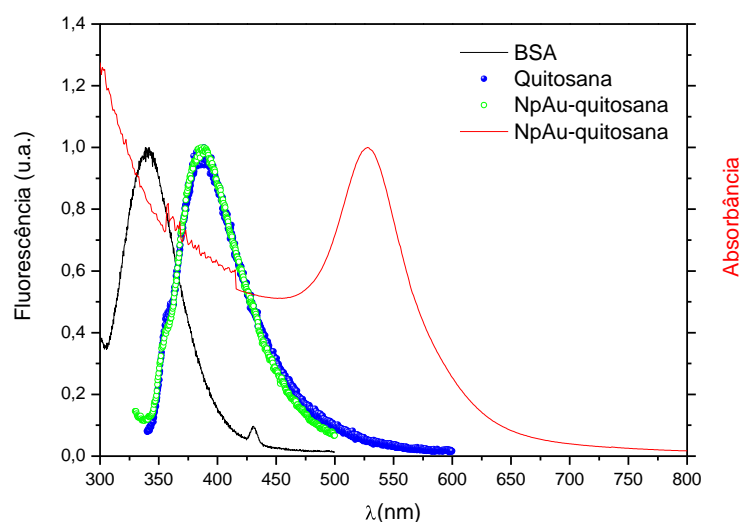


Figura 31- Espectros de fluorescência da BSA ($\lambda_{ex} = 280$ nm), quitosana ($\lambda_{ex} = 316$ nm), NpAu-quitosana ($\lambda_{ex} = 316$ nm), e espectro de absorção das NpAu-quitosana.

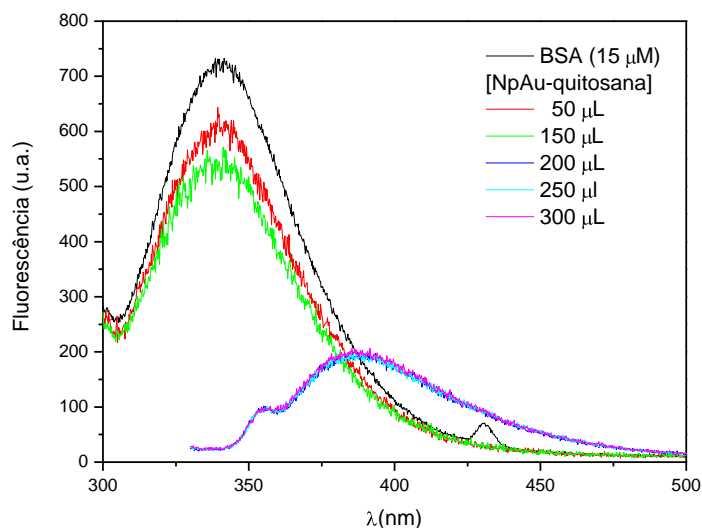


Figura 32- Supressão da fluorescência da BSA por NpAu-quitosana.

a fluorescência da NpAu-quitosana em evidência. Para obtermos um parâmetro relacionado à concentração da solução de NpAu, estudamos a variação de sua fluorescência em função da diluição da solução, adicionando água Mili-Q em um mL de solução de NpAu-quitosana recém preparada. A excitação da amostra foi em 316 nm. Os resultados são mostrados na Figura 33. Note que a redução da concentração leva a um aumento na intensidade de fluorescência. A solução atinge o máximo de fluorescência a uma concentração de 33,3%. Isso pode ser melhor observado na Figura 34, que mostra como o máximo de fluorescência varia com a diluição da solução.

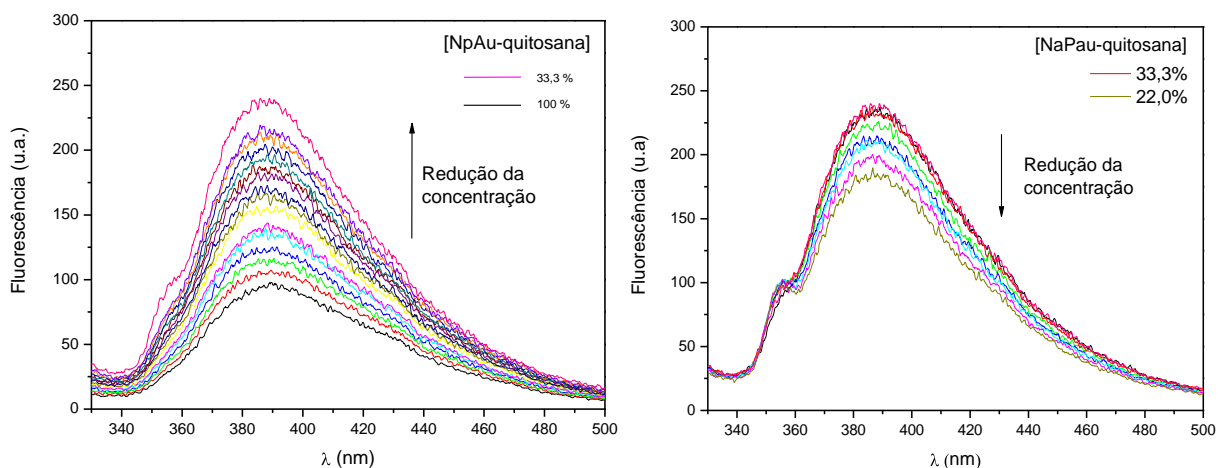


Figura 33– Espectros de fluorescência da solução de NpAu-quitosana em função da redução da concentração.

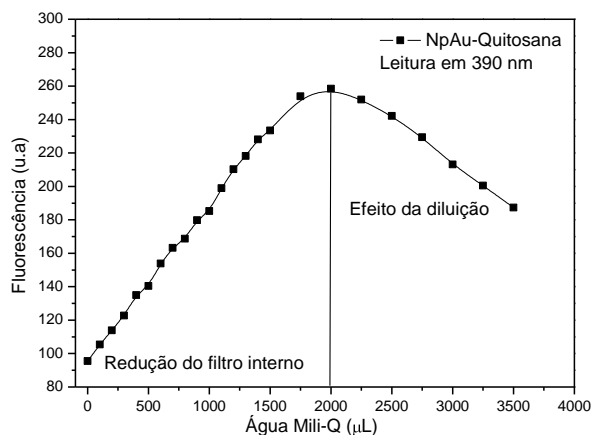


Figura 34- Dependência da máxima fluorescência com a redução da concentração.

O aumento da fluorescência pode ser explicado pela redução do efeito de filtro interno com a diluição da solução. Em concentração acima de 33%, a fluorescência decai continuamente com um comportamento típico de redução de concentração. Este experimento é importante para a determinação da concentração máxima de NpAu a ser alcançada num experimento de supressão de fluorescência, abaixo da qual pode ser assegurada a ausência do efeito de filtro. Apesar do método discutido ter a vantagem de gerar NpAu aparentemente fluorescente e sem a adição de agentes redutores e estabilizadores, possui a desvantagem de sua solução possuir um pH muito baixo, o que a torna não muito interessante para a interação com biomoléculas em ambientes biológicos. Além disso, uma vez fabricadas por esse método, a solução se torna muito instável em pHs diferentes. Por isso, buscamos outros métodos de fabricação de NpAu em solução aquosa que leve a soluções finais estabilizadas em valores de pH mais elevados .

4.8.4 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro estabilizadas por SDS

Os experimentos seguintes foram realizados com o objetivo de obtermos soluções de NpAu com valores de pH mais elevados, de preferência perto de 7,0. As nanopartículas foram fabricadas com base no método proposto por Panda et al. [209], com a utilização de KAuCl_4 em vez de HAuCl_4 . Esse método pode levar a soluções de NpAu em diversos valores de pH. Na fabricação, utilizamos 850 μL de uma solução de KAuCl_4 (1mM) misturada com 10 mL de SDS (8,5 mM) e agitada. A solução apresentou um valor de pH igual 4,1. A essa solução adicionamos 250 μL de H_2O_2 (29-32 %). Fabricadas nessas condições, a solução assume uma coloração rosada em aproximadamente 20 segundos. O pH da solução após a reação foi 3,9; com absorvância relativamente baixa ($\sim 0,3$). Os experimentos seguintes foram realizados ajustando-se o pH da solução precursora aos valores 3,5; 4,1; 6,3; 7,6; 8,0, 10, 11 e 12., antes da adição do agente redutor H_2O_2 . As bandas plasmônicas das nanopartículas resultantes são

mostradas na Figura 35a). Em nenhum dos casos a absorvância passou de 0,35. Os dados indicam que esse método, nessas condições, não é muito eficiente na fabricação de grandes quantidades de nanopartículas, se comparado aos outros métodos já estudados. A Figura 35b) mostra a correlação entre os valores de pH da solução precursora e os valores de pH da solução final. Observamos que sempre há uma redução nos valores de pH das soluções finais, independentemente do valor do pH da solução precursora. As cinéticas de crescimento

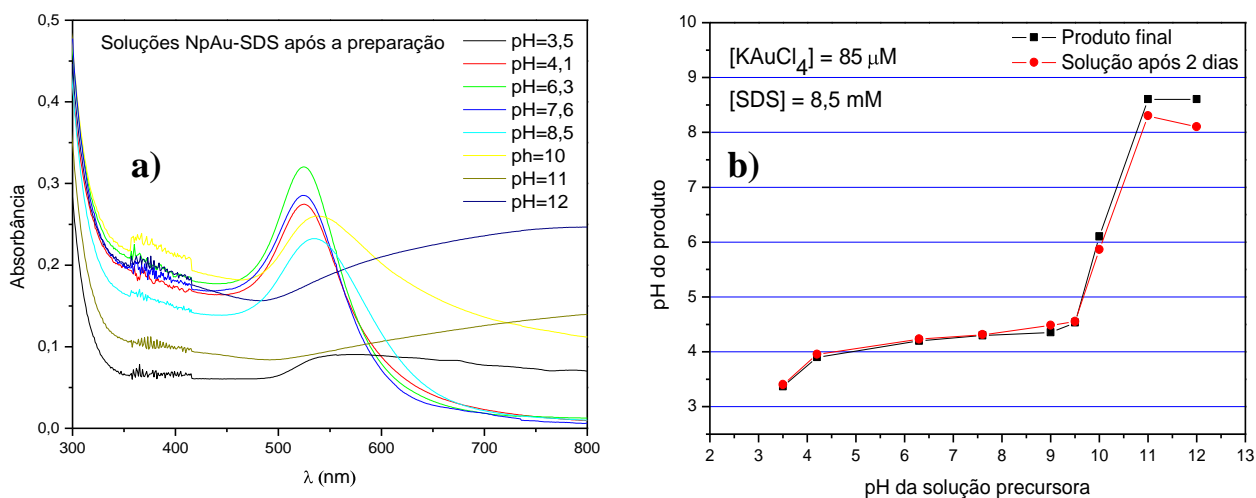


Figura 35- a) Espectros de absorção da nanopartículas obtidas em diferentes valores de pH. b) Correlação entre os valores de pH das soluções precursoras e os valores de pH da solução após a formação das nanopartículas.

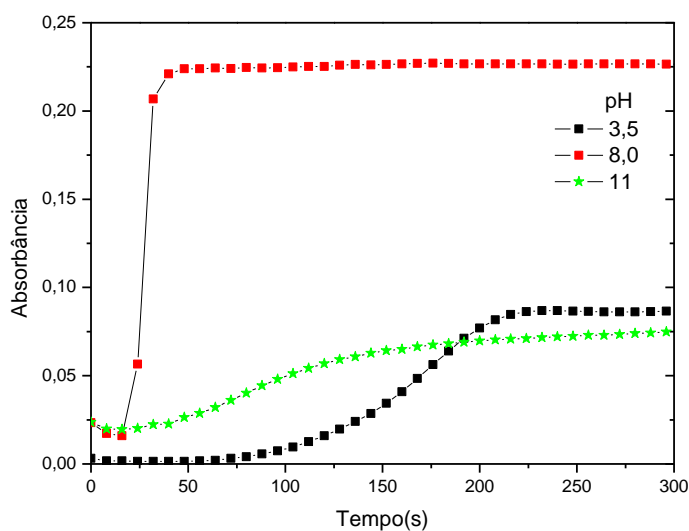


Figura 36- Cinética da reação de formação das nanopartículas estabilizadas por SDS em alguns valores de pH.

das nanopartículas em pH 3,5; 8,0; e 11 são mostradas na Figura 36. Os dados indicam que a reação ocorre entre 50 e 220 segundos. O efeito do pH sobre parâmetros tais como velocidade da reação quantidade, tamanho e forma das nanopartículas é bastante evidente (Figuras 35a e 36). Portanto, trata-se de uma técnica bastante versátil, já que se pode obter nanopartículas com diversas características, variando-se apenas os valores do pH inicial e, eventualmente, as concentrações das soluções precursoras. Além disso, utilizando-se o método de crescimento por semente [207] é possível aumentar o tamanho e concentração das nanopartículas [31]. Porém, apesar das vantagens mencionadas, a presença do agente redutor H_2O_2 na solução torna o sistema mais complexo, já que este é por si só um supressor da BSA, como indica a Figura 37. Por esse motivo esse tipo de nanopartícula deixa de ser interessante para os nossos objetivos.

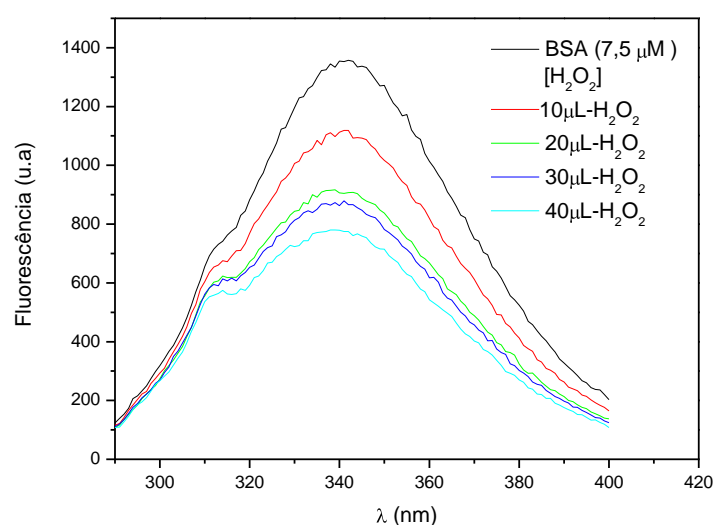


Figura 37- Supressão da fluorescência da BSA com H_2O_2 .

4.8.5 Nanopartículas de ouro sintetizada e estabilizada com sacarose

Para fabricar as NpAu sintetizadas com sacarose, partimos do método citado na literatura [207], mas, em vez de usar HAuCl_4 , novamente utilizamos o KAuCl_4 . As proporções dos ingredientes foram mantidas. Assim, uma quantidade de sacarose (0,05 g) foi dissolvida em três mL de solução aquosa de KAuCl_4 (10 mM) previamente preparada em água deionizada. Sob fluxo de ar, a solução foi colocada para evaporar até que um resíduo sólido amarelo-esverdeado se formasse no béquer. O béquer foi então mantido em uma estufa a 80 °C por 15 min. O tratamento térmico transformou a cor do sólido em verde musgo (quase marrom). O béquer foi resfriado à temperatura ambiente e, em seguida, preenchido com 100 mL de água deionizada. A solução foi agitada, resultando numa coloração amarelo-alaranjado. Após uma hora de vigorosa agitação, à temperatura ambiente, a solução apresentou uma coloração vermelho-vinho, indicando a formação de NpAu. Este método de fabricação se destaca pelo fato de não haver a necessidade da utilização de reagentes tais como agente redutor e estabilizador. Isso simplifica o estudo da interação da nanopartículas com o objeto de estudo, no caso a BSA. Além disso, há relatos de que, conservadas no escuro, as soluções coloidais de NpAu fabricadas por esse método utilizando-se HAuCl_4 se mantêm estáveis por mais de um ano [207]. No nosso caso, a solução se manteve estáveis por mais de quatro meses e sem qualquer alteração em seu espectro de absorção. O espectro de absorção da solução recém preparada é mostrado na Figura 38. A banda plasmônica da solução apresentou máximo em 524 nm, seis nm a menos do que aquele relatado na literatura [210] para este método, com isso esperávamos obter nanopartículas com diâmetro médio menor ou em torno de sete nm, como previsto por microscopia eletrônica de varredura [210]. Entretanto, medidas realizadas com espalhamento de luz de nossa amostra indicaram dois diâmetros médios: $35,2 \pm 10,3$ e $123,1 \pm 21$ nm (Fig. 39a). A diferença pode estar ligada a

desvios nos parâmetros adotados durante as medidas, como viscosidade e índice de refração do meio. Medidas de potencial zeta indicaram que as nanopartícula possuem cargas negativas (Fig. 39b) em todos os pH estudados (4,0; 6,0; 8,0; 10, e 12), (dados não mostrados aqui).

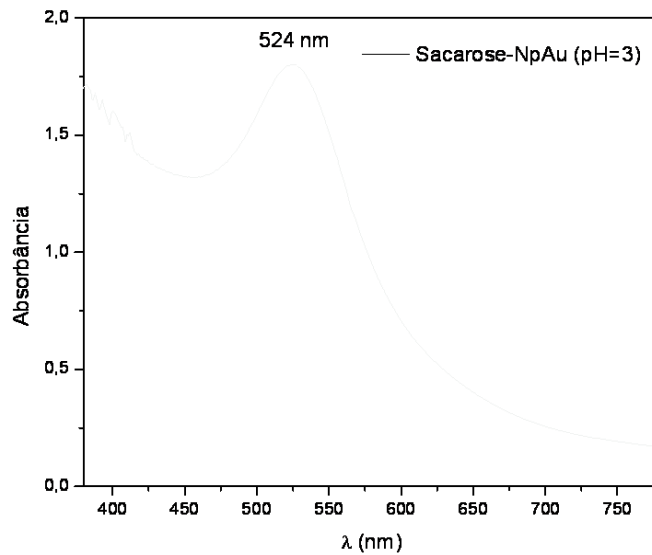


Figura 38- Supressão da fluorescência da BSA com H₂O₂.

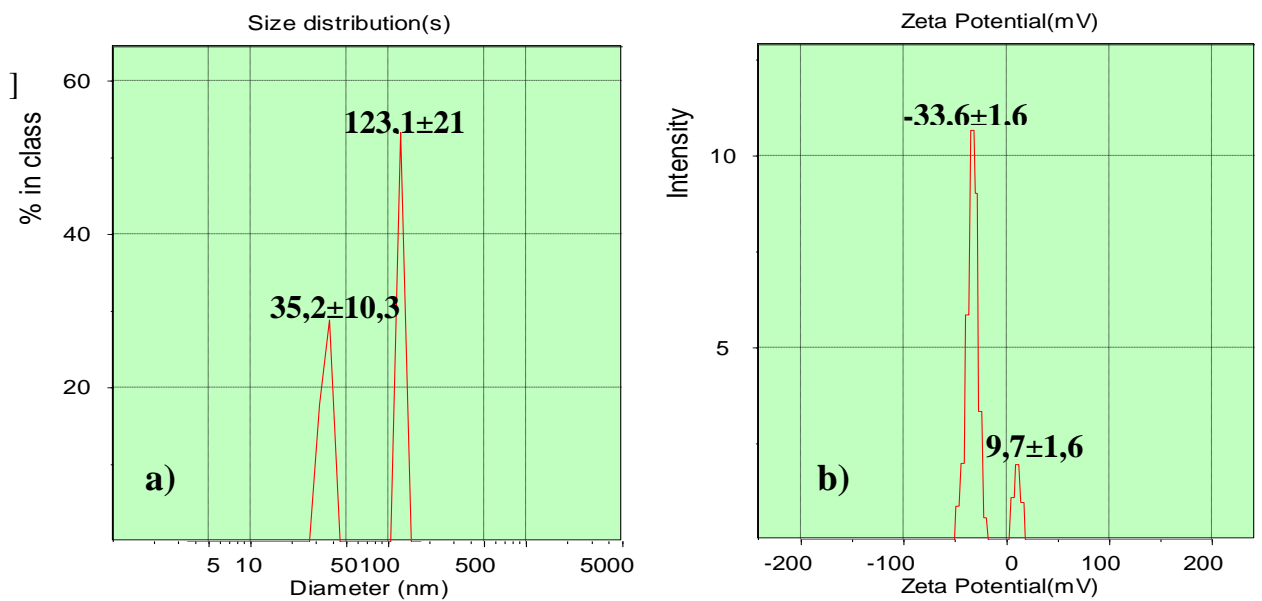


Figura 39- a) Dados de espalhamento de luz. B) Dados do potencial zeta das NpAu-sacarose.

4.8.6 Interação de BSA com NpAu-sacarose

Como foi discutido anteriormente, o vermelho intenso das nanopartículas promove um efeito de filtro muito intenso. Para reduzir esse efeito, a solução de NpAu-sacarose foi diluída até que o pico de absorção de sua banda plasmônica se igualasse ao da solução de NpAu-quitosana. Então, a solução foi diluída a 33,3 %, de modo que sua transmitância atingisse o valor de 31,6 %. Sucessivas alíquotas de 10 μ L dessa solução foram, então, adicionadas a um mL de solução de BSA (3,5 μ M) em valores de pH variando de 2,0 a 12. Não fizemos experimento em pH = 4,0, porque o tampão adquirido nesse pH era altamente espalhador, de modo que a fluorescência da BSA era totalmente suprimida em qualquer concentração. Os espectros de fluorescência foram obtidos, com excitação em 280 nm. Todas as medidas foram realizadas com a transmitância assumindo valores entre 90 e 100%. A título de ilustração, a Figura 40a) mostra os espectros de fluorescência da BSA (pH = 8,0) em função da adição das nanopartículas e a Figura 40b) mostra o gráfico de Stern-Volmer obtido a partir dos valores dos máximos de fluorescência dos espectros. O mesmo procedimento foi realizado para os demais experimentos realizados com as nanopartículas e com a solução precursora (KAuCl₄ e sacarose na mesma concentração das NpAu-sacarose), em diferentes valores de valores de pH. A solução precursora foi utilizada também como supressora para se ter uma referência para a comparação com os resultados obtidos com as nanopartículas. Os resultados mostram uma ótima linearidade na curva de Stern-Volmer, o que indica que há a possibilidade de as nanopartículas, assim com a solução precursora, formarem complexos com a BSA. A Figura 41 mostra os valores obtidos para a constante de Stern-Volmer aparente K_{ap} relativos às interações das NpAu-sacarose e da solução precursora com a BSA.

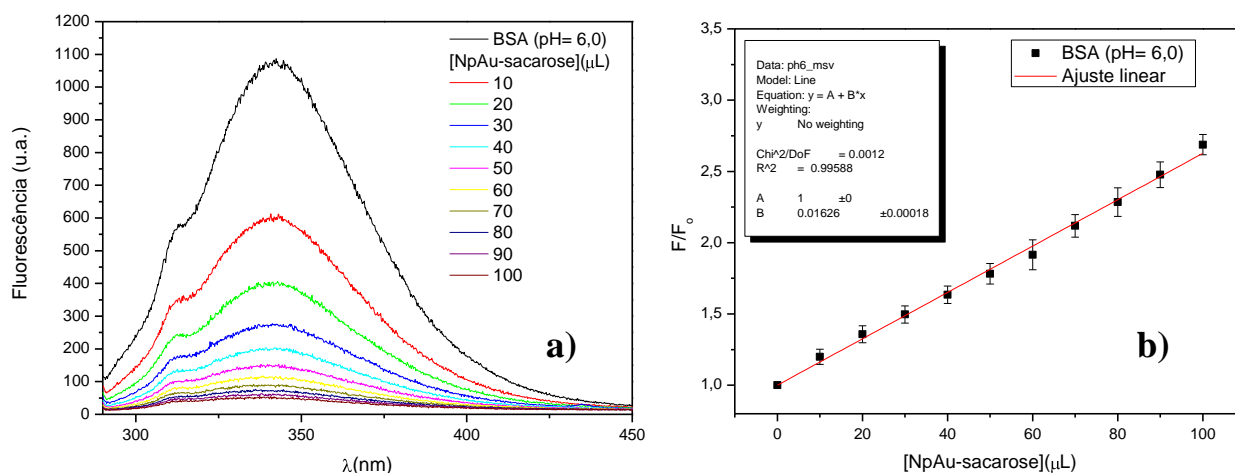


Figura 40– a) Espectros de fluorescência da BSA em função da adição de NpAu-sacarose. b) gráfico de Stern-Volmer equivalente.

Chamamos de K_{ap} o parâmetro adotado para relacionar a inclinação da curva do gráfico de Stern-Volmer dos nossos dados à constante K de Stern-Volmer efetiva. A relação entre elas pode ser dada por $K_{ap} = \alpha K$, onde α é um fator de conversão de unidades. A justificativa para isto é que a unidade de K é o molar⁻¹, enquanto que em nossos experimentos não temos condições de determinar o número de mols na solução. Os dados indicam que as nanopartículas interagiram mais com a BSA do que a solução precursora em todos os valores de pH estudados, mas elas mantêm a mesma dependência com o pH. Note que a relação dos valores de K_{ap} com os valores de pH da solução são bastante similares ao comportamento da intensidade de fluorescência em função do pH (Fig. 25a). Os resultados sugerem que tanto as nanopartículas quanto a solução precursora possuem mais afinidade com a BSA em valores de pH próximos de seu PI, pH no qual a proteína se encontra neutra. Melhor entendimento do mecanismo envolvido na interação da BSA com as nanopartículas pode ser obtido por intermédio da supressão da BSA e do estudo de filmes de BSA, estudados por fluorescência resolvida no tempo. Isso fica para trabalhos futuros.

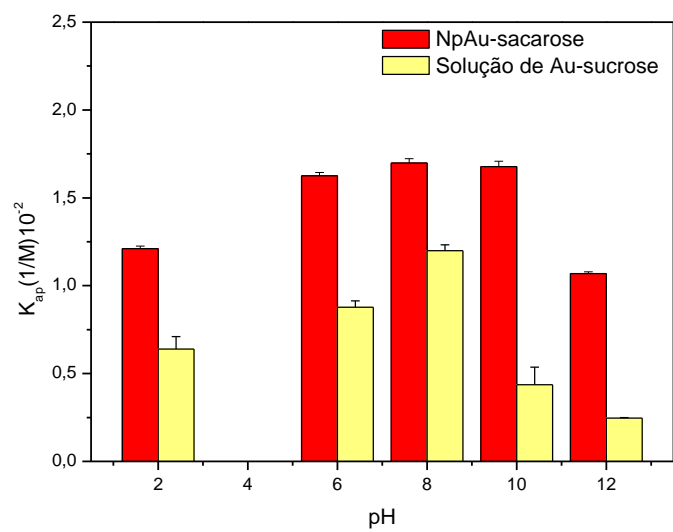


Figura 41- Comparação entre o efeito do pH sobre os K_{ap} obtidos para NpAu-sacarose e com solução precursora.

5-Conclusões

Filmes de BSA foram fabricados pela técnica de automontagem LBL, apresentando resultados satisfatórios no estudo de sistemas formados com biomoléculas e substratos sintéticos investigados por espectroscopia UV-vis e/ou espectroscopia de fluorescência estática.

A BSA apresentou certa interação com a ftalocianina em solução aquosa, formando complexos não fluorescentes, o que não é interessante para estudos com fluorescência, e pouca eficiência na formação de filmes sobre os substratos estudados.

A quitosana, apesar de possuir algum grau de interação com a BSA em solução, sua eficiência na fabricação de filmes de BSA não foi tão satisfatória quanto àquela observada para o PAH, o qual apresentou uma eficiência de aproximadamente 4 vezes maior que a desempenhada pela quitosana.

Quanto ao sistema BSA/PAH/substrato, o único substrato que se mostrou viável para medidas de absorção óptica foi o quartzo, visto que os demais possuem altíssimo coeficiente de absorção na região próxima a região de absorção da BSA, impossibilitando este tipo de medida. É importante salientar que isto não impossibilita as medidas de fluorescências estática e resolvida no tempo.

As medidas de fluorescência estática dos filmes de BSA/PAH indicaram um possível efeito do pH da proteína sobre o filme final. Sugerem ainda a possibilidade de se acompanhar a evolução deste efeito durante o crescimento do filme. Resultado similar foi observado com espectroscopia de absorção.

As medidas de fluorescência resolvida no tempo apresentaram mudança no tempo de vida de fluorescência do filme, refletindo o efeito da mudança do pH da solução de BSA no resultado final dos filmes.

6 Referências

- [1]. Bojiang Shen, S.S., Margaret M. Smith, Peter Ghosh, *Biosensor analysis of the molecular interactions of pentosan polysulfate and of sulfated glycosaminoglycans with immobilized elastase, hyaluronidase and lysozyme using surface plasmon resonance (SPR) technology*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **31**(1): p. 83-93.
 - [2]. Gouda, M.D., et al., *Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents*. Biosensors & Bioelectronics, 2002. **17**(6-7): p. 503-507.
 - [3]. Kumar, C.V. and A. Chaudhari, *Proteins immobilized at the galleries of layered alpha-zirconium phosphate: Structure and activity studies*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(5): p. 830-837.
 - [4]. Lvov, Y. and F. Caruso, *Biocolloids with ordered urease multilayer shells as enzymatic reactors*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(17): p. 4212-4217.
 - [5]. Walivaara, B., et al., *Blood protein interactions with titanium surfaces*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 1996. **8**(1): p. 41-48.
 - [6]. Hook, F., et al., *A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2002. **24**(2): p. 155-170.
 - [7]. Takami, Y., et al., *Protein adsorption onto ceramic surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **40**(1): p. 24-30.
 - [8]. Brunette D. M., T., P., Textor M., Thompson P., *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Application*, ed. Springer. 2001.
 - [9]. Bonfield, W. and K.E. Tanner, *Biomaterials - A new generation*. Materials World, 1997. **5**(1): p. 18-20.
 - [10]. Kasemo, B. and J. Lausmaa, *Surface Science Aspects on Inorganic Biomaterials*. Crc Critical Reviews in Biocompatibility, 1986. **2**(4): p. 335-380.
 - [11]. Read, M.J., S.L. Burkett, and A.M. Mayes, *Control and characterization of protein adsorption on ceramic surfaces*. Mineralization in Natural and Synthetic Biomaterials, 2000. **599**: p. 337-342.
-

- [12]. Bucciantini, M., et al., *Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases*. *Nature*, 2002. **416**(6880): p. 507-511.
- [13]. Gregory L. Kenausis, J.V., Donald L. Elbert, Ningping Huang, Rolf Hofer, Laurence Ruiz-Taylor, Marcus Textor, Jeffrey A. Hubbell, and Nicholas D. Spencer, *Poly(L-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(14): p. 3298–3309.
- [14]. Huang, N.P., et al., *Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Surface-analytical characterization and resistance to serum and fibrinogen adsorption*. *Langmuir*, 2001. **17**(2): p. 489-498.
- [15]. Wisniewski, N. and M. Reichert, *Methods for reducing biosensor membrane biofouling*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2000. **18**(3-4): p. 197-219.
- [16]. Elwing, H., *Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research*. *Biomaterials*, 1998. **19**(4-5): p. 397-406.
- [17]. Kurihara, K. and L.M. Beidler, *Taste-Modifying Protein from Miracle Fruit*. *Science*, 1968. **161**(3847): p. 1241-&.
- [18]. Liepinsh, E. and G. Otting, *Organic solvents identify specific ligand binding sites on protein surfaces*. *Nature Biotechnology*, 1997. **15**(3): p. 264-268.
- [19]. Liu, X.Z., et al., *Purification, Complete Amino-Acid-Sequence and Structural Characterization of the Heat-Stable Sweet Protein, Mabinlin-Ii*. *European Journal of Biochemistry*, 1993. **211**(1-2): p. 281-287.
- [20]. Mattos, C. and D. Ringe, *Locating and characterizing binding sites on proteins*. *Nature Biotechnology*, 1996. **14**(5): p. 595-599.
- [21]. Melacini, G., R. Boelens, and R. Kaptein, *Band-selective editing of exchange-relay in protein-water NOE experiments*. *Journal of Biomolecular Nmr*, 1999. **13**(1): p. 67-71.
- [22]. Derjaguin, B. and L. Landau, *Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged-Particles in Solutions of Electrolytes*. *Progress in Surface Science*, 1993. **43**(1-4): p. 30-59.
- [23]. Hermans, J.J. and J.T.G. Overbeek, *The Dimensions of Charged Long Chain Molecules in Solutions Containing Electrolytes*. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 1948. **67**(11): p. 761-776.
- [24]. Kim, S.H., et al., *Redesigning a Sweet Protein - Increased Stability and [Renaturability]*. *Protein Engineering*, 1989. **2**(8): p. 571-575.
-

- [25]. Hirayama, K., et al., *Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **173**(2): p. 639-646.
- [26]. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of Serum-Albumin*. Advances in Protein Chemistry, Vol 45, 1994. **45**: p. 153-203.
- [27]. Emerson, T.E., *Unique Features of Albumin - a Brief Review*. Critical Care Medicine, 1989. **17**(7): p. 690-694.
- [28]. Goldberg, R.J., *A Theory of Antibody Antigen Reactions .I. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody*. Journal of the American Chemical Society, 1952. **74**(22): p. 5715-5725.
- [29]. Brown, K.R. and M.J. Natan, *Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces*. Langmuir, 1998. **14**(4): p. 726-728.
- [30]. Schmitt, J., et al., *Preparation and optical properties of colloidal gold monolayers*. Langmuir, 1999. **15**(9): p. 3256-3266.
- [31]. Sau, T.K., et al., *Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles*. Journal of Nanoparticle Research, 2001. **3**(4): p. 257-261.
- [32]. Uzun, O., et al., *Water-soluble amphiphilic gold nanoparticles with structured ligand shells*. Chemical Communications, 2008(2): p. 196-198.
- [33]. Courrol, L.C., F. Silva, and L. Gomes, *A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **305**(1-3): p. 54-57.
- [34]. Henglein, A., *Physicochemical Properties of Small Metal Particles in Solution - Microelectrode Reactions, Chemisorption, Composite Metal Particles, and the Atom-to-Metal Transition*. Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(21): p. 5457-5471.
- [35]. Henglein, A., *Small-Particle Research - Physicochemical Properties of Extremely Small Colloidal Metal and Semiconductor Particles*. Chemical Reviews, 1989. **89**(8): p. 1861-1873.
- [36]. Alivisatos, A.P., *Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(31): p. 13226-13239.
- [37]. Perenboom, J., P. Wyder, and F. Meier, *Electronic-Properties of Small Metallic Particles*. Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 1981. **78**(2): p. 173-292.
- [38]. Hughes, A.E. and S.C. Jain, *Metal Colloids in Ionic-Crystals*. Advances in Physics, 1979. **28**(6): p. 717-828.
-

- [39]. Kamat, P.V. and D. Meisel, *Semiconductor nanoclusters - Physical, chemical, and catalytic aspects - Introduction*. Semiconductor Nanoclusters- Physical, Chemical, and Catalytic Aspects, 1997. **103**: p. 1-3.
- [40]. Brus, L.E., *A Simple-Model for the Ionization-Potential, Electron-Affinity, and Aqueous Redox Potentials of Small Semiconductor Crystallites*. Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(11): p. 5566-5571.
- [41]. Brus, L.E., *Electron Electron and Electron-Hole Interactions in Small Semiconductor Crystallites - the Size Dependence of the Lowest Excited Electronic State*. Journal of Chemical Physics, 1984. **80**(9): p. 4403-4409.
- [42]. Brus, L., *Quantum crystallites and nonlinear optics* Applied Physics A: Materials Science & Processing, 1991. **53**(6): p. 465-474.
- [43]. Kerker, M., *The Optics of Colloidal Silver - Something Old and Something New*. Journal of Colloid and Interface Science, 1985. **105**(2): p. 297-314.
- [44]. Faraday, M., *The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light*. Philosophical Transactions, 1857. **147**: p. 145-181.
- [45]. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien speziell kolloidaler Goldlösungen*. Annalen der Physik, 1908. **25**(3): p. 377-445.
- [46]. Kerker, M., *The scattering of light, and other electromagnetic radiation* Academic Press: New York, 1969.
- [47]. Creighton, J.A. and D.G. Eadon, *Ultraviolet Visible Absorption-Spectra of the Colloidal Metallic Elements*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1991. **87**(24): p. 3881-3891.
- [48]. Mulvaney, P., *Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles*. Langmuir, 1996. **12**(3): p. 788-800.
- [49]. Kreibig, U., *Optical Properties of Metal Clusters*. Vol. 25. 1995, Berlin: Springer.
- [50]. Hayat, M.A., *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. 1989, San Diego CA: Academic Press.
- [51]. Mann, S., et al., *Biologically programmed nanoparticle assembly*. Advanced Materials, 2000. **12**(2): p. 147-150.
- [52]. Mrksich, M., *A surface chemistry approach to studying cell adhesion*. Chemical Society Reviews, 2000. **29**(4): p. 267-273.
- [53]. Bright, R.M., et al., *Chemical and electrochemical Ag deposition onto preformed Au colloid monolayers: Approaches to uniformly-sized surface features with Ag-like optical properties*. Langmuir, 1996. **12**(3): p. 810-817.
-

- [54]. Elghanian, R., et al., *Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles*. *Science*, 1997. **277**(5329): p. 1078-1081.
- [55]. Freeman, R.G., et al., *Self-Assembled Metal Colloid Monolayers - an Approach to Sens Substrates*. *Science*, 1995. **267**(5204): p. 1629-1632.
- [56]. Taton, T.A., C.A. Mirkin, and R.L. Letsinger, *Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes*. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1757-1760.
- [57]. Nath, N. and A. Chilkoti, *A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(3): p. 504-509.
- [58]. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999. **103**(40): p. 8410-8426.
- [59]. Mirkin, C.A., et al., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
- [60]. Kiely, C.J., et al., *Spontaneous ordering of bimodal ensembles of nanoscopic gold clusters*. *Nature*, 1998. **396**(6710): p. 444-446.
- [61]. Brust, M. and C.J. Kiely, *Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002. **202**(2-3): p. 175-186.
- [62]. Brust, M., et al., *Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1994(7): p. 801-802.
- [63]. Schaaff, T.G. and R.L. Whetten, *Giant gold-glutathione cluster compounds: Intense optical activity in metal-based transitions*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(12): p. 2630-2641.
- [64]. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 2nd ed. 1992, New York: Academic Press, Chapter 10.
- [65]. Stavens, K.B., et al., *Encapsulation of neutral gold nanoclusters by resorcinarenes*. *Langmuir*, 1999. **15**(24): p. 8337-8339.
- [66]. Kim, B., S.L. Tripp, and A. Wei, *Self-organization of large gold nanoparticle arrays*. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. **123**(32): p. 7955-7956.
-

- [67]. Resmi, M.R., et al., *Charge-transfer complexation of C-60 with diphenyltetrafulvalene (DPTTF) capped gold clusters*. Journal of Colloid and Interface Science, 1999. **217**(2): p. 395-402.
- [68]. Fujihara, H. and H. Nakai, *Fullerenethiolate-functionalized gold nanoparticles: A new class of surface-confined metal-C-60 nanocomposites*. Langmuir, 2001. **17**(21): p. 6393-6395.
- [69]. Sudeep, P.K., et al., *Fullerene-functionalized gold nanoparticles. A self-assembled photoactive antenna-metal nanocore assembly*. Nano Letters, 2002. **2**(1): p. 29-35.
- [70]. Fang, H.J., et al., *Self-assembly of the [60]fullerene-substituted oligopyridines on Au nanoparticles and the optical nonlinearities of the nanoparticles*. Chemical Physics Letters, 2002. **364**(3-4): p. 290-296.
- [71]. Liu, J., et al., *Cyclodextrin-modified gold nanospheres. Host-guest interactions at work to control colloidal properties*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(17): p. 4304-4305.
- [72]. Liu, J., et al., *A "macrocyclic effect" on the formation of capped silver nanoparticles in DMF*. Langmuir, 2002. **18**(16): p. 5981-5983.
- [73]. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles*. Langmuir, 2001. **17**(22): p. 6782-6786.
- [74]. Mallick, K., Z.L. Wang, and T. Pal, *Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2001. **140**(1): p. 75-80.
- [75]. Porta, F., et al., *Synthesis of Au(0) nanoparticles from W/O microemulsions*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **211**(1): p. 43-48.
- [76]. Selvan, S.T., et al., *Gold-polypyrrole core-shell particles in diblock copolymer micelles*. Advanced Materials, 1998. **10**(2): p. 132-+.
- [77]. Teranishi, T., I. Kiyokawa, and M. Miyake, *Synthesis of monodisperse gold nanoparticles using linear polymers as protective agents*. Advanced Materials, 1998. **10**(8): p. 596.
- [78]. Wuelfing, W.P., et al., *Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(48): p. 12696-12697.
-

- [79]. Otsuka, H., et al., *Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol)*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(34): p. 8226-8230.
- [80]. Dai, X.H., Y.W. Tan, and J. Xu, *Formation of gold nanoparticles in the presence of o-anisidine and the dependence of the structure of poly(o-anisidine) on synthetic conditions*. Langmuir, 2002. **18**(23): p. 9010-9016.
- [81]. Esumi, K., et al., *Preparation of gold nanoparticles in formamide and N,N-dimethylformamide in the presence of poly(amidoamine) dendrimers with surface methyl ester groups*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **189**(1-3): p. 155-161.
- [82]. Esumi, K., K. Miyamoto, and T. Yoshimura, *Comparison of PAMAM-Au and PPI-Au nanocomposites and their catalytic activity for reduction of 4-nitrophenol*. Journal of Colloid and Interface Science, 2002. **254**(2): p. 402-405.
- [83]. Frankamp, B.L., A.K. Boal, and V.M. Rotello, *Controlled interparticle spacing through self-assembly of Au nanoparticles and poly(amidoamine) dendrimers*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(51): p. 15146-15147.
- [84]. Vorobyova, S.A., N.S. Sobal, and A.I. Lesnikovich, *Colloidal gold, prepared by interphase reduction*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **176**(2-3): p. 273-277.
- [85]. Tseng, J.Y., M.H. Lin, and L.K. Chau, *Preparation of colloidal gold multilayers with 3-(mercaptopropyl)-trimethoxysilane as a linker molecule*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **182**(1-3): p. 239-245.
- [86]. Sarathy, K.V., et al., *Novel fluorescence and morphological structures in gold nanoparticle-polyoctylthiophene based thin films*. Chemical Physics Letters, 2000. **318**(6): p. 543-548.
- [87]. Brust, M., et al., *Novel Gold-Dithiol Nano-Networks with Nonmetallic Electronic-Properties*. Advanced Materials, 1995. **7**(9): p. 795-&.
- [88]. Vorobyova, S.A., A.I. Lesnikovich, and N.S. Sobal, *Preparation of silver nanoparticles by interphase reduction*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. **152**(3): p. 375-379.
- [89]. Sarathy, K.V., G.U. Kulkarni, and C.N.R. Rao, *A novel method of preparing thiol-derivatised nanoparticles of gold, platinum and silver forming superstructures*. Chemical Communications, 1997(6): p. 537-538.
-

- [90]. Sastry, M., A. Kumar, and P. Mukherjee, *Phase transfer of aqueous colloidal gold particles into organic solutions containing fatty amine molecules*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **181**(1-3): p. 255-259.
- [91]. Yee, C.K., et al., *Novel one-phase synthesis of thiol-functionalized gold, palladium, and iridium nanoparticles using superhydride*. Langmuir, 1999. **15**(10): p. 3486-3491.
- [92]. Yu, Y.Y., et al., *Gold nanorods: Electrochemical synthesis and optical properties*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(34): p. 6661-6664.
- [93]. Chang, S.S., et al., *The shape transition of gold nanorods*. Langmuir, 1999. **15**(3): p. 701-709.
- [94]. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio*. Chemical Communications, 2001(7): p. 617-618.
- [95]. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*. Advanced Materials, 2001. **13**(18): p. 1389-1393.
- [96]. Ahmadi, T.S., et al., *Shape-controlled synthesis of colloidal platinum nanoparticles*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1924-1926.
- [97]. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(19): p. 4065-4067.
- [98]. Wang, Z.L., *Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(6): p. 1153-1175.
- [99]. Bradley, J.S., et al., *Surface spectroscopic study of the stabilization mechanism for shape-selectively synthesized nanostructured transition metal colloids*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(19): p. 4631-4636.
- [100]. Malikova, N., et al., *Layer-by-layer assembled mixed spherical and planar gold nanoparticles: Control of interparticle interactions*. Langmuir, 2002. **18**(9): p. 3694-3697.
- [101]. Esumi, K., et al., *Preparation of anisotropic gold particles using a gemini surfactant template*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **208**(2): p. 578-581.
- [102]. Zhou, Y., et al., *A novel ultraviolet irradiation technique for shape-controlled synthesis of gold nanoparticles at room temperature*. Chemistry of Materials, 1999. **11**(9): p. 2310-+.
-

- [103]. Matthias, S., et al., *Monodisperse diameter-modulated gold microwires*. *Advanced Materials*, 2002. **14**(22): p. 1618-1621.
- [104]. Martin, B.R., et al., *Orthogonal self-assembly on colloidal gold-platinum nanorods*. *Advanced Materials*, 1999. **11**(12): p. 1021-1025.
- [105]. van der Zande, B.M.I., et al., *Colloidal dispersions of gold rods: Synthesis and optical properties*. *Langmuir*, 2000. **16**(2): p. 451-458.
- [106]. Fojtik, A. and A. Henglein, *Laser Ablation of Films and Suspended Particles in a Solvent - Formation of Cluster and Colloid Solutions*. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, 1993. **97**(2): p. 252-254.
- [107]. Mafune, F., et al., *Full physical preparation of size-selected gold nanoparticles in solution: Laser ablation and laser-induced size control*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002. **106**(31): p. 7575-7577.
- [108]. Mafune, F., et al., *Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(35): p. 8333-8337.
- [109]. Mafune, F., et al., *Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(39): p. 9111-9117.
- [110]. Mafune, F., et al., *Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001. **105**(22): p. 5114-5120.
- [111]. Fujiwara, H., S. Yanagida, and P.V. Kamat, *Visible laser induced fusion and fragmentation of thionicotinamide-capped gold nanoparticles*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999. **103**(14): p. 2589-2591.
- [112]. Anelli, P.L., N. Spencer, and J.F. Stoddart, *A Molecular Shuttle*. *Journal of the American Chemical Society*, 1991. **113**(13): p. 5131-5133.
- [113]. Alivisatos, A.P., et al., *From molecules to materials: Current trends and future directions*. *Advanced Materials*, 1998. **10**(16): p. 1297-1336.
- [114]. Storhoff, J.J., et al., *What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?* *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(19): p. 4640-4650.
- [115]. Niemeyer, C.M., W. Burger, and J. Peplies, *Covalent DNA - Streptavidin conjugates as building blocks for novel biometallic nanostructures*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1998. **37**(16): p. 2265-2268.
- [116]. Cobbe, S., et al., *DNA-controlled assembly of protein-modified gold nanocrystals*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107**(2): p. 470-477.
-

- [117]. Kamat, P.V., *Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(32): p. 7729-7744.
- [118]. Grabar, K.C., et al., *Two-dimensional arrays of colloidal gold particles: A flexible approach to macroscopic metal surfaces*. Langmuir, 1996. **12**(10): p. 2353-2361.
- [119]. Hicks, J.F., Y. Seok-Shon, and R.W. Murray, *Layer-by-layer growth of polymer/nanoparticle films containing monolayer-protected gold clusters*. Langmuir, 2002. **18**(6): p. 2288-2294.
- [120]. Nalwa, R.W., *Handbook of Surfaces and Interface of Material 3*. 2001, San Diedo: Academic Press 170-189.
- [121]. Nalwa, R.W., *Handbook of Surface and Interfaces of Materia 5*. 2001, San Diego: Academic Press. 33-71.
- [122]. Lvov, Y., et al., *Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(22): p. 6117-6123.
- [123]. Kimizuka, N., M. Tanaka, and T. Kunitake, *Spatially controlled synthesis of protein/inorganic nano-assembly: Alternate molecular layers of cyt c and TiO₂ nanoparticles*. Chemistry Letters, 1999(12): p. 1333-1334.
- [124]. Ariga, K. and T. Kunitake, *Sequential catalysis in organized multienzyme films*. Protein Architecture, 2000: p. 169-191.
- [125]. Hodak, J., et al., *Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase with a poly(allylamine)ferrocene redox mediator*. Langmuir, 1997. **13**(10): p. 2708-2716.
- [126]. Lambert, G., E. Fattal, and P. Couvreur, *Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 99-112.
- [127]. Yu, X., et al., *Wiring of enzymes to electrodes by ultrathin conductive polyion underlayers: Enhanced catalytic response to hydrogen peroxide*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 4565-4571.
- [128]. Armstrong, F.A. and G.S. Wilson, *Recent developments in faradaic bioelectrochemistry*. Electrochimica Acta, 2000. **45**(15-16): p. 2623-2645.
- [129]. Rusling, J.F., *Enzyme bioelectrochemistry in cast biomembrane-like films*. Accounts of Chemical Research, 1998. **31**(6): p. 363-369.
- [130]. Decher, G., *Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.
-

- [131]. Ladam, G., et al., *Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: Interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers*. *Biomacromolecules*, 2000. **1**(4): p. 674-687.
- [132]. Ladam, G., et al., *Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films*. *Langmuir*, 2001. **17**(3): p. 878-882.
- [133]. Ladam, G., et al., *Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films*. *Biomolecular Engineering*, 2002. **19**(2-6): p. 273-280.
- [134]. Schenkman, J.B., et al., *Charge-dependent sidedness of cytochrome P450 forms studied by quartz crystal microbalance and atomic force microscopy*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001. **385**(1): p. 78-87.
- [135]. Stockton, W.B. and M.F. Rubner, *Molecular-level processing of conjugated polymers .4. Layer-by-layer manipulation of polyaniline via hydrogen-bonding interactions*. *Macromolecules*, 1997. **30**(9): p. 2717-2725.
- [136]. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. 1999: Cambridge University Press. 185.
- [137]. Peter, M.C. and J.R. Lakowicz, *Langmuir Blodgett: An introduction*. 1996: Cambridge University Press.
- [138]. Kreibig, U. and Vonfrags.C, *Limitation of Electron Mean Free Path in Small Silver Particles*. *Zeitschrift Fur Physik*, 1969. **224**(4): p. 307.
- [139]. Kreibig, U., *Kramers Kronig Analysis of Optical Properties of Small Silver Particles*. *Zeitschrift Fur Physik*, 1970. **234**(4): p. 307
- [140]. Kreibig, U. and L. Genzel, *Optical-Absorption of Small Metallic Particles*. *Surface Science*, 1985. **156**(JUN): p. 678-700.
- [141]. Alvarez, M.M., et al., *Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1997. **101**(19): p. 3706-3712.
- [142]. Kittell, C., *Introduction to Solid State Physics*. 1996, Wiley: New York.
- [143]. Ashcroft, N.W. and N.D. Mermin, *Solid State Physics*. 1976, Philadelphia: Saunders College.
- [144]. Yannouleas, C. and R.A. Broglia, *Landau Damping and Wall Dissipation in Large Metal-Clusters*. *Annals of Physics*, 1992. **217**(1): p. 105-141.
- [145]. Cini, M., *Classical and Quantum Aspects of Size Effects*. *Journal of the Optical Society of America*, 1981. **71**(4): p. 386-392.
-

- [146]. Genzel, L., T.P. Martin, and U. Kreibig, *Dielectric Function and Plasma Resonances of Small Metal Particles*. Zeitschrift Fur Physik B-Condensed Matter, 1975. **21**(4): p. 339-346.
- [147]. Kraus, W.A. and G.C. Schatz, *Plasmon Resonance Broadening in Small Metal Particles*. Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(12): p. 6130-6139.
- [148]. Gans, R., *The state of ultramicroscopic silver particles*. Annalen Der Physik, 1915. **47**(10): p. 270-U14.
- [149]. Mohamed, M.B., et al., *Thermal reshaping of gold nanorods in micelles*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(47): p. 9370-9374.
- [150]. Link, S., M.B. Mohamed, and M.A. El-Sayed, *Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(16): p. 3073-3077.
- [151]. vanderZande, B.M.I., et al., *Aqueous gold sols of rod-shaped particles*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(6): p. 852-854.
- [152]. Drexhage, K.H., in *Progress in Optics*. 1974, Wolfe, E: North -Holland, Amsterdam. p. 161-323.
- [153]. Weitz, D.A., et al., *Fluorescent Lifetimes of Molecules on Silver-Island Films*. Optics Letters, 1982. **7**(2): p. 89-91.
- [154]. Aussenegg, F.R., et al., *Novel Aspects of Fluorescence Lifetime for Molecules Positioned Close to Metal-Surfaces*. Surface Science, 1987. **189**: p. 935-945.
- [155]. Leitner, A., et al., *Fluorescence Properties of Dyes Adsorbed to Silver-Islands, Investigated by Picosecond Techniques*. Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry, 1985. **36**(2): p. 105-109.
- [156]. Gersten, J. and A. Nitzan, *Spectroscopic Properties of Molecules Interacting with Small Dielectric Particles*. Journal of Chemical Physics, 1981. **75**(3): p. 1139-1152.
- [157]. Fleischm.M, P.J. Hendra, and McQuilla.Aj, *Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
- [158]. Jeanmaire, D.L. and R.P. Vanduyne, *Surface Raman Spectroelectrochemistry .1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-Amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
- [159]. Pettinger, B. and A. Gerolymatou, *Dyes Adsorbed at Ag-Colloids - Substitution of Fluorescence by Similarly Efficient Surface Fluorescence and Surface Raman-*
-

- Scattering*. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 1984. **88**(4): p. 359-363.
- [160]. Kneipp, K., et al., *Surface-enhanced Raman scattering: A new tool for biomedical spectroscopy*. Current Science, 1999. **77**(7): p. 915-924.
- [161]. Vo-Dinh, T., et al., *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis*. Journal of Raman Spectroscopy, 1999. **30**(9): p. 785-793.
- [162]. Vo-Dinh, T., *Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1998. **17**(8-9): p. 557-582.
- [163]. Nie, S.M. and S.R. Emery, *Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.
- [164]. Lakowicz, J.R., *Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications*. Analytical Biochemistry, 2001. **298**(1): p. 1-24.
- [165]. Lakowicz, J.R., et al., *Intensified fluorescence*. Photonics Spectra, 2001. **35**(10): p. 96-104.
- [166]. Lakowicz, J.R., et al., *Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**(14): p. R240-R249.
- [167]. Gryczynski, I., et al., *Multiphoton excitation of fluorescence near metallic particles: Enhanced and localized excitation*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(9): p. 2191-2195.
- [168]. Soper, S.A., et al., *The Photophysical Constants of Several Fluorescent Dyes Pertaining to Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy*. Photochemistry and Photobiology, 1993. **57**(6): p. 972-977.
- [169]. Amos, R.M. and W.L. Barnes, *Modification of the spontaneous emission rate of Eu³⁺ ions close to a thin metal mirror*. Physical Review B, 1997. **55**(11): p. 7249-7254.
- [170]. Barnes, W.L., *Fluorescence near interfaces: the role of photonic mode density*. Journal of Modern Optics, 1998. **45**(4): p. 661-699.
- [171]. Amos, R.M. and W.L. Barnes, *Modification of spontaneous emission lifetimes in the presence of corrugated metallic surfaces*. Physical Review B, 1999. **59**(11): p. 7708-7714.
- [172]. Michaels, A.M., J. Jiang, and L. Brus, *Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single Rhodamine 6G molecules*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(50): p. 11965-11971.
-

- [173]. Freeman, R.G., Grabar, K.C., Allison, K. J., et al., *Self-Assembled Metal Colloid Monomers: an Approach to Sens Substrates*. Science, 1995. **267**(5204): p. 1929-1632.
- [174]. Eftink, M.R., *Fluorescence quenching reactors: Probing biological macromolecular structures*, in *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. 1991, Dewey, T. G.: Plenum, New York. p. 1-41.
- [175]. Eftink, M.R., *Fluorescence quenching: Theory and application in Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles*. 1991, Lakowicz, J. R.: Plenum, New York. p. 53-126.
- [176]. Swadesh, J.K., P.W. Mui, and H.A. Scheraga, *Thermodynamics of the Quenching of Tyrosyl Fluorescence by Dithiothreitol*. Biochemistry, 1987. **26**(18): p. 5761-5769.
- [177]. Loewenthal, R., J. Sancho, and A.R. Fersht, *Fluorescence-Spectrum of Barnase - Contributions of 3 Tryptophan Residues and a Histidine-Related Ph-Dependence*. Biochemistry, 1991. **30**(27): p. 6775-6779.
- [178]. Rouviere, N., et al., *Immunosuppressor binding to the immunophilin FKBP59 affects the local structural dynamics of a surface beta-strand: Time-resolved fluorescence study*. Biochemistry, 1997. **36**(24): p. 7339-7352.
- [179]. Plessow, R., et al., *Intrinsic time- and wavelength-resolved fluorescence of oligonucleotides: A systematic investigation using a novel picosecond laser approach*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(15): p. 3695-3704.
- [180]. Georghiou, S., T.M. Nordlund, and A.M. Saim, *Picosecond Fluorescence Decay Time Measurements of Nucleic-Acids at Room-Temperature in Aqueous-Solution*. Photochemistry and Photobiology, 1985. **41**(2): p. 209-212.
- [181]. Strickler, S.J. and R.A. Berg, *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*. Journal of Chemical Physics, 1962. **37**(4): p. 814-&.
- [182]. Ford, G.W. and W.H. Weber, *Electromagnetic-Interactions of Molecules with Metal-Surfaces*. Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 1984. **113**(4): p. 195-287.
- [183]. Campion, A., et al., *Electronic-Energy Transfer to Metal-Surfaces - a Test of Classical Image Dipole Theory at Short Distances*. Chemical Physics Letters, 1980. **73**(3): p. 447-450.
- [184]. Sokolov, K., G. Chumanov, and T.M. Cotton, *Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal films*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(18): p. 3898-3905.
-

- [185]. Hayakawa, T., S.T. Selvan, and M. Nogami, *Field enhancement effect of small Ag particles on the fluorescence from Eu³⁺-doped SiO₂ glass*. Applied Physics Letters, 1999. **74**(11): p. 1513-1515.
- [186]. Selvan, S.T., T. Hayakawa, and M. Nogami, *Remarkable influence of silver islands on the enhancement of fluorescence from Eu³⁺ ion-doped silica gels*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(34): p. 7064-7067.
- [187]. Philpott, M.R., *Effect of Surface Plasmons on Transitions in Molecules*. Journal of Chemical Physics, 1975. **62**(5): p. 1812-1817.
- [188]. Weitz, D.A., et al., *The Enhancement of Raman-Scattering, Resonance Raman-Scattering, and Fluorescence from Molecules Adsorbed on a Rough Silver Surface*. Journal of Chemical Physics, 1983. **78**(9): p. 5324-5338.
- [189]. Kummerlen, J., et al., *Enhanced Dye Fluorescence over Silver Island Films - Analysis of the Distance Dependence*. Molecular Physics, 1993. **80**(5): p. 1031-1046.
- [190]. Graham, D., B.J. Mallinder, and W.E. Smith, *Surface-enhanced resonance Raman scattering as a novel method of DNA discrimination*. Angewandte Chemie-International Edition, 2000. **39**(6): p. 1061-+.
- [191]. Graham, D., B.J. Mallinder, and W.E. Smith, *Detection and identification of labeled DNA by surface enhanced resonance Raman scattering*. Biopolymers, 2000. **57**(2): p. 85-91.
- [192]. Kneipp, K., et al., *Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Physical Review E, 1998. **57**(6): p. R6281-R6284.
- [193]. Emory, S.R. and S. Nie, *Screening and enrichment of metal nanoparticles with novel optical properties*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(3): p. 493-497.
- [194]. Michaels, A.M., M. Nirmal, and L.E. Brus, *Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(43): p. 9932-9939.
- [195]. Ren, B., et al., *Confocal microprobe Raman spectroscopy for investigating the aggregation process at the liquid/air interface*. Chemical Physics Letters, 2000. **328**(1-2): p. 17-22.
- [196]. Yoo, D., S.S. Shiratori, and M.F. Rubner, *Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes*. Macromolecules, 1998. **31**(13): p. 4309-4318.
-

- [197]. Shiratori, S.S. and M.F. Rubner, *pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes*. *Macromolecules*, 2000. **33**(11): p. 4213-4219.
- [198]. Siqueira, J.R., et al., *Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006. **110**(45): p. 22690-22694.
- [199]. Almeida, N.L., et al., *Calorimetric and structural investigation of the interaction of lysozyme and bovine serum albumin with poly(ethylene oxide) and its copolymers*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2004. **38**(1-2): p. 67-76.
- [200]. Rezwani, K., et al., *Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al₂O₃ particles: A new model based on zeta potential and UV-vis measurements*. *Langmuir*, 2004. **20**(23): p. 10055-10061.
- [201]. Selvakannan, P., et al., *Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004. **269**(1): p. 97-102.
- [202]. Huang, L., et al., *Synthesis, size control and fluorescence studies of gold nanoparticles in carboxymethylated chitosan aqueous solutions*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007. **316**: p. 398-404.
- [203]. Zhong, Z.Y., K.B. Male, and J.H.T. Luong, *More recent progress in the preparation of Au nanostructures, properties, and applications*. *Analytical Letters*, 2003. **36**(15): p. 3097-3118.
- [204]. Pospieszny, H., *Antiviral activity of chitosan*. *Crop Protection*, 1997. **16**(2): p. 105-106.
- [205]. Sato, T., T. Ishii, and Y. Okahata, *In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency*. *Biomaterials*, 2001. **22**(15): p. 2075-2080.
- [206]. Huang, H.Z. and X.R. Yang, *Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate*. *Biomacromolecules*, 2004. **5**(6): p. 2340-2346.
- [207]. Qi, Z.M., et al., *Characterization of gold nanoparticles synthesized using sucrose by seeding formation in the solid phase and seeding growth in aqueous solution*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(22): p. 7006-7011.
- [208]. Faria, D., N. Gonçalves, and L. Santos, *Uma Demonstração Sobre Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo O Experimento de Raman*. *Química nova*, 1997. **20**(3): p. 319-323.
-

- [209]. Panda, B.R. and A. Chattopadhyay, *Synthesis of Au nanoparticles at "all" pH by H₂O₂ reduction of HAuCl₄*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2007. **7**(6): p. 1911-1915.
- [210]. Qi, Z.M., et al., *Layer-by-layer fabrication and characterization of gold-nanoparticle/myoglobin nanocomposite films*. Advanced Functional Materials, 2006. **16**(3): p. 377-386.
-

Perspectivas

Otimizar o sistema de deposição de BSA em substratos sólidos pelo aumento da concentração de PAH e BSA em valores diferentes de pH, e estudar os seus tempos de vida de fluorescência.

Fabricar outras interfaces formadas por outros polímeros promissores, tais como ácido polivinil sulfônico (PVS), poliamidoamina (PAMAM) e outras proteínas e/ou resíduos de aminoácidos ou marcadores fluorescentes.

Estudar os tempos de vidas de fluorescência da BSA em filmes formados com nanopartículas de ouro.

Estudar a interação de outras moléculas fluorescentes com nanopartículas metálicas tais como ouro, prata, etc, e investigar os possíveis efeitos sobre suas propriedades fluorescentes visando o aumento da eficiência quântica de fluorescência.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)