UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGHIN
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
BARÃO GERALDO CEP 13083-970
Caixa postal 6165 Campinas -SP

Estudo de agregados de moléculas fosfolipídicas em superfície sólida para simulação de membranas biológicas

Andreza Barbosa Gomide

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Física Gleb Wataghin da
Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Doutor em Ciências

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado defendida pela aluna Andreza Barbosa Gomide e aprovada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. David Mendez Soares
Orientador da Candidata

Durante o desenvolvimento do trabalho a autora recebeu auxilio da CAPES

Campinas, 06 de abril de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO IFGW – UNICAMP

G586e

Gomide, Andreza Barbosa
Estudo de agregados de moléculas fosfolipídicas em superfície sólida para simulação de membranas biológicas / Andreza Barbosa Gomide. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: David Mendez Soares.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Microbalança de cristal de quartzo. 2. Microbalança de cristal de quartzo eletroquímica. 3. Água – Propriedades. 4. Fosfolipídios. 5. Interfaces (Ciências físicas). 6. Filmes de Langmuir. 7. Módulo de cisalhamento. 8. Microscopia de força atômica. I. Soares, David Mendez. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

(vsv/ifgw)

- **Título em inglês:** Study of phospholipid molecule aggregates on a solid surface for simulation of biological membranes
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
  1. Quartz crystal microbalance
  2. Electrochemical quartz crystal microbalance
  3. Water – Properties
  4. Phospholipids
  5. Interfaces (Physical sciences)
  6. Langmuir films
  7. Shear modulus
  8. Atomic force microscopy
- **Área de Concentração:** Físico-química
- **Titulação:** Doutora em Ciências
- **Banca Examinadora:**
  Prof. David Mendez Soares
  Prof. Omar Teschke
  Prof. Celso Aparecido Bertran
  Profª Rosangela Itri
  Profª Elizabeth Fátima de Souza
- **Data da Defesa:** 01-03-2011
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ANDREZA BARBOSA GOMIDE – RA 066862,** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN" DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 01/03/2011.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. David Mendez Soares – DFA/IFGW/UNICAMP

(Orientador da Candidata)

Prof. Dr. Omar Teschke – DFA/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Celso Bertran - IQ/UNICAMP

Profa. Dra. Rosangela Itri – IF/USP

Profa. Dra. Elizabeth Fátima de Souza – FQ/PUC-CAMPINAS

Dedico aos meus Pais

Pelas conversas e conselhos antes de qualquer decisão a ser tomada pelo amor, carinho, paciência e compreensão dados a todo momento pela educação e lição de vida que me foi ensinada.

Vocês,
que renunciaram aos seus sonhos para que os meus se tornassem realidade, MUITO OBRIGADA!!

Sem vocês não teria chegado até aqui.

Às minhas irmãs

Por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos
Pelo amor, carinho e paciência
Pelos momentos de descontração e risadas.

À minha sobrinha,

que trouxe alegria quando eu mais estava precisando, renovando minha energia e dando-me força para continuar e terminar esse trabalho.

Amo muito todos vocês!!!

Agradecimentos

Agradeço muito a Deus, por tudo.

Ao Prof. David, meu orientador e grande amigo, pela infinita paciência, incentivo em trabalhar fora do Brasil para que eu tivesse um crescimento profissional e, também, pessoal. Pelas discussões e quase "brigas", por dar-me liberdade para que expressasse minhas opiniões, enfim, por toda a orientação e sabedoria a mim transmitida.

Aos Prof. Mário Tenan, Elizabeth de Souza e Omar Teschke pelos comentários certeiros, proveitosos e justos dados na hora certa.

À Profª Eneida de Paula e Maria Angélica Perillo pela confiança, orientação e oportunidade oferecida em trabalhar em Córdoba, Argentina, através do Projeto de Cooperação Internacional entre o Instituto de Biologia da UNICAMP e a Faculdad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales da Universidade Nacional de Córdoba. Aprendi muito e fiz grandes amigos.

Ao Prof. Peter Hauptman e Dr. Ralf Lucklum pela confiança, orientação e oportunidade oferecida em trabalhar em Magdeburg, Alemanha, através do projeto Alfa/Petra II.

Ao Luiz, técnico do laboratório, pela imensa paciência, amizade e ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao Wyllerson, Juracyr e Roberto pela paciência, amizade e compreensão durante todo o tempo.

Aos funcionários da Pós-graduação do IFGW, em especial à Maria Ignez e Armando, pelo apoio e informações dadas.

À CAPES pela bolsa de doutorado e auxílios financeiros fornecidos para participação em congressos nacionais e internacionais.

Enfim, pessoas passam em nossas vidas sempre deixando marcas em nosso caminho. Todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído de certa forma deixaram sua marca aqui. É sempre injusto citar somente alguns pelo nome, deixando de fora todos os outros que contribuíram para que trabalho se tornasse realidade. Portanto, a todos aqueles, amigos de Goiânia, estado de São Paulo e Minas Gerais, aos amigos da Alemanha e Argentina, que tiveram contato comigo durante esses 4 anos de doutorado, meu: MUITO OBRIGADA!

Resumo

Frente à complexidade estrutural e funcional das membranas biológicas, a construção de membranas modelo sobre suporte sólido surge como uma resposta para o estudo daquelas. Para acessar as propriedades estruturais e funcionais de uma membrana biológica é fundamental que a membrana modelo seja capaz de refletir a interface membrana/ambiente aquoso. Portanto, foi feito um estudo da água frente à superfície sólida e verificou-se que a água frente a superfícies pode apresentar estrutura e propriedades físicas como densidade, viscosidade, constante dielétrica, etc. diferentes da águas da massa líquida (*bulk water*). Também investigamos a formação de filmes de fosfolipídios sobre o eletrodo de ouro a partir de soluções de lipossomos. A microbalança de cristal de quartzo (QCM) mostrou os processos de adsorção de lipossomos à superfície do eletrodo de ouro, de ruptura e formação de filmes. Usando a técnica de filmes de Langmuir, determinamos a densidade de fosfolipídios em uma membrana modelo e comparamos com os resultados gravimétricos obtidos com a QCM. Com a técnica de miscroscopia de força atômica (AFM) usando medidas de força *vs.* distância, detectamos a espessura do filme de DMPC (6 nm). Além disso, mostramos que na presença de uma solução 0,5 M de H_2SO_4 o filme formado apresenta uma rugosidade na superfície que muda conforme o potencial aplicado ao eletrodo.

Abstract

Faced with structural and functional complexity of biological membranes, the construction of model membranes on solid support appears as a response to the study of those. To access the structural and functional properties of a biological membrane, it is crucial that the membrane model is able to reflect the interface membrane/aqueous environment. Therefore, a study was made of water contacting a solid surface. It was found that water close to surfaces can have structure and physical properties (as density, viscosity, dielectric constant, etc..) different from bulk water. We also investigated the formation of phospholipid films on the gold electrode from solutions of liposomes. The quartz crystal microbalance (QCM) showed the adsorption of liposomes to the surface of gold electrode, breakdown and formation of a film. Using the technique of Langmuir we determined the density of phospholipids in a membrane model and compared with the gravimetric results obtained with the QCM. With the atomic force microscope (AFM) using the force vs. distance measurement we detected a 6 nm thick DMPC film on the electrode. Furthermore, we showed that in the presence of a 0.5 M solution of H_2SO_4 the film formed on the surface has a roughness that changes with the applied potential to the electrode.

Sumário

AGRADECIMENTOS VII

RESUMO VIII

ABSTRACT IX

LISTA DE ABREVIATURAS XIII

LISTA DE SÍMBOLOS XIV

LISTA DE FIGURAS XV

LISTA DE TABELAS XIX

CAPÍTULO 1 1

1 – Introdução 1

1.1 – Contextualização 1

1.2 – Objetivos do trabalho 3

1.3 – Técnicas empregadas 3

1.4 – Organização do trabalho. 4

CAPÍTULO 2 6

2.1 – Auto-organização de moléculas anfifílicas. 6

2.2 – Membranas biológicas. 11

2.3 – Membranas modelo de membranas biológicas. 13

2.4 – O papel da água. 14

CAPÍTULO 3 16

3– Técnicas Experimentais. 16

3. 1 – Microbalança de cristal de quartzo – QCM. 16

3.2 – Microscopia de força atômica – AFM. 18

3.3 – Filmes de Langmuir. 18

CAPÍTULO 4 22

4 – Material e Métodos. 22

4.1 – Material. 22

4.2 – Métodos. 23
4.2.1 – Limpeza dos substratos. 23
4.2.1.1 – Eletrodo de trabalho usado na técnica de QCM. 23
4.2.1.2 – Substrato de trabalho usado na técnica de AFM 24
4.2.1.3 – Substrato de trabalho usado na técnica de filmes de Langmuir 24
4.2.2 – Preparação de lipossomos. 24
4.2.3 – Preparação dos filmes de Langmuir 26
4.2.4 – Procedimento de medida para a técnica de AFM. 26
4.2.5 – Procedimento de medida para a técnica de filmes de Langmuir. 26
4.2.6 – Procedimento de medida para a técnica da QCM. 26

CAPÍTULO 5 28

5 – Resultados e Discussões 28

5.1 – O comportamento da água na interface sólido-líquida: efeito da adição de NaCl. 28

5.2 – Teoria 29

5.3 – Resultados e discussões. 35

5.4 – Conclusões 43

CAPÍTULO 6 44

6 – Resultados e Discussões 44

6.1 – Adsorção de lipossomos sobre o eletrodo da EQCM em ambiente aquoso. 44

6.2 – Conclusões. 61

CAPÍTULO 7 62

7.1 – Conclusão do trabalho. 62

7.2 – Perspectivas. 63

APÊNDICE A 64

Técnica de Microscopia de Força Atômica 64

APÊNDICE B 68

Medidas de capacidade utilizando lock-in amplifier 68

Medidas de Capacitância e Resistência em Eletroquímica 69

APÊNDICE C 72

Artigo publicado na revista *ChemPhysChem* – janeiro de 2010. 72

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

Lista de abreviaturas

QCM	Microbalança de cristal de quartzo (*Quartz Crystal Microbalance*).
EQCM	Microbalança de cristal de quartzo eletroquímica (*Electrochemical Quartz Crystal Microbalance*).
AFM	Microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy*).
Cmc	Concentração micelar crítica (*Critical Micelle Concentration*).
DMPC	2-dimeristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina.
DPPC	1,2–dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina.
BLM	Black Lipid Membranes.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
NaCl	Cloreto de sódio.
WE	Eletrodo de trabalho (*work electrode*).
G	Fase gasosa.
LE	Fase líquido-expandida.
LC	Fase líquido-condensada.
3-MPA	Ácido 3-mercapto-propiônico.
HCP	Hexagonal compacto (Hexagonal Close Packed)
OCP	*Open Circuit Potential*

Lista de símbolos

f	Frequência da QCM.
ω	Frequência angular; $2\pi f$.
R	Resistência elétrica medida com a QCM.
r	Fricção medida com a QCM.
K	Constante elástica do cristal de quartzo.
k	Constante eletromecânica.
Z_e	Impedância elétrica.
Z_m	Impedância mecânica.
Z_w	Impedância mecânica da água.
t	Tempo.
η	Viscosidade de um fluido.
ρ	Densidade de um fluido.
G	Energia livre de Gibbs.
G	Módulo de cisalhamento de um fluido.
$G´$	Componente de G que corresponde à energia armazenada pelo fluido – Módulo elástico.
$G´´$	Componente de G que corresponde à energia dissipada pelo fluido – Módulo dissipativo.
A	Área ativa do cristal.
N_s	Parâmetro geométrico.
v	Volume da porção hidrofóbica da molécula do surfactante.
L	Comprimento da cadeia apolar.
a_0	Área ótima da cabeça polar na qual a energia de interação por molécula anfifílica atinge um mínimo.
T_c	Transição de fase.
a_m	Área ocupada por molécula.
γ_0	Tensão superficial da solução aquosa antes da adição do anfifílico.
γ	Tensão superficial da solução aquosa depois da adição do anfifílico.
π	Pressão de superficie.

Lista de figuras

FIGURA 1 – MODELO DE UMA MOLÉCULA ANFIFÍLICA, CUJO COMPRIMENTO TOTAL É APROXIMADAMENTE DE 29 Å. 6

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FOSFATIDILCOLINA, FOSFOLIPÍDIO MAIS COMUM NA MEMBRANA BIOLÓGICA. 7

FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTANDO AS POSSIBILIDADES DE AUTO-ORGANIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO[4]. 8

FIGURA 4 – ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DA SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA MEMBRANA BIOLÓGICA. 12

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AGREGAÇÃO DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS EM MEIO AQUOSO FORMANDO VESÍCULA OU LIPOSSOMO. 13

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM DISCO DE QUARTZO RECOBERTO COM ELETRODOS DE OURO – ELETRODO DA QCM. 16

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA OSCILANTE DA QCM. 17

FIGURA 8 – ESQUEMA DE UMA CUBA DE LANGMUIR. NA SUPERFÍCIE ESQUEMATIZA-SE A FORMAÇÃO DE UM FILME DE FOSFOLIPÍDIOS. 19

FIGURA 9 – EQUIPAMENTO DA KSV USADO PARA FAZER MEDIDAS DE PENETRAÇÃO NAS MONOCAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS. 20

FIGURA 10 – ISOTERMA DE FOSFOLIPÍDIO ESQUEMÁTICA, EM QUE G É FASE GASOSA, LE – LÍQUIDO EXPANDIDO, LC – LÍQUIDO CONDENSADO, LE/LC – ESTADO INTERMEDIÁRIO ENTRE EXPANDIDO E CONDENSADO E S – FASE SÓLIDA. CONFORME SE AUMENTA A PRESSÃO A ÁREA OCUPADA POR MOLÉCULA VAI DIMINUINDO.[6] 21

FIGURA 11 – FÓRMULA QUÍMICA ESTRUTURAL DOS FOSFOLIPÍDIOS. 23

FIGURA 12 – ESQUEMA REPRESENTANDO O PROCESSO DE FORMAÇÃO DE LIPOSSOMOS. 25

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE LIPOSSOMOS QUANTO AO DIÂMETRO E NÚMERO DE BICAMADAS (ADAPTADO DE LASIC, 1998). 25

FIGURA 14 – ESQUEMA REPRESENTANDO O PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO COM A QCM, IMERSÃO ALTERNADA DA QCM EM DOIS MEIOS DIFERENTES A E B. 27

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DE *Z*(*R*,*F*) NO PLANO *F* VERSUS *R*. 32

FIGURA 16 – UMA VISUALIZAÇÃO DO "GRAU" DE MOLHABILIDADE DA SUPERFÍCIE SÓLIDA: GOTA DE ÁGUA PURA (A) SOBRE SUPERFÍCIE DE OURO HIDROFÓBICA E (B) SOBRE SUPERFÍCIE DE OURO FUNCIONALIZADA COM 3-MPA. 35

FIGURA 17 – VARIAÇÃO DE *F* E *R* VERSUS TEMPO PARA QCM IMERSA EM ÁGUA DEIONIZADA E, EM SEGUIDA, EM SOLUÇÃO DE NACL 200 MM. SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA. 36

FIGURA 18 – VARIAÇÃO DE *F* E *R* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE NACL EM CONTATO COM SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA DE OURO. 1-H_2O DEIONIZADA, 2-0,2 MM, 3-2 MM, 4-20 MM, 5-154 MM, 6-200 MM, 7-1000 MM, 8-2000 MM. 37

FIGURA 19 – PONTOS DO PLANO *F VERSUS R* PARA ÁGUA E DIVERSAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE NACL: 1-H_2O, NACL: 2-0,2 MM, 3-2 MM, 4-20 MM, 5-154 MM, 6-200 MM, 7-1000 MM, 8-2000 MM; SACAROSE: S1-2 MM, S2-149 MM E S3-303 MM. 38

FIGURA 20 – PONTOS DO PLANO *F VERSUS R* PARA ÁGUA E DIVERSAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE NACL: 1-H_2O DEIONIZADA, NACL: 2-50 MM, 3-100 MM, 4-200 MM, 5-400 MM, 6-1000 MM, 7-2000 MM. 39

FIGURA 21 – CURVAS FORÇA *VS*. DISTÂNCIA PARA SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA DE OURO EM ÁGUA DEIONIZADA E EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SALINAS. 41

FIGURA 22 – CURVA FORÇA *VS*. DISTÂNCIA PARA SUPERFÍCIE HIDROFÍLICA DE MICA EM SOLUÇÃO DE NACL A 1 M. 42

FIGURA 23– VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS *F* E *R* APÓS VOLTAMETRIA EM 0,5 M DE H_2SO_4. (E *VS*. AG/AGCL, KCL SAT.) 45

FIGURA 24 – VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS *I* E *R* DURANTE VOLTAMETRIA. (E *VS*. AG/AGCL, KCL SAT.). 45

FIGURA 25 – VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS *F* E *R* DURANTE "INSERÇÃO INTERCALADA" DA QCM, A) EM ÁGUA DEIONIZADA, B) SOLUÇÃO DE DMPC, C) ÁGUA DEIONIZADA, E D) 0,5 M H_2SO_4. 47

FIGURA 26 – ADSORÇÃO IMEDIATA DE LIPOSSOMOS DA SOLUÇÃO NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE OURO DA QCM. 47

FIGURA 27 – RUPTURA DE ALGUNS LIPOSSOMOS COM FORMAÇÃO DE FILMES DE FOSFOLIPÍDIOS SOBRE O ELETRODO DE OURO DA QCM. 48

FIGURA 28 – VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS *F* E *E* DURANTE "INSERÇÃO INTERCALADA" DA QCM, EM: A) ÁGUA DEIONIZADA, B) SOLUÇÃO DE DMPC, C) ÁGUA DEIONIZADA E D) 0,5 M H_2SO_4. 51

FIGURA 29 – MODELO REPRESENTANDO A MONOCAMADA SUPERIOR DO FILME E OS LIPOSSOMOS CARREGADOS POSITIVAMENTE, PERDENDO O CARÁTER *ZWITTERIÔNICO*, EM SOLUÇÃO DE H_2SO_4 0.5 M. 52

FIGURA 30 – MODELO REPRESENTANDO O FILME DE FOSFOLIPÍDIO FORMADO SOBRE O ELETRODO DA EQCM EM SOLUÇÃO DE H_2SO_4 0.5 M DEPOIS DA EXPULSÃO DOS LIPOSSOMOS. 52

FIGURA 31 – VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS *F* E *R* EM FUNÇÃO DO POTENCIAL DURANTE VOLTAMETRIA. NOTE A DIMINUIÇÃO DE *R* DURANTE A DIMINUIÇÃO DE MASSA, E VICE-VERSA. PRIMEIRA VARREDURA. 53

FIGURA 32 – ESQUEMA REPRESENTANDO A FILME FORMADO DE DMPC SOBRE O ELETRODO DA EQCM NO POTENCIAL DE ZERO CARGA DO OURO. 54

FIGURA 33 – ESQUEMA REPRESENTANDO A FILME FORMADO DE DMPC SOBRE O ELETRODO NA PRESENÇA DE UM CAMPO ELÉTRICO E DEVIDO AO POTENCIAL ANÓDICO DE E = 1,0 V APLICADO AO ELETRODO DA EQCM. 55

FIGURA 34 – VARIAÇÃO MENOR DOS PARÂMETROS *F* E *R* EM FUNÇÃO DO POTENCIAL DURANTE VOLTAMETRIA, PARA A 12ª VARREDURA. 56

FIGURA 35 – ISOTERMA DE LANGMUIR DE DPPC. 57

FIGURA 36 – CURVA FORÇA *VS*. DISTÂNCIA PARA SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA DE OURO EM CONTATO COM A DISPERSÃO DE LIPOSSOMOS DE DMPC, A) LOGO QUE O SUBSTRATO FOI COLOCADO EM CONTATO COM A DISPERSÃO DE LIPOSSOMOS E B) 85 MINUTOS DEPOIS DO CONTATO. APÓS 13 MINUTOS JÁ HAVIA A FORMAÇÃO DE CAMADA DE FOSFOLIPÍDIO SOBRE A SUPERFÍCIE DE OURO. 58

FIGURA 37 – MEDIDA TOPOGRÁFICA COM A AFM EM MODO NÃO CONTATO EM MEIO LIQUIDO. A) IMEDIATAMENTE APÓS A INSERÇÃO DO SUBSTRATO EM SOLUÇÃO DE LIPOSSOMOS E B) APÓS 85 MINUTOS. 59

FIGURA 38 – MEDIDAS COM O LOCK-IN DE CAPACIDADE E RESISTÊNCIA DA INTERFACE SÓLIDO/LÍQUIDO EM FUNÇÃO DO POTENCIAL DO ELETRODO DE TRABALHO IMERSO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE H_2SO_4 0,5 M À FREQUÊNCIA DE 100 HZ. A) ANTES E B) DEPOIS DA FORMAÇÃO DO FILME DE DMPC SOBRE A SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE OURO. 60

FIGURA 39 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CAPACIDADE MEDIDA PARA SUPERFÍCIE DE OURO COBERTA COM FILME DE DMPC. 61

FIGURA A 1 – PONTA DE TESTE, *TIP*, DA TÉCNICA DE AFM. 64

FIGURA A 2 – CONFIGURAÇÃO DO AFM. 65

FIGURA A 3 – MODOS DE TRABALHO DO AFM. 65

FIGURA A 4 – AFM *SNAP-OUT*. 66

FIGURA A 5 – AFM *SNAP-IN*. 67

FIGURA B 1 – LOCK-IN AMPLIFIER. 68

FIGURA B 2 – CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL DA CÉLULA ELETROQUÍMICA.....69

FIGURA B 3 – MONTAGEM EXPERIMENTAL UTILIZANDO O LOCK-IN E POTENCIOSTATO.....70

Lista de tabelas

TABELA 1 – EXEMPLO DE AGREGADOS DE ANFIFILICOS[31]. 9

Capítulo 1

1 – Introdução

1.1 – Contextualização

Agregados coloidais formados por associações de moléculas anfifílicas (com afinidade por óleo e água) em sistemas aquosos estão presentes nas formas de fosfolipídios, ácidos nucléicos, etc. O estudo destes agregados, suas funções, sua constituição forma hoje um novo ramo de estudos, que é a bionanotecnologia, com a qual se procura implementar em nível molecular funções, nano máquinas, nano montadores (*nano-assemblers*), imitando as estruturas existentes em organismos vivos na natureza[1,2]. Além disso, os sistemas coloidais também apresentam inúmeras aplicações em processos industriais[3,4].

É importante observar que os fenômenos que ocorrem nesses sistemas têm um papel importante na gênese da físico-química, por estabelecerem uma conexão entre a química descritiva e a física teórica. Einstein obteve as relações entre o movimento Browniano das partículas e os coeficientes de difusão das mesmas, em meio líquido. Jean Baptiste Perrin usou estas relações para determinar um valor definitivo para o número de Avogadro. M. Smoluchowski deduziu uma expressão para explicar o papel da difusão em reações bimoleculares em geral[5].

Um dos primeiros a fazer referências a agregados anfifílicos foi McBain, quando afirmou em um simpósio que: “A pressão osmótica dos sais de ácido graxo (moléculas anfifílicas) mostra uma pronunciada descontinuidade na curva de concentração, ficando constante após um determinado ponto... Isso se deve à auto-associação das moléculas em estruturas, denominadas micelas.”, o “chairman” reagiu à frase dizendo: “Isso não tem sentido!”. Apesar desta recepção não entusiástica, a idéia estava correta. Suas observações levaram a debates sobre estruturas de conjuntos anfifílicos, formação de agregados etc., e ao estudo das moléculas anfifílicas em geral.

De fato, elas podem se auto-organizar em sistemas aquosos acima de uma concentração micelar crítica, cmc[5].

Os agregados anfifílicos em geral são compostos de duas fases: a fase dispersa (partículas coloidais) e o meio dispersante (solvente), separados por uma região bem definida, chamada interface. Nesta região de alta energia livre ocorrem fenômenos de superfície, tais como: adsorção e formação de dupla camada elétrica, ocorrem[6,7]. As propriedades de superfície dominam o comportamento destes sistemas.

As moléculas anfifílicas se associam fisicamente e não quimicamente. Consequentemente, o tamanho e forma dessas associações mudam em resposta a variações sutis da concentração e composição dos anfifílicos, temperatura, pH da solução, etc.[4,5]. Soluções de surfatantes são estudadas a concentrações tanto abaixo, como acima da *cmc*, nas quais estruturas micelares se encontram presentes em solução. As técnicas convencionais para o estudo de surfatantes incluem ressonância magnética nuclear, difração de raios-X, técnicas de calorimetria, etc[2].

Sobre a superfície sólida as moléculas anfifílicas podem agregar-se formando monocamadas ou bicamadas auto-organizadas que mimetizam bicamadas biológicas, permitindo a fixação de proteínas, glicolipídios, etc. Este fenômeno permite a formação de filmes bidimensionais com nanômetros de espessura para interesses particulares, como por exemplo, sensores de proteínas específicas[8].

Considerando as características de partícula coloidal apresentadas por vesículas e as propriedades da interface sólido-líquido, pode-se antever que a deposição ou não de vesículas carregadas eletricamente seria determinada inicialmente por interações eletrostáticas entre as duplas camadas elétricas associadas às vesículas e à superfície sólida. A seguir, em distâncias suficientemente pequenas entre as vesículas e a superfície sólida, atuariam as forças de atração de van der Waals, provenientes de interações entre dipolos permanentes ou não dos dois materiais constituintes das vesículas e do sólido. Mais ainda, bicamadas de lipídios têm forte força repulsiva de hidratação regida pelas estruturas intrínsecas na interface lipídio-água.

Como as vesículas não são estruturas rígidas, elas podem sofrer distorção, agregação, ruptura ou fusão, dependendo do tamanho, da natureza química dos monômeros ou composição do meio de dispersão. A deposição de vesículas em superfícies sólidas, como agregados de fosfolipídios, pode eventualmente originar um ou uma combinação desses processos[9,10].

A fim de reproduzir em condições controladas de laboratório a estrutura natural das membranas biológicas, diversos grupos de pesquisa trabalham, atualmente, no desenvolvimento de tecnologias que visam a biofuncionalização de uma superfície sólida através da imobilização de biomoléculas especializadas sobre a mesma[11,12,13,14].

Para acessar as propriedades estruturais e funcionais de uma membrana biológica é fundamental que a membrana modelo seja capaz de refletir a interface membrana-ambiente aquoso[15,16]. A água frente a superfícies pode apresentar estrutura e propriedades físicas como densidade, viscosidade, constante dielétrica, etc. diferentes da águas da massa líquida (*bulk water*). As variações da densidade, viscosidade e constante dielétrica, teriam efeito direto na difusão de íons e na força elétrica de atração entre partes polares de moléculas. Conforme trabalhos recentes, a água ainda é uma incógnita[17,18,19]. No artigo recente de Pollack, agregados coloidais em solução aquosa sofrem uma força de repulsão frente a superfícies hidrofílicas, formando-se junto à superfície uma "zona de exclusão". Segundo o autor, a água na zona de exclusão está em um estado estruturado, que "empurra" estes agregados para a massa líquida[20]. Enfim, o estudo da agregação (auto-organização) de fosfolipídios sobre uma superfície sólida em ambiente aquoso, deve levar em conta a dinâmica de transformação desta superfície em contato com a água.

1.2 – Objetivos do trabalho

Neste trabalho, foram estudadas a agregação de fosfolipídios sobre a superfície de um eletrodo sólido de ouro em ambiente aquoso e também as propriedades da água vizinha a este eletrodo e ao filme formado.

1.3 – Técnicas empregadas

Em geral, os fosfolipídios são muito pouco solúveis em água. Empregaram-se então soluções contendo vesículas (lipossomos) dos mesmos (veja em materiais e métodos a formação dos lipossomos).

Foi utilizada, principalmente, a técnica da microbalança de cristal de quartzo eletroquímica, EQCM, por permitir o monitoramento em tempo real (0,1s) da:

- Variação de massa (nanogramas) do eletrodo[21];
- Variação das propriedades viscoelásticas da interface filme-meio contactante[22];
- Mudanças morfológicas que ocorrem na superfície do eletrodo[23];
- Transferência de carga elétrica na interface;
- Variação do potencial elétrico da interface, e
- Impedância elétrica do eletrodo em potenciais determinados.

Outra técnica empregada foi a microscopia de força atômica, AFM. Ela permite visualizar as superfícies formadas e fornece informações topográficas em nível nanométrico sobre as mesmas. A técnica também permite estimar a resistência mecânica dos filmes obtidos até a ruptura dos mesmos, através de curvas de força *vs.* distância.[24].

A técnica de Langmuir foi empregada para preparar monocamadas de fosfolipídios na interface ar-água e inferir sobre a massa de uma monocamada e depois relacionar com os valores obtidos para monocamadas de fosfolipídios sobre o eletrodo solido de ouro através da técnica da QCM.

Técnicas eletroquímicas também foram aplicadas para caracterização dos filmes formados sobre o eletrodo de ouro da EQCM. A combinação das técnicas permitiu um conhecimento qualitativo e quantitativo dos agregados de moléculas fosfolipídicas sobre a superfície do eletrodo de ouro.

1.4 – Organização do trabalho.

Para facilitar a apresentação do trabalho dividimos o texto em 8 capítulos e apêndices conforme descrito abaixo:

Capítulo 1 – Contextualização e objetivos da tese.

Capítulo 2 **–** Revisão de conceitos sobre auto-organização de moléculas anfifílicas, moléculas biológicas e água interfacial.

Capitulo 3 – Descrição resumida das técnicas: microbalança de cristal de quartzo, microscopia de força atômica e filme de Langmuir.

Capítulo 4 – Descrição do material e da metodologia de trabalho empregada, procedimentos de limpeza dos eletrodos, preparação dos lipossomos, etc.

Capitulo 5 – Resultados obtidos relativamente ao comportamento da água na interface sólido-liquido.

Capítulo 6 – Resultados obtidos das medidas da adsorção de lipossomos sobre o eletrodo de ouro da EQCM em ambiente aquoso.

Capítulo 7 – Conclusão do trabalho e perspectivas.

Cópia do artigo, Physical properties of water near a gold surface. A nanorheological analysis, publicado em janeiro de 2010, ChemPhysChem.

Apêndice – Texto referente ao funcionamento da AFM, e o Lock-in.

Capítulo 2

Revisão de conceitos sobre auto-organização de moléculas anfifílicas, moléculas biológicas e água interfacial.

2.1 – Auto-organização de moléculas anfifílicas.

O processo de auto-organização (auto-agregação) ocorre com estruturas moleculares anfifílicas, ou seja, com moléculas que apresentam duas regiões distintas, uma porção hidrofóbica, composta por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas, e uma porção hidrofílica, composta por um grupo polar[25], Figura 1. Os anfifílicos podem ser classificados como: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e zwiteriônicos. Sendo que neste último grupo se incluem muitos lipídios de origem natural, dentre eles os fosfolipídios como a fosfatidilcolina ou lecitina (PC), Figura 2, presente nas membranas biológicas de células animais.

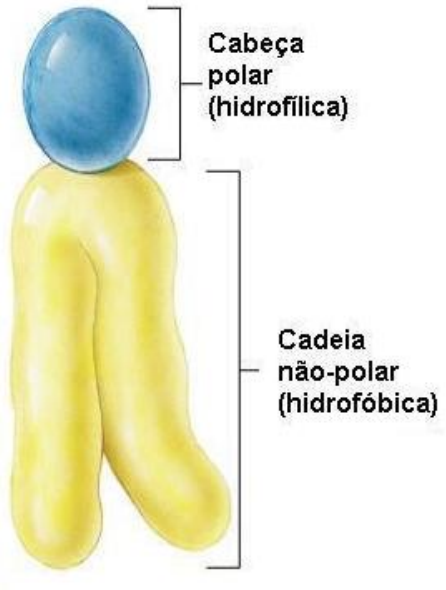

Figura 1 – Modelo de uma molécula anfifílica, cujo comprimento total é aproximadamente de 29 Å[26].

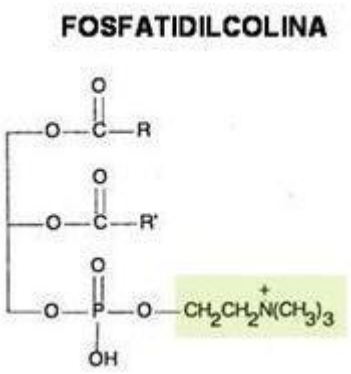

Figura 2 – Estrutura química da fosfatidilcolina, fosfolipídio mais comum na membrana biológica.

Em função da estrutura peculiar das moléculas anfifílicas, as mesmas quando presentes em solução aquosa podem se auto-organizar dando origem a diferentes estruturas como micelas, estruturas do tipo bastão, bicamadas, vesículas, fases hexagonais (invertidas ou não), entre outras formas possíveis, de acordo com a Tabela 1 e a Figura 3. O equilíbrio termodinâmico de uma particular estrutura ocorre quando a energia livre de Gibbs, G, é mínima no sistema[5,27,28,29].

O processo de auto-organização de moléculas surfatantes ocorre para a minimização da energia livre total do sistema. Em solução aquosa, as porções hidrofóbicas das moléculas anfifílicas rompem pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e, portanto estarão em um mínimo de energia quando se auto-associarem para minimizar a área em contato com a água. Já as porções hidrofílicas interagem com a água através de pontes de hidrogênio ou de interações iônicas. Portanto, a estrutura que um agregado lipídico assume em água é determinada pela concentração de monômero e por um balanço entre forças opostas: hidrofóbicas promovendo a auto-associação dos lipídios versus as forças estéricas (forças repulsivas predominantemente entrópicas) e iônicas de auto-repulsão dos mesmos.

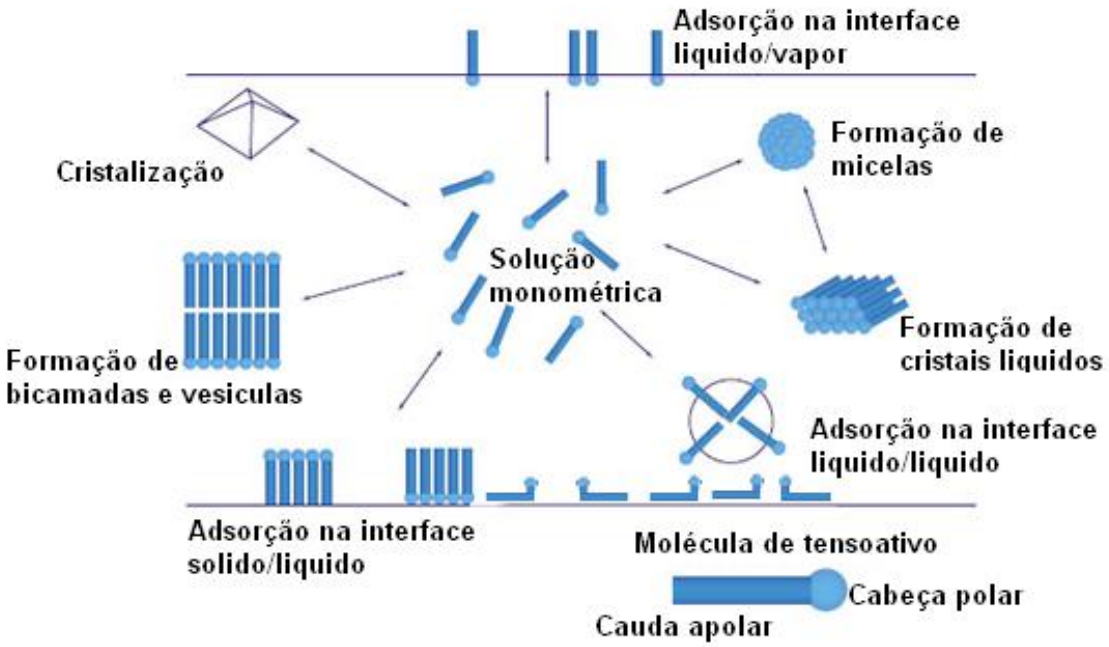

Figura 3 – Esquema representando as possibilidades de auto-organização em meio aquoso4.

Em baixas concentrações, as moléculas anfifílicas existem como monômeros em solução. Com o aumento da concentração sua estabilidade como monômero em solução diminui até que as forças entre as partes hidrofílicas são superadas pelas interações desfavoráveis dos domínios hidrofóbicos com a água. Neste ponto, qualquer aumento de concentração resulta na formação de monômeros auto-associados em equilíbrio, com uma concentração constante de monômeros livres. Esta concentração é denominada concentração micelar crítica, *cmc*.

É fácil concluir que quanto maior a parte hidrofóbica do monômero, menor a *cmc*, e quanto maior a hidrofílica maior a *cmc*. A *cmc* de moléculas anfifílicas iônicas é influenciada pela força iônica (proporcional à condutividade elétrica da solução) do meio que diminui a repulsão coulombiana. Por exemplo, para o dodecilsulfato de sódio (SDS), a *cmc* cai de 8 mM em água deionizada para 0.8 mM na presença de cloreto de sódio (NaCl) a 0.5 M5. As propriedades físicas e a forma das moléculas anfifílicas definem três tipos de estruturas supramoleculares dos lipídios polares e detergentes em solução, (Tabela 1). Detergentes, lisofosfolipídios (contém uma cadeia carbônica) e fosfolipídios com cadeia curta (até 8 carbonos) tem um formato de cone invertido (cabeça polar grande e pequeno domínio hidrofóbico) e se

auto-associam acima da *cmc* como uma estrutura micelar de pequeno raio de curvatura cujo núcleo hidrofóbico exclui totalmente a água. A superfície da micela é bastante rugosa com muitos dos domínios hidrofóbicos expostos à água[30].

Tabela 1 – Exemplo de agregados de anfifilicos[31].

Lipídio	N_s	Forma de empacotamento	Estrutura formada
Lipídios de cadeia simples (surfactantes) com área da cabeça polar grande Exemplo: SDS em baixa concentração de sal	< 1/3	Cone	Micela esférica
Lipídios de cadeia dupla com área de cabeça polar grande, cadeias fluidas Exemplos: fosfatidilcolina (lecitina), fofatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, sais de dealquildimetilamônio, esfingomielina, diexadecilfosfato	½ -1	Tronco de cone	Bicamadas flexíveis,vesículas
Lipídios de dupla cadeia com área de cabeça polar pequena, lipídios aniônicos em alta concentração salina, cadeias saturadas rígidas. Exemplos: fosfatidiletanolamina, fosfatidil serina I + Ca^{2+}	~1	Cilindro	Bicamadas planas

A estrutura geral do auto-agregado reflete o empacotamento de moléculas anfifílicas com energia mínima pelo balanço entre as forças atrativas do efeito hidrofóbico e as forcas repulsivas das cabeças. A *cmc* de lisofosfolipídios e de detergentes varia numa região de micro a milimol. Todavia, os fosfolipídios com cadeia carbônica de 14 ou mais carbonos se auto-associam em concentrações menores do que 10^{-10} M, devido à força hidrofóbica causada por longas cadeias carbônicas. Não formam micelas, organizam-se em estruturas de bicamadas, que permitem o fino empacotamento de cadeias adjacentes com a máxima exclusão da água dos domínios hidrofóbicos. Nas células orgânicas, os fosfolipídios não se encontram como monômeros livres em solução, mas organizados em membranas de bicamadas lipídicas ou em complexos de proteínas[30].

Quando fosfolipídios de cadeia longa diluídos em solvente orgânico são secos, solidificados e, então, hidratados, espontaneamente formam folhas multilamelares de bicamadas separadas por água. A aplicação de ultrassom dispersa essas folhas em bicamadas unilamelares satisfazendo a natureza hidrofóbica dos finais das bicamadas ao fechá-las em vesículas seladas,

também conhecidas por lipossomos, uma bicamada unilamelar contínua com um núcleo aquoso, semelhante às membranas envolvendo células orgânicas. Lipossomos também podem ser preparados por extrusão física de estruturas lamelares através de um pequeno orifício ou por diluição de uma mistura detergente-lipídio abaixo da *cmc* do detergente[30].

Portanto, os principais fatores que determinam a auto-organização das moléculas anfifílicas são o efeito hidrofóbico, as pontes de hidrogênio, as interações eletrostáticas, e estéricas[31]. A variação de entalpia reflete as quebras de ligações de pontes de hidrogênio e interações elétricas. A variação de entropia reflete a mudança no ordenamento das moléculas de água, a hidratação de íons, e a repulsão estérica.

O tamanho e forma do agregado de anfifílico formado são dependentes dos parâmetros moleculares: volume da porção hidrofóbica da molécula, comprimento de cadeia e área da cabeça polar; e das variáveis intensivas: temperatura e força iônica. Desse modo, pode-se prever o agregado ótimo para um determinado conjunto de parâmetros moleculares e variáveis intensivas usando um critério de minimização de energia livre para o monômero no agregado[32]. Pode-se supor que a energia livre de auto-associação de surfatantes em soluções diluídas é constituída de três termos5. Uma contribuição hidrofóbica devido às cadeias apolares, um termo de superfície atribuído aos grupos polares, e um termo de empacotamento que requer que o interior hidrofóbico do agregado exclua água. Termos de superfície e empacotamento assumem diferentes formas funcionais para cada agregado geométrico específico. A forma que corresponde a um mínimo de energia livre para um determinado conjunto de condições determina a estrutura ótima do agregado.

Para soluções diluídas em que interações entre agregados não são importantes, pode-se supor essas concepções convenientemente no parâmetro geométrico (N_s), que é dado por:

$$N_S = \frac{v}{la_0}$$

onde, v é o volume da porção hidrofóbica da molécula do surfatante; l é o comprimento da cadeia apolar e a_0 é a área ótima da cabeça polar na qual a energia de interação por molécula anfifílica atinge um mínimo. A Tabela 1 ilustra a associação entre *Ns* e os agregados

supramoleculares formados. À medida que o parâmetro geométrico aumenta a estrutura supramolecular formada também aumenta[31].

Essas moléculas anfifílicas possuem uma temperatura de transição de fase (T_c), abaixo da qual se encontram na fase gel, que se caracteriza por uma maior rigidez das cadeias hidrocarbônicas, e acima da qual as cadeias estão mais fluídas, com maior liberdade rotacional e menor densidade de empacotamento, estando a bicamada na fase líquido-cristalina. A transição de fase, observada tanto em membranas-modelo, quanto em algumas membranas naturais, depende da carga dos lipídios, da composição molecular da membrana, do número de duplas ligações nas cadeias hidrocarbônicas e da incorporação de outras moléculas na estrutura[33,34,35]. Quanto maior a densidade de empacotamento das cadeias hidrocarbônicas na fase gel, maior será a temperatura de transição de fase[31,36,37,38,39,40].

2.2 – Membranas biológicas.

A membrana biológica constitui o limite das células e das organelas nos tecidos vivos. É através da membrana biológica que as células interagem com o mundo exterior. São partes essenciais de toda célula que têm muitas de suas funções vitais diretamente associadas àquelas. A membrana biológica é constituída essencialmente de bicamada de lipídios; fosfolipídios, glicolipídios e colesterol, associados de maneira semi-fluida, com moléculas de proteínas mergulhadas na bicamada, (Figura 4)[41].

A disposição de bicamada bidimensional imersa em ambiente liquido condutor, confere à membrana biológica, características semelhantes às de um capacitor elétrico de aproximadamente 1 $\mu F/cm^2$. O interior da célula está em geral 200 mV mais negativo do que a parte externa da célula graças às proteínas de transporte de íons potássio, sódio e cálcio, canais iônicos imersos na membrana biológica. Campos elétricos gigantescos da ordem de 400 kV/cm através da membrana conferem à mesma propriedade única de transporte de carga elétrica[41].

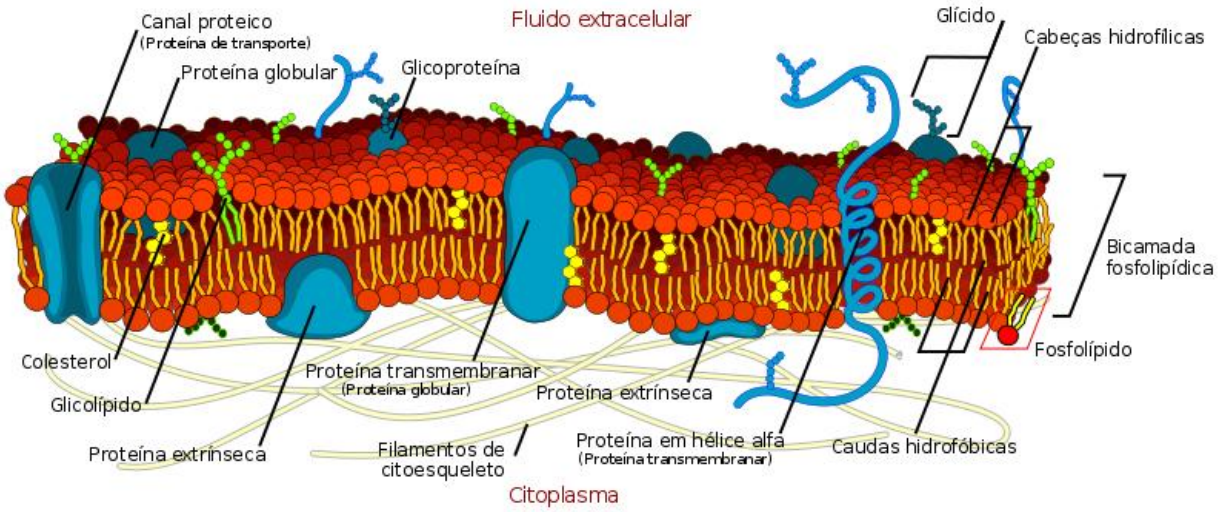

Figura 4 – Esquema tridimensional da secção transversal de uma membrana biológica.

As proteínas associadas à bicamada lipídica possuem, em sua maioria, elevado peso molecular, são pouco solúveis em água, necessitando de um microambiente hidrofóbico/hidrofílico adequado para adquirir sua conformação funcional. Esse microambiente ideal é oferecido pela bicamada lipídica que compõe a matriz da membrana biológica. Essas proteínas possuem diversas funções celulares, por exemplo, facilitar a comunicação entre a célula e o ambiente, sinalização, reconhecimento celular, âncora para anticorpos, etc. o que confere à membrana biológica uma grande versatilidade funcional[41].

Contudo, a complexidade das membranas biológicas e suas interações com as matrizes biológicas intra e extracelular dificultam a investigação das mesmas. Por essa razão, modelos artificiais de membranas biológicas foram desenvolvidos e têm importante papel em revelar suas funções e características físicas e químicas[42,43].

2.3 – Membranas modelo de membranas biológicas.

As membranas modelo são formadas por fosfolipídios. Nos lipossomos, por exemplo, a membrana modelo constitui a casca esférica separando o ambiente líquido interior do exterior, Figura 5. Este modelo, porém, apresenta dificuldades experimentais na hora de medir ou controlar as concentrações do ambiente interno ou os potencias através da membrana[44]. Estes problemas não ocorrem com outro modelo de membranas, as BLM ("*Black Lipid Membranes*"). Elas têm esse nome devido à interferência destrutiva da luz refletida pela face anterior e posterior da membrana. Neste sistema temos uma bicamada presa a um anel, formando um filme circular, suspenso entre dois meios líquidos. Há igual acesso a ambos os lados da membrana. Porém, as BLM caracterizam-se pela pouca estabilidade mecânica e temporal[45]. Com nenhum dos sistemas acima citados é possível usar técnicas de análise de superfícies como as de AFM e EQCM. Portanto, provavelmente, as BLM nunca evoluirão para uma técnica de rotina em laboratório ou para produção em larga escala de biosensores[44].

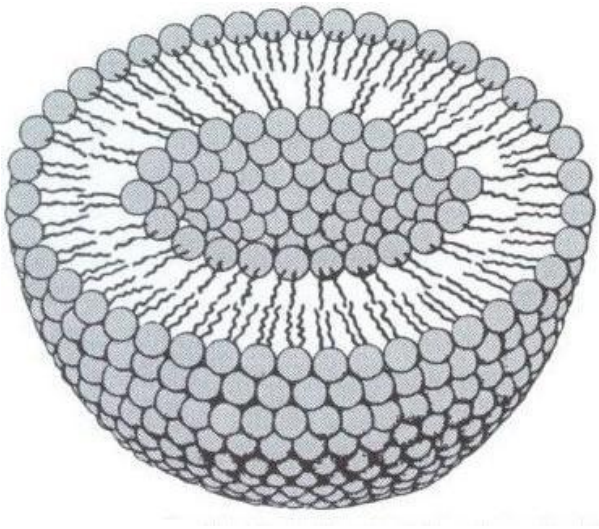

Figura 5 – Representação esquemática de agregação de moléculas anfifílicas em meio aquoso formando vesícula ou lipossomo.

Para superar estas dificuldades membranas suportadas por substratos sólidos foram desenvolvidas na última década[46,47]. Em geral bicamadas de fosfolipídios depositadas sobre superfícies sólidas têm sido o modelo experimental de superfície celular mais usado, permitindo-nos aprender sobre reações imunológicas e adesão celular. Esses sistemas modelo são preparados

pela deposição direta de monocamadas ou bicamadas de fosfolipídios sobre uma superfície sólida para permitir a obtenção de grandes áreas (cm^2) recobertas, que mantém excelente estabilidade mecânica sem perder sua natureza fluida[42,48].

Diversos grupos de pesquisa trabalham no desenvolvimento de uma tecnologia que permita a biofuncionalizaçao de uma superfície sólida através da fixação de biomoléculas especializadas sobre uma membrana planar de fosfolipídios auto-organizados[42]. Estas biomoléculas poderiam ser canais iônicos, peptídios sinalisadores, gangliosidios, etc.[49]

A membrana planar poderia ser ancorada em uma molécula do tipo polietileno glicol, um poliálcool, de maneira a ficar suspensa entre dois meios líquidos. Desse modo poderia fixar proteínas transmembranares como canais iônicos. Esta técnica permitiria experimentos e uso de métodos analíticos que são difíceis ou impossíveis de serem usados com outros modelos de membrana[42,44].

2.4 – O papel da água.

A água é o meio através do qual a maior parte dos processos biológicos e industriais ocorre. Ela é a matriz da vida em nosso planeta e não uma simples estrutura passiva, com muitos papeis ativos na biologia molecular, microscopicamente influenciados por sua estrutura[17,18,19].

A água é entendida pela comunidade científica como sendo um liquido Newtoniano, com densidade e viscosidade homogêneas nos espaços que ocupa. Esta visão dominante da comunidade científica a respeito da água vem principalmente de medidas com viscosímetros[50], espalhamento de nêutrons e simulações por computador. Ela faz sentido se pensarmos no arranjo tetraédrico das moléculas de água nos cristais de gelo, mas ainda não é claro como essa malha constantemente em mudança funciona no meio liquido[17,18]. Simulações por computador exploram o caráter da água em uma escala molecular, porém são muito sensíveis à modelagem feita para as forças entre as moléculas. Devido às dificuldades para esta modelagem ainda não se tem muitas respostas para o comportamento da água[18,19].

Recentemente, várias publicações mostram que a visão acima pode não ser verdadeira, principalmente para as primeiras camadas de água junto à superfície sólida[19,29,40,51,52]. Esta "água interfacial" em contato com superfícies sólidas não seria igual à água da massa líquida; poderia estar estruturada, ter sua densidade modificada, ter suas propriedades dielétricas alteradas[63], etc.

Nos tecidos vivos, as superfícies de células e organelas são permeadas por água. O citoplasma contém tipicamente 400 g/L de macromoléculas as quais podem ocupar de 5 a 40% do volume total da célula. Como resultado a célula é extremamente "povoada" com macromoléculas separadas por distâncias de apenas 1 a 2 nm. A água confinada nesses espaços teria, provavelmente, sua estrutura alterada, com implicações na difusão de moléculas, íons, na hidratação e associação de partes hidrofóbicas de proteínas (*folding and unfolding of proteins*), etc[17-19,29,40,52].

Estes fatos mostram o quanto ainda há de incertezas a respeito do comportamento da água em uma escala molecular. Questões como: A água forma duas fases liquidas sob condições extremas de temperatura e pressão? Como são rearranjadas as moléculas de água junto a superfícies, ou na acomodação de solutos? A água no interior das células é estruturalmente igual à água fora dela? São, hoje, assuntos de amplo debate.

Capítulo 3

Descrição resumida das técnicas de: microbalança de cristal de quartzo, microscopia de força atômica e filme de Langmuir.

3– Técnicas Experimentais.

3. 1 – Microbalança de cristal de quartzo – QCM.

Uma ferramenta excelente para estudar a formação de filmes e de processos de interação dos mesmos com compostos anfifílicos é a microbalança de cristal de quartzo, QCM. Acoplada a um potenciostato a QCM permite a aplicação de técnicas eletroquímicas, tornando-se uma microbalança de cristal de quartzo eletroquímica, EQCM.

Basicamente a QCM consiste em um disco fino de cristal de quartzo piezelétrico em corte AT, cujas faces são recobertas, geralmente, por filmes de ouro policristalino depositado por *"sputtering"* (espessura típica de 400 nm).

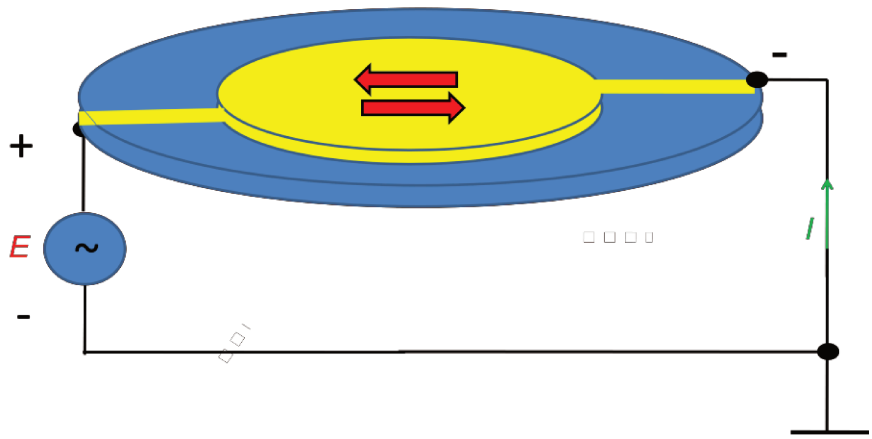

Figura 6 – Representação esquemática de um disco de quartzo recoberto com eletrodos de ouro – eletrodo da QCM.

Um circuito oscilante aplica aos eletrodos um potencial elétrico alternado, *E*, fazendo as faces do cristal oscilar na frequência de ressonância do sistema, *f*, Figura 5. As faces metálicas oscilam transversalmente em sentidos opostos com uma amplitude de alguns angstroms8. Um dos eletrodos, o eletrodo de trabalho (WE), é aterrado e colocado em contato com o meio fluido. Devido ao acoplamento eletromecânico do quartzo, uma onda acústica transversal evanescente se propaga numa direção perpendicular à superfície, atingindo uma distância de penetração máxima de 200 nm, Figura 7. As propriedades mecânicas do meio de contato se refletem nas propriedades elétricas do ressonador[53]. Desse modo a balança permite monitorar variações de massa em filmes finos, assim como variações das propriedades viscoelásticas dos mesmos (*módulo de cisalhamento complexo, G*), *in-situ* e em "tempo real" (~ 0.1 s)[54,55,56]. Empregando-se o mesmo eletrodo sensor de massa da QCM como WE numa célula eletroquímica, podem-se efetuar simultaneamente medidas de transferência de carga elétrica e análise de impedância eletroquímica[57].

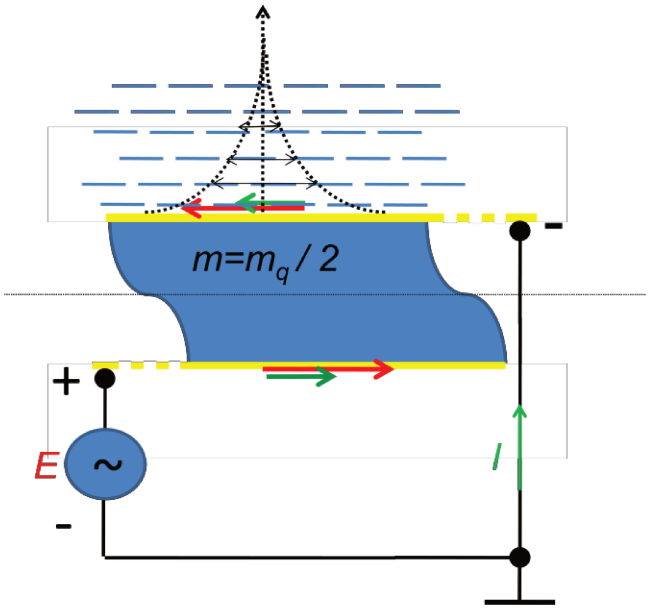

Figura 7 – Representação do sistema oscilante da QCM.

Deste modo, a microbalança é um instrumento poderoso para se examinarem processos eletroquímicos envolvendo filmes finos, inclusive monocamadas e bicamadas[58].

3.2 – Microscopia de força atômica – AFM.

A técnica de microscopia de força atômica, AFM, permite a visualização de superfícies em nível molecular. Ela permite a investigação da morfologia das superfícies de frágeis membranas e de células depositadas sobre um substrato sólido em meio aquoso[59].

A capacidade da AFM de medir a "dureza de superfícies" através da medida da força de penetração do *tip* em soluções aquosas já está bem documentada[60,61]. Ela permite determinar propriedades mecânicas e estruturais do filme adsorvido sobre um substrato plano conhecido, por exemplo. mica, silício, etc. A separação qualitativa dos fatores que governam a interação global entre o *tip* e uma superfície pode ser útil na obtenção não-destrutiva de imagens em sistemas biológicos e químicos em meio aquoso[62]. Os efeitos temporais de forças de repulsão/atração elétricas no espaço confinado entre o *tip* e uma superfície plana, também podem ser estudados utilizando-se diferentes velocidades de aproximação *tip*/superfície[63,64,65,66].

Por meio desta técnica é possível determinar a existência ou não de cargas elétricas sobre a membrana, assim como sua espessura. No apêndice A encontra-se detalhada a descrição da AFM.

3.3 – Filmes de Langmuir.

Usualmente as monocamadas de Langmuir são montadas num aparato conhecido como cuba de Langmuir que consiste em um compartimento raso, feito normalmente com material hidrofóbico (usualmente TEFLON®) que contém a solução na qual se fará o filme, Figura 8.

A maneira usual para preparar uma monocamada com fosfolipídios é dissolvendo-os em solvente orgânico volátil e depositando gotas dessa solução na interface ar/água da cuba. Com o tempo o solvente orgânico evapora da solução. As partes polares dos fosfolipídios permanecem no interior da solução aquosa e as apolares ficam em contato com o ar. Como o fosfolipídio é virtualmente insolúvel na solução, a técnica permite quantificar a quantidade de soluto na superfície e determinar a área ocupada por molécula, a_m.

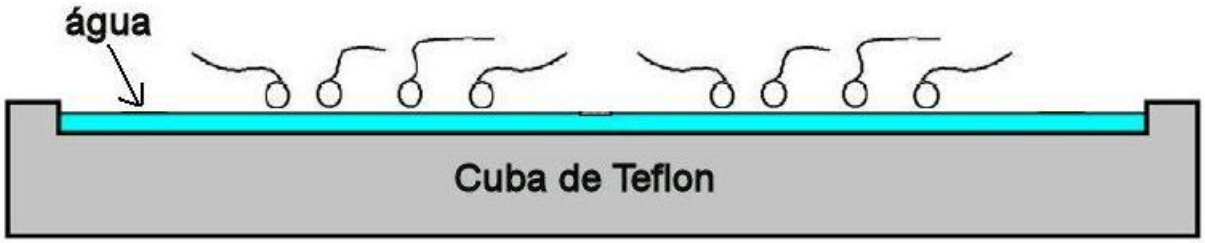

Figura 8 – Esquema de uma cuba de Langmuir. Na superfície esquematiza-se a formação de um filme de fosfolipídios.

Mede-se a tensão superficial da solução aquosa antes da adição do anfifilico, γ_0. Depois de se espalhar o anfifílico, mede-se novamente a tensão superficial, γ. A correspondente queda da tensão superficial é conhecida como pressão de superficie, π[67]:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

A tensão superficial pode ser medida pelo método de Wilhelmy, no qual um sensor (usualmente uma placa de material hidrofílico, no caso desse trabalho foi usado platina) é colocado de forma a interceptar a interface ar-água. Esse sensor é suspenso a um braço conectado à balança, e a força resultante no sensor é proporcional à tensão superficial, Figura 9.

Entre outras possiblidades de análise, essa técnica permite:

- Isotermas de Langmuir, na qual barreiras móveis de TEFLON® comprimem a monocamada e a pressão π é monitorada em função da área por molécula, a_m. Com a compressão da interface por meio de uma ou duas barreiras móveis, a área disponível por moléculas anfifílicas é diminuida, e a pressão π aumenta. Quando a monocamada é comprimida na superfície da água, ela passa por diversas transformações de fase. O gráfico que relaciona pressão *vs.* área é conhecido como isoterma de pressão e fornece informação a respeito de fases superficiais da monocamada, Figura 10. Na fase gasosa (G), as moléculas estão mais dispersas na monocamada, é a fase de menor organização das moléculas; na fase líquido-expandida (LE) as moléculas começam a interagir entre si; e na fase líquido-condensada (LC), as moléculas encontram-se altamente organizadas e compactadas na interface, é a fase de maior organização das moléculas na interface. O colapso indica que a monocamada atingiu uma pressão mais alta

do que poderia suportar mantendo sua organização. Deste ponto em diante a monocamada se desestrutura.

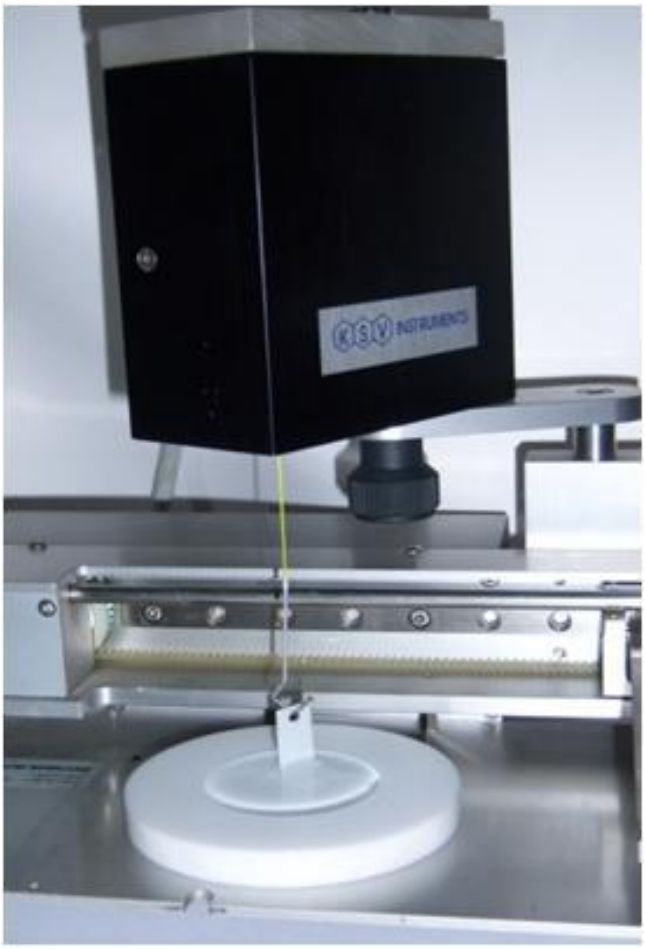

Figura 9 – Equipamento da KSV usado para fazer medidas de penetração nas monocamadas de fosfolipídios.

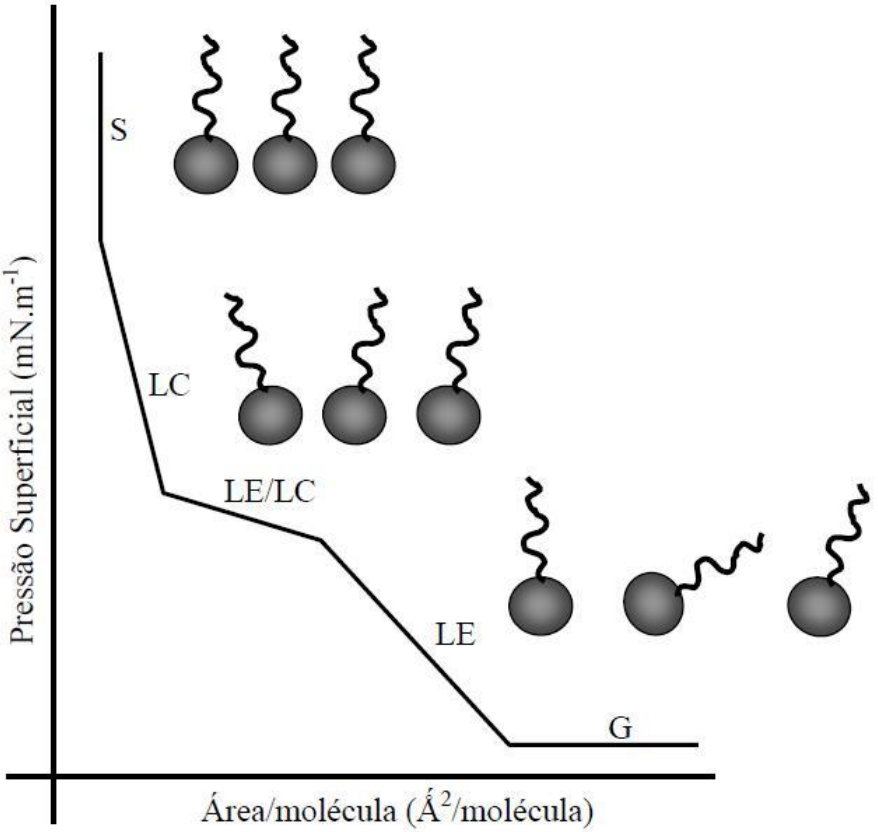

Figura 10 – Isoterma de fosfolipídio esquemática, em que G é fase gasosa, LE – líquido expandido, LC – líquido condensado, LE/LC – estado intermediário entre expandido e condensado e S – fase sólida. Conforme se aumenta a pressão a área ocupada por molécula vai diminuindo.6

Capítulo 4

Descrição do material e da metodologia de trabalho empregada, procedimentos de limpeza dos eletrodos, preparação dos lipossomos, etc.

4 – Material e Métodos.

A seção 4.1 descreve os reagentes usados neste trabalho. Em seguida na seção 4.2 as técnicas de limpeza e procedimentos empregados, assim como a metodologia de trabalho usada. Tais técnicas e procedimentos estão disponíveis na literatura e são citadas no texto.

4.1 – Material.

- NaCl. Produto da Labsynth. Foram usados em varias concentrações – 0.2 mM até 2 M.
- DMPC – 2-dimeristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina – Produto da Sigma.
- DPPC – 1,2–dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina – Produto da Sigma.

Esse conjunto de fosfolipídios, Figura 11, foi escolhido levando-se em conta a cabeça polar ser iônica ou não, o tamanho da cadeia hidrocarbônica e o número de insaturações. Isto é importante, pois a inserção de um anfifílico em uma bicamada de fosfolipídio pode depender não somente da fluidez da bicamada (modificada pela presença de insaturações), mas também da cabeça polar do fosfolipídio. Neste trabalho foi usado o DMPC, que possui 14 carbonos na cadeia hidrocarbônica, para analise com a QCM e o DPPC, que possui 16 carbonos, com a técnica de filmes de Langmuir. Apesar de serem fosfolipídios com cadeia hidrocarbônica diferente, possuem a mesma cabeça polar o que será muito importante para analise dos resultados.

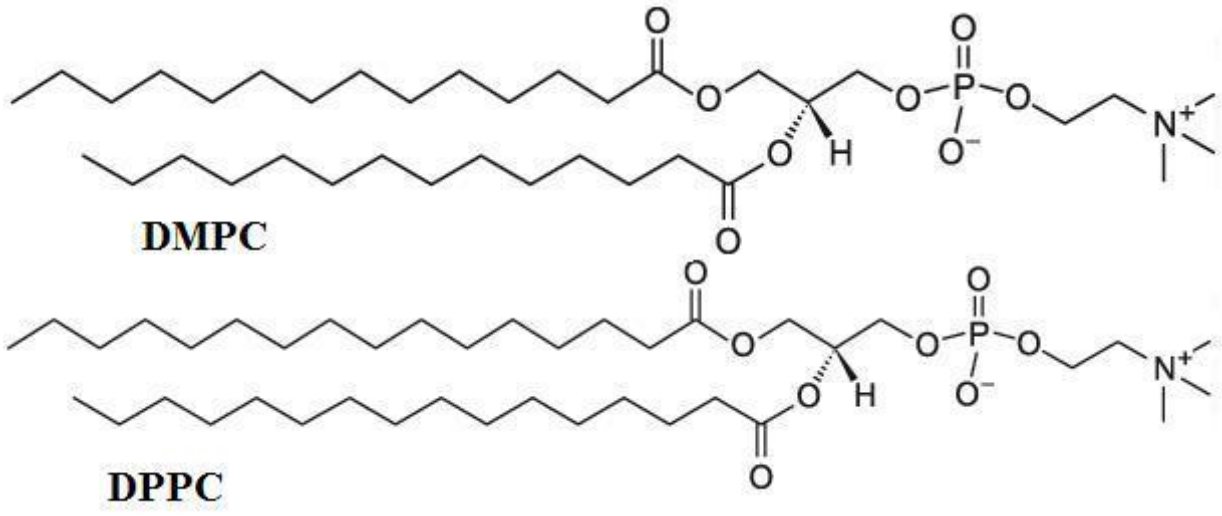

Figura 11 – Fórmula química estrutural dos fosfolipídios.

4.2 – Métodos.

4.2.1 – Limpeza dos substratos.

A superfície de ouro dos substratos deve estar livre de gorduras e demais sujeiras orgânicas. Para isso foram adotados os seguintes procedimentos de limpeza.

4.2.1.1 – Eletrodo de trabalho usado na técnica de QCM.

Os eletrodos de trabalho da QCM (eletrodos de ouro) antes de qualquer utilização foram submetidos ao seguinte processo de limpeza padrão:

- O cristal de quartzo foi enxaguado com álcool isopropílico, em seguida, em etanol e, finalmente, em água Milli-Q®[68].
- Limpeza eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica em ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 M. (velocidade de varredura de 20 mV/s, intervalo de potencial de -0,10 V a 1,10 V *versus* SCE). Sendo que a última varredura foi interrompida a 0,20 V, logo após a formação de hidrogênio, garantindo assim a ausência de óxido de ouro (AuOH) na superfície do eletrodo.

4.2.1.2 – Substrato de trabalho usado na técnica de AFM

Os substratos de trabalho da AFM foram preparados no próprio laboratório usando o equipamento ATC 1300 F, AJA International para fazer *sputtering* colocando ouro na superfície dos substratos. Estes foram utilizados somente para os experimentos com lipossomos, portanto, não requeriam limpeza mais profunda, foram enxaguados com etanol e, em seguida, com água Milli-Q®.

4.2.1.3 – Substrato de trabalho usado na técnica de filmes de Langmuir

Antes de cada experimento as cubas foram lavadas e limpas com álcool 70% e, por diversas vezes, enxaguadas com água bidestilada. A ausência de compostos tensoativos em solventes puros e na solução da subfase (água bidestilada) foi verificada antes de cada começo de medida. Isto foi feito fazendo a aquisição de dados e observando a curva de pressão lateral de superfície com o tempo de imersão da placa de platina em água bidestilada. Depois de certo tempo seria possível verificar a adsorção de impurezas que poderiam estar presentes em quantidades mínimas na cuba, isto é, o sinal de aquisição não estaria estável.

4.2.2 – Preparação de lipossomos.

Um filme foi formado a partir de uma solução de fosfolipídio, DMPC, em clorofórmio, pois essa molécula é insolúvel em água. O fosfolipídio foi, primeiramente, dissolvido em clorofórmio que foi seco sob fluxo de nitrogênio (N_2) e mantido a uma pressão reduzida por um tempo não inferior a 2 h, para remover todos os traços do solvente orgânico. Em seguida, adicionaram-se 100 ml de água Milli-Q® e obteve-se uma dispersão de lipossomos com concentração final cerca de 10^{-4} M. Então, a amostra foi sonicada usando *Ultrasonic cleaner 1440D* por aproximadamente 2 h e na temperatura de 40 °C, para obter uma solução mais homogênea possível de lipossomos, Figura 12[69].

Os lipossomos são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em *(i)* vesículas unilamelares pequenas (SUV), *(ii)* vesículas unilamelares grandes (LUV) e *(iii)* vesículas multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares, formadas por uma bicamada única,

são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-50 nm e em LUV, quando são maiores que 100 nm (Figura 13). Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro compreendido entre 100-1000 nm[70].

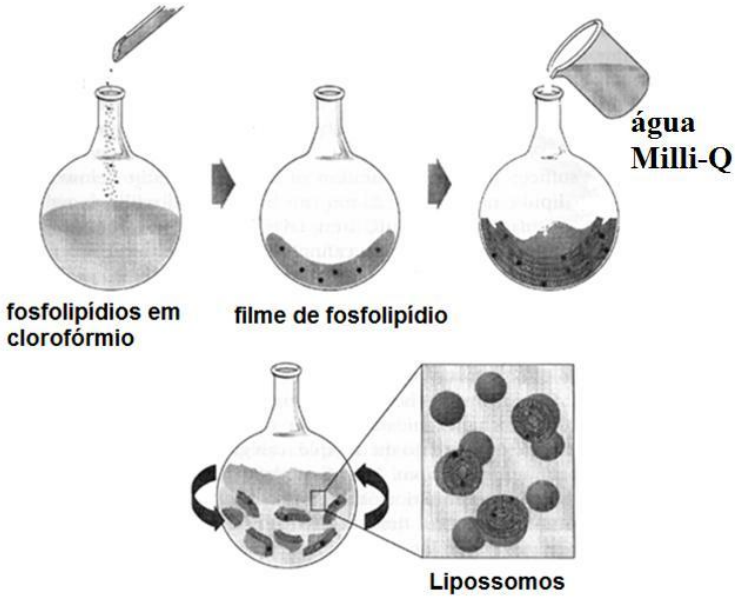

Figura 12 – Esquema representando o processo de formação de lipossomos.

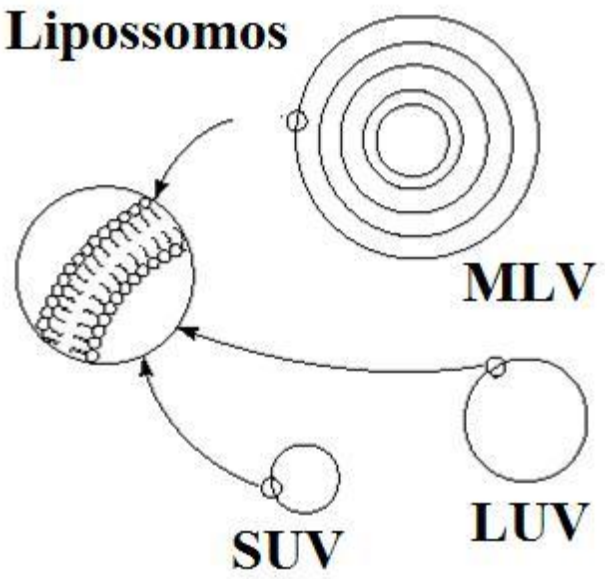

Figura 13 – Representação da classificação de lipossomos quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).

4.2.3 – Preparação dos filmes de Langmuir

Para fazer os filmes de Langmuir foi utilizado o seguinte fosfolipídio:

- DPPC dissolvido em clorofórmio e concentração de 1 µmol/ml.

Todos os experimentos foram feitos a temperatura constante de 26±1°C.

4.2.4 – Procedimento de medida para a técnica de AFM.

Foram usados quatro substratos de ouro hidrofóbicos, preparados conforme seção 4.2.12, que foram deixados em contato com a solução de lipossomos. A cada 15 minutos foi retirado um substrato da solução, em seguida, enxaguado com água Milli-Q®, para retirada do excesso. Uma vez secada a superfície foram feitas medidas usando o equipamento TopoMetrix TMX-2000.

4.2.5 – Procedimento de medida para a técnica de filmes de Langmuir.

Entre 5 e 30 µl de fosfolipídio dissolvido em clorofórmio foram espalhados na interface ar/água da cuba de TEFLON®. Esperaram-se aproximadamente 5 minutos para permitir a evaporação do solvente orgânico. Então, foi feita a aquisição dos dados utilizando o método da placa de Wilhelmy, usando uma placa de platina de 5 mm de largura, 20 mm de comprimento e 0,025 mm de espessura.

4.2.6 – Procedimento de medida para a técnica da QCM.

Uma vez feita a voltametria para limpeza e caracterização da superfície do eletrodo da EQCM, o experimento consistiu em mergulhar a EQCM na seqüência de béqueres com 100 ml de água Milli-Q® e solução a ser estudada, Figura 14. No caso desse trabalho foram usadas soluções salinas de NaCl em várias concentrações, de 0,2 mM ate 2 M, e soluções de lipossomos de concentração de 10^{-4} M. Foi feito controle de temperatura a 25°C. A f e R foram medidos logo depois da estabilização do sinal da EQCM em cada solução.

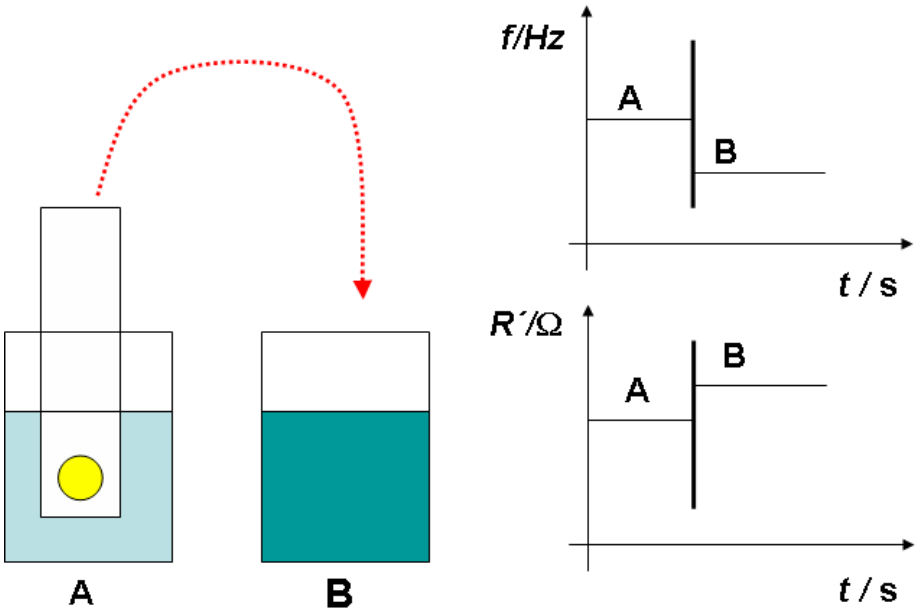

Figura 14 – Esquema representando o procedimento do experimento com a QCM, imersão alternada da QCM em dois meios diferentes A e B.

Capítulo 5

Resultados obtidos relativamente ao comportamento da água na interface sólido-liquido.

5 – Resultados e Discussões

5.1 – O comportamento da água na interface sólido-líquida: efeito da adição de NaCl.

O comportamento da água em interfaces é fortemente dependente do estado hidrofóbico/hidrofílico da superfície com a qual ela está em contato. A água nessa região interfacial tem suas propriedades dinâmicas e estáticas (densidade, viscosidade e constante dielétrica) afetadas devido à diferença na otimização das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água na interface sólido-líquido e na solução adjacente. Estas considerações nos levam a esperar que a água líquida em contato com uma superfície sólida tenha uma estrutura diferente da água em regiões afastadas ("*bulk*") e que, levando ao extremo, possa assumir características de gelo ou de vapor[52,29,38,71,72].

Medidas de propriedades de água líquida em soluções salinas de NaCl são encontradas na literatura[73]. Entretanto, a medida da estrutura e densidade da água em uma interface sólido-líquida não é trivial. Resultados experimentais fornecendo informações indiretas das propriedades interfaciais foram revisados por Israelachvili[31,74] e Vogles[75].

A água na interface sólido-líquida, nas condições de frequência e temperatura utilizadas, é considerada na literatura como líquido viscoso (componente elástica do módulo de cisalhamento, *G'*, é igual a zero),[53,76,77,78,79]. Testes com diferentes concentrações de soluções de NaCl, de 1 mM a 2 M, mostraram, entretanto, que a água na interface é viscoelástica e não pode ser tratada como fluido newtoniano (puramente viscoso). Foi feito, então, um desenvolvimento teórico consistente com a resposta da QCM à água e às soluções salinas aquosas. Também foi constatada a formação

de agregados de sal na superfície hidrofóbica de ouro com a técnica de microscopia de força atômica.

5.2 – Teoria

Os valores experimentais medidos com a QCM são a frequência de ressonância, *f*, e a resistência de ressonância, *R*, do cristal. Estes estão relacionados com a impedância elétrica do cristal de quartzo, Z_e, que, por sua vez, está relacionada com a impedância mecânica do cristal, $Z_e = Z_m/k^2$, onde k é a constante eletromecânica do cristal. A impedância mecânica, Z_m, é a razão entre a força de cisalhamento na superfície do cristal e sua velocidade, dado por:

$$Z_m = F_{cis}/V_{cis}. \quad (1)$$

Se uma face do cristal faz contato com um meio condensado há um aumento da tensão de cisalhamento nesta face. Como as propriedades do cristal são constantes, qualquer variação observada na frequência e resistência de ressonância está relacionada ao meio condensado.

Para um fluido semi-infinito em contato com o eletrodo as forças que se opõem às oscilações de cisalhamento do eletrodo são devidas a: fricção, *r*, do fluido; aceleração de qualquer massa de fluido arrastada pelo eletrodo; e, aceleração de qualquer massa rígida acoplada à superfície do eletrodo. A soma dessas forças é a variação da força de cisalhamento. A correspondente variação de Z_m é dada por termos reais e imaginários, em que a parte real é a fricção, *r*, e a parte imaginária é o produto da frequência angular ($\omega = 2\pi f$) com qualquer massa arrastada ou acoplada à superfície do eletrodo, *m*:

$$\Delta Z_m = r + j\omega m \quad (2)$$

O valor da massa é calculado pela variação da frequência de ressonância do cristal, Δf:

$$m = S\Delta f \quad (3)$$

em que *S* é o inverso da sensibilidade do cristal, dado por:

$$S = -m_q/f, \tag{4}$$

onde m_q é a massa do cristal. Por outro lado, a fricção r é obtida da medida da variação da resistência de ressonância:

$$\Delta R = r/k^2, \tag{5}$$

onde ΔR é a diferença entre o valor R do cristal carregado menos o valor $R_0 = 8\ \Omega$ do cristal descarregado para $f = 5$ MHz.

Supondo um fluido semi-infinito em contato com o eletrodo plano oscilante da QCM. A razão entre a tensão de cisalhamento e a velocidade do fluido no plano de cisalhamento é a impedância característica do fluido:

$$\Delta Z_m = z_{líquido} A = \sqrt{\rho G} A \tag{6}$$

onde ρ é a densidade do fluido, A é a área ativa do cristal e G é o módulo complexo de cisalhamento do fluido.

A correspondente variação da impedância mecânica da QCM pode ser escrita em termos dos parâmetros medidos pela QCM, Equações 3 e 5:

$$\Delta Z_m = k^2 \Delta R + j\omega S \Delta f \tag{7}$$

Substituindo na Equação 6, G por:

$$G = G' + jG'' \tag{8}$$

em que G' responde pela energia armazenada elasticamente e devolvida pelo fluido, enquanto que $G'' = \omega\eta$ (onde η é a viscosidade do fluido e ω é a freqüência de ressonância do cristal) está relacionado à energia dissipada pela transferência de quantidade de movimento pelas moléculas do fluido adjacentes à superfície na direção perpendicular ao eletrodo da QCM, para camadas próximas na solução, e vice-versa. Portanto:

$$\Delta Z_m = \sqrt{\rho(G' + jG'')}A \tag{9}$$

Sabendo que $G'' = \omega\eta 8$, a Equação 9 fica:

$$\Delta Z_m = \sqrt{\rho(G' + j\omega\eta)}A, \tag{10}$$

e, finalmente,

$$\Delta Z_m = \sqrt{j\rho\omega}\eta A\sqrt{(1 - j\frac{G'}{\omega\eta})}. \tag{11}$$

O primeiro termo dentro da raiz quadrada no lado direito da Equação 11 é a impedância de um líquido newtoniano, Equação 6. O termo seguinte corresponde à contribuição viscoelástica do fluido. Na análise que segue, supondo que $\frac{G'}{\omega\eta} \ll 1$ ou ($G' \ll G''$), já que como a água notoriamente se comporta como fluido viscoso no *bulk*, se ela apresentar elasticidade na interface, esta deve ser muito pequena.

Para simplificar as expressões matemáticas foi feito $x = \sqrt{\rho\omega\eta}$. Portanto, a Equação 11 passa a ser:

$$\Delta Z_m \cong e^{\frac{j\pi}{4}}Ax + e^{\frac{j\pi}{4}}\frac{\rho G'}{2x}A. \tag{12}$$

Portanto, os valores esperados para as medidas das variações de *f* e *R* são:

$$\Delta R = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\left(x + \frac{\rho G'}{2x}\right), \tag{13}$$

$$\Delta f = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\left(x - \frac{\rho G'}{2x}\right). \tag{14}$$

Na Figura 15 estão representados os valores medidos pela QCM em um plano *f* versus *R*. O fluido semi-infinito, no caso água deionizada, está representado no plano como o ponto *Z*(*R*,*f*) onde,

$$f = f_0 + \Delta f \tag{15}$$

$$R = R_0 + \Delta R \tag{16}$$

A adição de uma pequena quantidade de soluto ao fluido causará uma variação ΔZ em *Z*. Esta variação pode ser representada pela Equação 17:

$$Z + \Delta Z = Z(R + \Delta R, f + \Delta f) \tag{17}$$

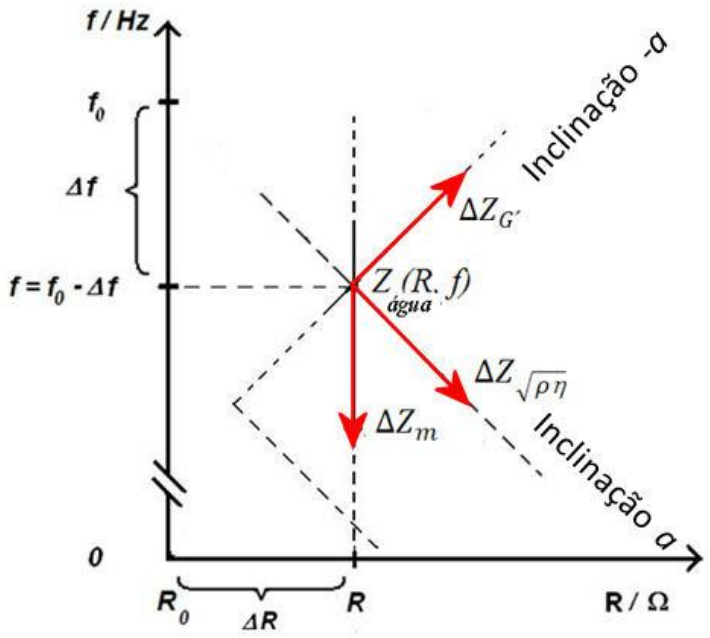

Figura 15 – Representação de *Z*(*R*,*f*) no plano *f* versus *R*.

Para uma área de eletrodo constante, a variação ΔZ pode ser a resultante de uma combinação de três direções, Figura 15. Os casos que determinam estas direções estão relacionados abaixo.

1) Se o fluido é newtoniano, a adição de soluto causa apenas variações das propriedades, ρ e η, do fluido representadas na Figura 15 pelo vetor $\Delta \boldsymbol{Z} = \Delta \boldsymbol{Z}_{\sqrt{\rho\eta}}$, com $\boldsymbol{G'} = \boldsymbol{0}$. As correspondentes variações em $\Delta \boldsymbol{R}$ e em $\Delta \boldsymbol{f}$ calculadas derivando as Equações 13 e 14 em relação a *x*, são:

$$\Delta(\Delta R) = +\frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\Delta x, \tag{18}$$

$$\Delta(\Delta f) = +\frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\Delta x. \tag{19}$$

Qualquer sequência de pontos *Z*(*R*,*f*) de líquidos newtonianos conhecidos definem uma linha newtoniana, indicada pelo vetor $\Delta Z = \Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$ na Figura 15. A razão entre as Equações 19 e 18 é a inclinação da linha newtoniana, *a*, a qual pode ser usada para calibrar a QCM e estimar o valor da constante eletromecânica k^2,

$$\frac{\Delta(\Delta f)}{\Delta(\Delta R)} = +\frac{k^2}{S\omega} = a. \tag{20}$$

2) Se o fluido apresentar alguma estrutura, tal que as interações intermoleculares persistam para pequenas perturbações do sistema, então $\boldsymbol{G'} \neq \boldsymbol{0}$ (há elasticidade), e a adição de soluto pode causar variações $\Delta \boldsymbol{x}$ e $\Delta \boldsymbol{G'}$. Fazendo a hipótese de que a elasticidade é pequena, $\boldsymbol{G'} \ll \boldsymbol{\omega\eta}$, pode-se encontrar ao derivar as Equações 13 e 14 que:

$$\Delta(\Delta R) \cong +\frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\left(\Delta x + \frac{\rho}{2x}\Delta G'\right), \tag{21}$$

$$\Delta(\Delta f) \cong +\frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\left(\Delta x - \frac{\rho}{2x}\Delta G'\right). \tag{22}$$

Para adições pequenas de soluto, tais que $\Delta x \ll \frac{\rho|\Delta G'|}{2x}$ as Equações 21 e 22 podem ser reescritas como:

$$\Delta(\Delta R) = +\frac{\sqrt{2}}{4}\frac{A}{k^2}\frac{\rho}{x}\Delta G', \tag{23}$$

$$\Delta(\Delta f) = -\frac{\sqrt{2}}{4}\frac{A}{\omega S}\frac{\rho}{x}\Delta G', \tag{24}$$

Neste caso, variações de $\Delta G'$ implicam variações de resistência e frequência em fase, isto é, as variações têm mesmo sinal (diferente do caso 1). Uma linha G' pode ser traçada, para valores crescentes de G', indicado pelo vetor $\Delta \boldsymbol{Z} = \Delta \boldsymbol{Z}_{\boldsymbol{G'}}$ conforme mostrado na Figura 15 A variação resultante $\Delta Z = \Delta Z_{G'}$ é um vetor indicado pela flecha na linha reta G' cuja inclinação é dada por, $-a$:

$$\frac{\Delta(\Delta f)}{\Delta(\Delta R)} = -\frac{k^2}{S\omega} = -a. \tag{25}$$

No caso especial de que a adição de soluto leve a uma diminuição de G', $Z(R,f)$ vai se mover no sentido negativo da reta G'. Continuando a adicionar soluto, eventualmente chega-se a situação em que $\Delta x \gg \frac{\rho|\Delta G'|}{x}$ e as Equações 21 e 22 se reduzem às Equações 18 e 19 para fluidos newtonianos. Nesse caso, a resultante variação ΔZ será um vetor paralelo à linha newtoniana, Figura 15.

3) Se a adição de soluto causa apenas a formação de um filme rígido sobre o eletrodo, apenas variação na frequência de ressonância será observada, conforme a Equação 3, sem variação na resistência R. Mesmo que o filme não seja rígido, ele pode ser considerado como tal quando sua espessura for menor do que 100 nm e sua viscosidade comparável com a da agua[79].

$$\Delta(\Delta R) = 0, \tag{26}$$

$$\Delta(\Delta f) = \frac{m_{rigida}}{S}. \tag{27}$$

Em seguida, este desenvolvimento teórico será aplicado para analisar o valores dos parâmetros *R* e *f* obtidos pela QCM imersa em água e em soluções aquosas de NaCl.

5.3 – Resultados e discussões.

A superfície limpa do eletrodo de ouro da QCM em contato com água Milli-Q® apresentou potencial de circuito aberto próximo do potencial de carga zero (0,0 V *vs.* SHE)[54]. Nesse potencial os dipolos de água não apresentam uma orientação preferencial, e a superfície de ouro pode ser considerada hidrofóbica, Figura 16a. Por outro lado, ao se funcionalizar a superfície de outro com uma monocamada de ácido 3-mercapto-propiônico (3-MPA), a superfície torna-se hidrofílica, Figura 16b.

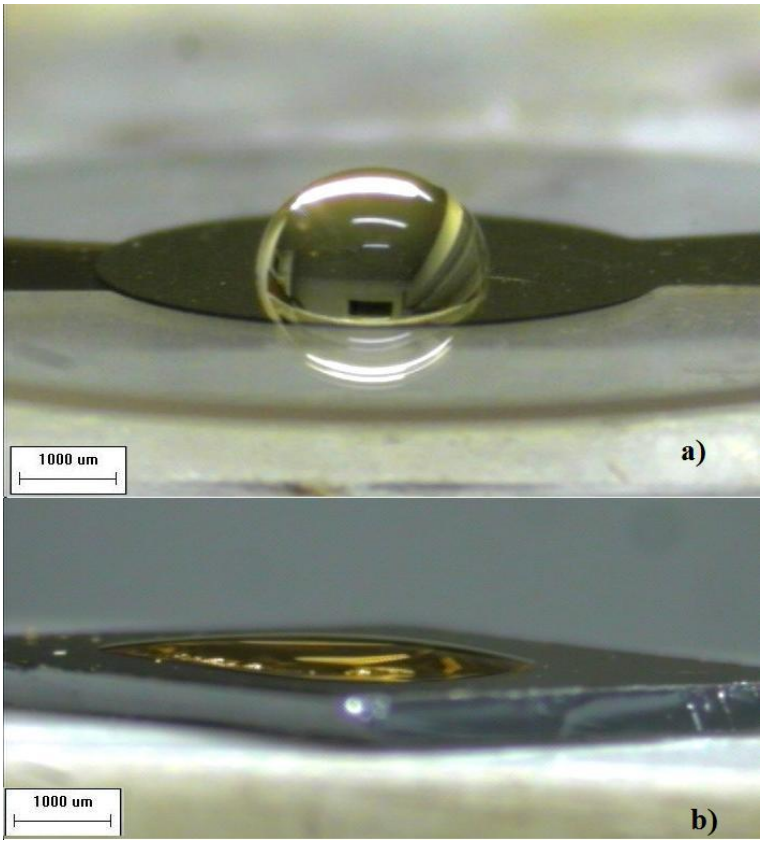

Figura 16 – Uma visualização do "grau" de molhabilidade da superfície sólida: gota de água pura (a) sobre superfície de ouro hidrofóbica e (b) sobre superfície de ouro funcionalizada com 3-MPA.

Por praticidade e efeito ilustrativo, medidas de ângulo de contato indicam o estado hidrofóbico/hidrofílico da superfície. Se o ângulo de contato, definido entre o menisco do líquido e a interface, é maior que 90°, o líquido não molha o substrato. Se o ângulo for próximo de zero, o líquido molha a superfície6. O eletrodo de ouro da QCM apresentou ângulo de contato igual a 90°, ou seja, muito mais hidrofóbico que a superfície funcionalizada, que exibiu ângulo próximo de zero.

O experimento foi iniciado medindo as mudanças na frequência e na resistência causadas pela imersão da QCM com a superfície de ouro hidrofóbica, previamente exposta ao ar, em diferentes béqueres com água Milli-Q® e soluções de NaCl. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes, sendo que os resultados apresentados são os da curva mais representativa. A incerteza na medida de frequência para a balança de 5 MHz é de 0,1 Hz. Todas as medidas foram realizadas à temperatura constante de 25°C. Os resultados de f e R foram tomados após a estabilização do sinal da QCM em cada solução. Um exemplo da dependência temporal de f e R da transição da QCM de água deionizada para uma solução salina é mostrada na Figura 17, para um solução de 200 mM de NaCl. Como mostrado na Figura 17, a imersão na solução de NaCl causou decréscimo nos valores de frequência e resistência.

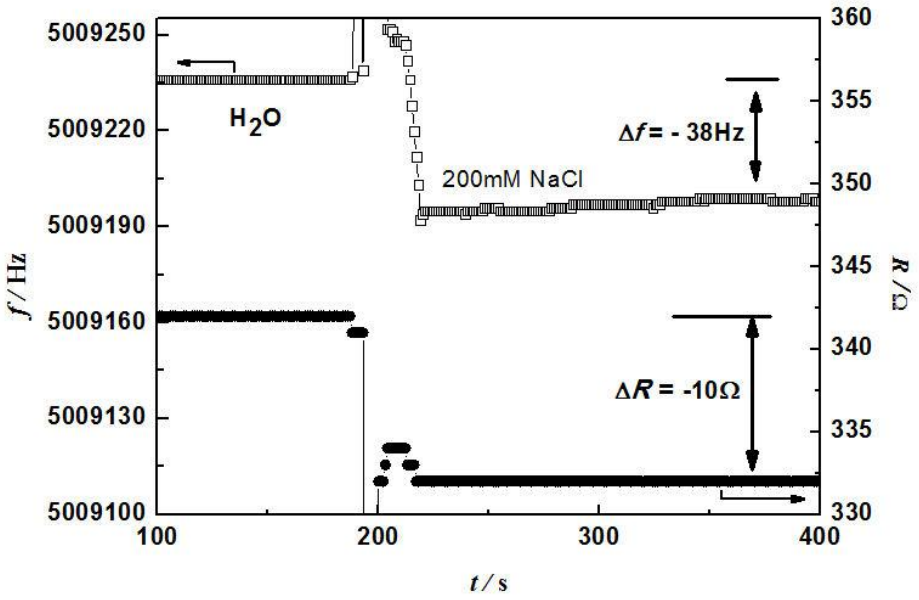

Figura 17 – Variação de f e R versus tempo para QCM imersa em água deionizada e, em seguida, em solução de NaCl 200 mM. Superfície hidrofóbica.

Os resultados para diversas concentrações de NaCl estão indicados na Figura 18. A sequência de pontos, 1 a 8, indicam o aumento da concentração das soluções de NaCl em ordem crescente. Ponto 1 fornece os valores de f e R para água deionizada a 25°C. Para baixas concentrações, de 2 mM a 20 mM, f e R decrescem com o aumento da concentração. No entanto, para altas concentrações, de 154 mM a 2 M, há uma queda em f e, um aumento em R.

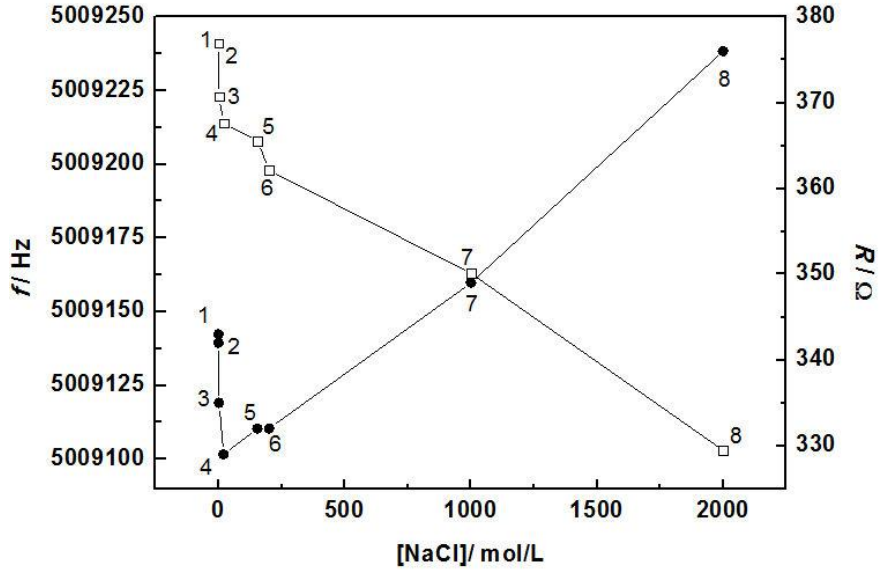

Figura 18 – Variação de f e R em função da concentração de soluções aquosas de NaCl em contato com superfície hidrofóbica de ouro. 1-H_2O deionizada, 2-0,2 mM, 3-2 mM, 4-20 mM, 5-154 mM, 6-200 mM, 7-1000 mM, 8-2000 mM.

Os resultados não estão de acordo com as respostas esperadas de f e R calculadas a partir das Equações 18 e 19, isto é, para $G' = 0$, pois pela interpretação usual da resposta da QCM em meio aquoso, as variações de f e R somente poderiam obedecer a variações no produto $\sqrt{\rho\eta}$ uma vez que valores de ρ e η aumentam com o acréscimo de soluto, isto é, $G' = 0$[78,80]. Dessa forma, uma nova maneira de se olhar o fenômeno se faz necessária, já que as medidas não podem ser explicadas apenas pelas variações ρ e η.

Uma visão diferente dos resultados é obtida pelo uso do plano *f versus R* para representar a impedância mecânica da água, $Z_w(R, f)$, e as mudanças, ΔZ causadas pela adição de solutos. Os valores de f e R na Figura 18 são graficados no plano *f versus R* na Figura 19. Os pontos experimentais S1, S2 e S3 correspondem a diferentes concentrações de sacarose que foram adicionadas à Figura 19. As soluções de sacarose foram usadas por comportarem-se como

liquidos newtonianos, isto é, a f e R variam com as propriedades, ρ e η, das soluções, com comportamento representado pela linha $\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$,[81] na figura. Os três pontos de sacarose, junto com o ponto 1 da água deionizada, definem a linha pontilhada "newtoniana", com inclinação, a, dada pela Equação 20. A linha $\Delta Z_{G'}$, também, adicionada à Figura 19, é definida pelo ponto 1, tido como referência para os cálculos das variações de f e R, com inclinação – a, (ver Equação 25). Qualquer variação, ΔZ, devido à mudança em $\sqrt{\rho\eta}$, ou em G' ou em m, ocorre nas direções dos eixos $\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$, $\Delta Z_{G'}$ e ΔZ_m desenhados a partir do ponto 1.

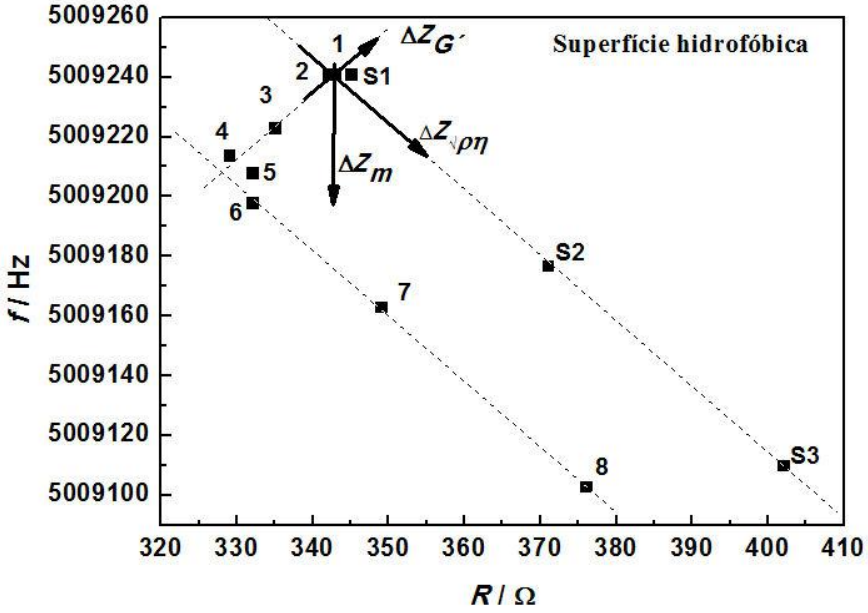

Figura 19 – Pontos do plano *f versus R* para água e diversas soluções aquosas de NaCl: 1-H_2O, NaCl: 2-0,2 mM, 3-2 mM, 4-20 mM, 5-154 mM, 6-200 mM, 7-1000 mM, 8-2000 mM; Sacarose: S1-2 mM, S2-149 mM e S3-303 mM.

Na Figura 19, a sequência de pontos 1 a 8 indicam a dependência de $Z(R,f)$ com a concentração de solução de NaCl. A resultante $Z(R,f)$ se move na direção do eixo $\Delta Z_{G'}$, sendo muito sensível à variação da concentração, até o ponto 4. O deslocamento de $Z(R,f)$ no eixo $\Delta Z_{G'}$ corresponde à variação de f e R em fase, mostradas na Figura 18. Além do ponto 4, na Figura 19, $Z(R,f)$ começa a seguir paralela à linha "newtoniana", na direção $+\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$.

Esse comportamento foi descrito como o caso 2 na seção teórica. É compatível com a hipótese de que a água frente à interface responde aos movimentos de cisalhamento de baixa amplitude como um liquido não newtoniano com $G' \neq 0$. O módulo de cisalhamento elástico

diminui com o aumento da concentração de NaCl, até atingir uma determinada concentração. Para altas concentrações mudanças em $\sqrt{\rho\eta}$ se tornam mais importantes para f e R, conforme Equações 18 e 19.

O mesmo experimento foi realizado com eletrodo de ouro da QCM funcionalizado com ácido 3-mercapto-propiônico, 3-MPA, portanto, experimento com superfície do eletrodo hidrofílica. Os resultados para f e R estão na Figura 20. A linha "newtoniana" é definida pelo ponto 1, água deionizada, com inclinação definida com os pontos de sacarose, os mesmos utilizados na Figura 19. A linha $\Delta Z_{G'}$ foi traçada também como na Figura 19. Os pontos 2 a 5 resultantes da variação de concentração de NaCl estão no sentido de decréscimo da linha $\Delta Z_{G'}$. Os pontos 2, 3 e 4 praticamente apresentam o mesmo valor de G'. Os pontos 5, 6 e 7 de soluções de NaCl estão em uma linha paralela à inclinação "newtoniana", Figura 20. O ponto resultante $Z(R, f)$, se move no plano *f versus R* de modo similar ao caso hidrofóbico.

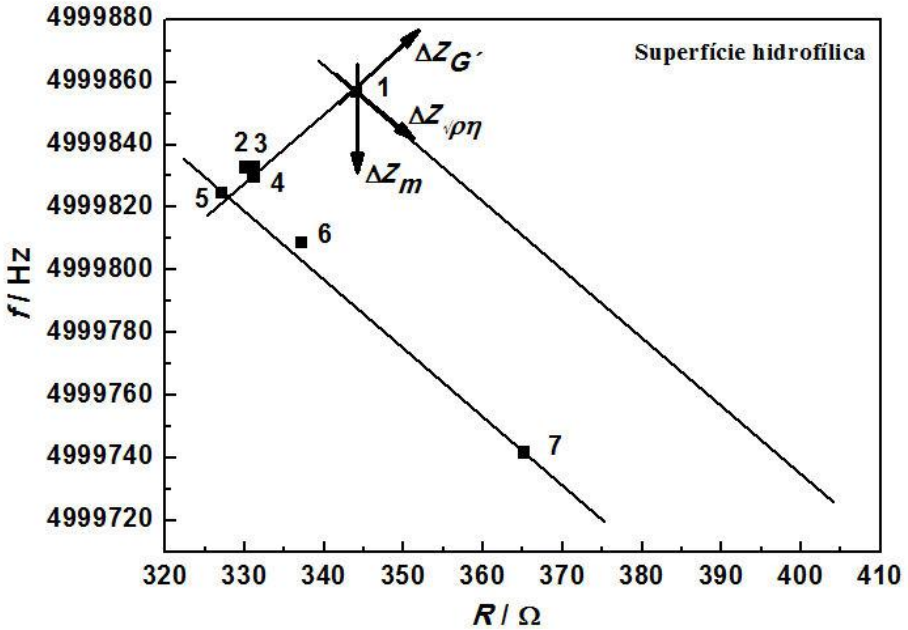

Figura 20 – Pontos do plano *f versus R* para água e diversas soluções aquosas de NaCl: 1-H_2O deionizada, NaCl: 2-50 mM, 3-100 mM, 4-200 mM, 5-400 mM, 6-1000 mM, 7-2000 mM.

Tanto no caso de superfície hidrofóbica quanto hidrofílica, a adição de pequenas quantidades de NaCl causa pequenas variações em ΔZ, que, não segue a inclinação "newtoniana" variando no sentido negativo do eixo $\Delta Z_{G'}$. Todavia, o ponto no eixo $\Delta Z_{G'}$ no qual ocorre

máxima variação, $\Delta G'$ corresponde a diferentes concentrações de NaCl, dependendo da natureza das interfaces.

Para superfície hidrofóbica o máximo $\Delta G'$ ocorre para 20 mM de NaCl (ponto 4, Figura 19) e para superfície hidrofílica, por volta de 400 mM (ponto 5, Figura 20). Como já dito anteriormente, em ambos os casos, a água não se comporta como líquido newtoniano. Pelo contrário, parece exibir alguma estruturação que pode ter uma melhor estrutura frente à superfície hidrofílica e, por isso, precisou-se de uma maior concentração de NaCl para desfazer essa estrutura. Algo semelhante foi observado por Pollack *et al.*[20] para água em contato com superfícies hidrofílicas. No entanto, sabe-se que íons podem estruturar a água, em um processo chamado hidratação. Devido ao forte momento de dipolo da água, os íons adicionados são envoltos por uma camada de moléculas de água. Dessa maneira, íons podem competir com a superfície pelas moléculas de água, cuja estrutura resultante responde aos movimentos oscilatórios da superfície da QCM.

Um decréscimo máximo de $\Delta G' \approx -2900$ Pa, causado pela adição de NaCl, foi obtido para as duas superfícies, através da correspondência com variações em f e R, mostrados nas Figura 19 e Figura 20, substituídos nas Equações 21 e 22. A partir do ponto para o qual $\Delta G'$ é máximo, não há variação de G', de modo que para concentrações de NaCl maiores, a posição de $Z(R,f)$ se move apenas no sentido de variações de $\sqrt{\rho\eta}$. Das Equações 18 e 19, isso ocorre quando as magnitudes dos termos entre colchetes são iguais:

$$\Delta x \approx \frac{\rho|\Delta G'|}{2x}. \tag{28}$$

Usando a Equação 28 e $\Delta G' \approx -2900$ Pa, encontra-se o valor de $\Delta x = \sqrt{\omega}\left(\sqrt{\rho\eta}_{solução} - \sqrt{\rho\eta}_{água}\right) = 274{,}5$ kgm^{-2}s^{-1}. Supondo que para a água, na média, ρ e η são próximos aos valores de *bulk*, $\sqrt{\rho\eta}_{água} \approx 0{,}942174$[78]. Tem-se $\sqrt{\rho\eta}_{solução} \approx 0{,}0991060$ que corresponde a uma concentração de NaCl de 750 mM. Esse valor deve ser comparado com os valores de concentração das soluções usadas no experimento. As concentrações de NaCl foram 20 mM (ponto 4, Figura 19) e 400 mM (ponto 5, Figura 20)para as superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente.

O resultado de concentração de 750 mM é satisfatório apenas para a superfície hidrofílica, uma vez que os valores experimentais de $\Delta G'_{máximo}$ estão entre 400 mM e 1000 mM. Para a superfície hidrofóbica, no entanto, a solução a 20 mM de NaCl não pode por si só causar a mudança Δx observada. O valor observado $\sqrt{\rho\eta}_{solução}$ para a solução a 20 mM em sal na superfície hidrofóbica do ouro indica uma situação mais complexa, onde a superfície hidrofóbica desempenha um papel fundamental. Para a região próxima à superfície hidrofóbica a densidade da água é tida como zero sobre a interface, aumentando suavemente com o aumento da distância da superfície, chegando a 90% do valor de *bulk* quando distante 1,8 nm da interface[29]. A diminuição da possibilidade de ocorrer pontes de hidrogênio junta à superfície hidrofóbica abaixa consideravelmente a susceptibilidade dielétrica da água em até uma ordem de grandeza[40] aumentando as forças elétricas entre os grupos iônicos e possibilitando a formação de pares iônicos, uma espécie química distinta[41].

O aumento na concentração de pares iônicos de NaCl na região interfacial contribui significativamente para o aumento do valor $\sqrt{\rho\eta}_{solução}$. Para comprovar esta hipótese, foram realizadas medidas de força *versus* distância com a técnica de microscopia de força atômica, AFM, para superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, na presença de água deionizada e de soluções

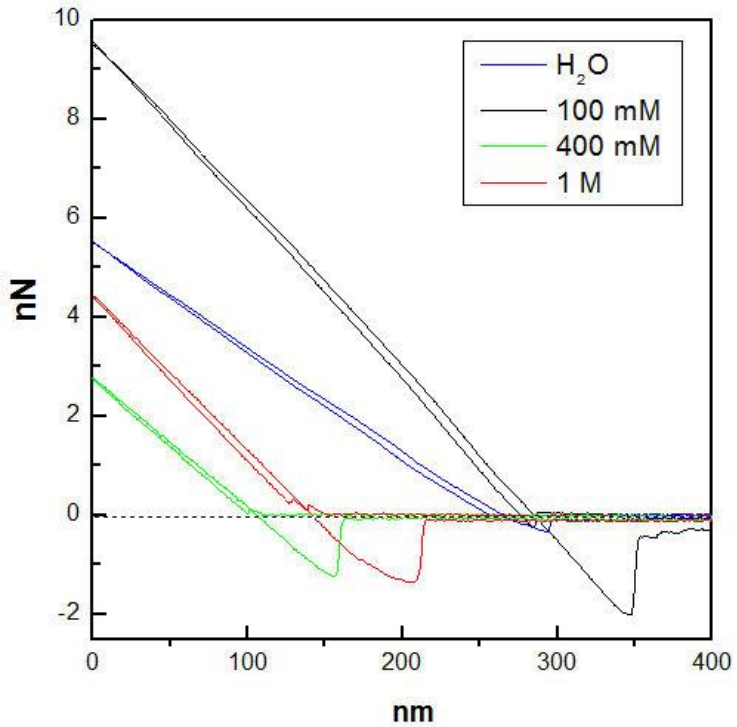

Figura 21 – Curvas força *vs*. distância para superfície hidrofóbica de ouro em água deionizada e em diferentes concentrações salinas.

salinas. A Figura 21 mostra a curva força *versus* distância para a superfície hidrofóbica. Movendo o *tip* da solução, em que a força é zero, para a interface, pressionando contra o substrato, e então voltando para a solução, foram obtidas as curvas mostradas na figura. A curva para a água deionizada, indicada como H_2O, é usada como referência.

A inclinação da curva após o contato com o substrato mede a dureza da superfície[82]. Para soluções de NaCl a 100 mM, 400 mM e 1000 mM, as inclinações são, respectivamente, 34,53 mN/m, 28,19 mN/m e 33,2 mN/m, revelando a presença de um filme com dureza maior que a encontrada para interface ouro e água, que foi de 21,4 mN/. O *tip* adere fortemente ao substrato para todas as amostras salinas. A força necessária para remover o *tip* da amostra foi de 2 nN, 1,3 nN e 1,5 nN para soluções 100 mM, 400 mM e 1000 mM, respectivamente. A aderência observada para água é bem menor, aproximadamente 0,2 nN. A formação de pares iônicos de NaCl é esperada sobre a amostra e também sobre o *tip* hidrofóbico de Si_3N_4. A pressão que o *tip* exerce ao se aproximar do substrato pode fornecer energia suficiente para que os pares iônicos confinados na pequena região da interface formem uma região salina conectando o *tip* ao substrato. Para afastar o *tip* da amostra, é necessário romper a estrutura formada, Figura 21.

Medidas de força *vs*. distância foram repetidas para a interface hidrofílica de mica imersa em água deionizada e na concentração mais elevada de NaCl (1 M), Figura 22. Não houve variação significativa da dureza de superfície com a adição de solução de NaCl e também não foi observada força de aderência entre o *tip* e a amostra. Os resultados da dureza de superfície e

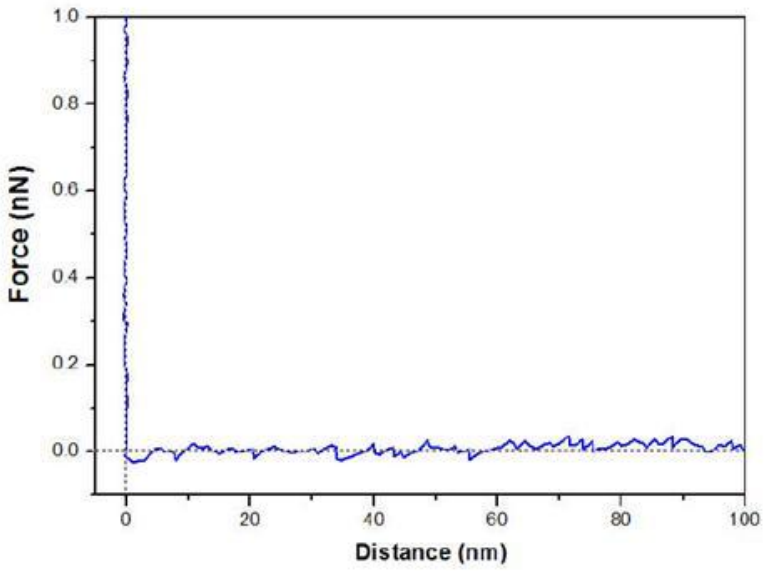

Figura 22 – Curva força *vs.* distância para superfície hidrofílica de mica em solução de NaCl a 1 M.

força de aderência para as curvas força *versus* distância do AFM são compatíveis com a formação de um filme salino na superfície de ouro hidrofóbica.

5.4 – Conclusões

Através da análise dos experimentos realizados com soluções de NaCl a diversas concentrações conseguimos formular um modelo teórico distinto do usual para a água interfacial: não mais podemos considerar a água como um líquido newtoniano, mas sim um líquido com propriedades viscoelásticas, $G' \neq 0$, passível de se estruturar frente a interfaces sólido-líquido (superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas de ouro).

Apenas sobre superfícies hidrofóbicas de ouro a formação de estruturas de pares iônicos de NaCl foi verificada, tanto pelas medidas com a QCM quanto pelas realizadas com a AFM.

Os íons concorrem com a superfície pela estruturação da água. Na superfície hidrofílica de ouro mais íons são necessários do que na superfície hidrofóbica para causar uma variação de $\Delta G'$.

Capítulo 6

Resultados obtidos das medidas da adsorção de lipossomos sobre o eletrodo de ouro da EQCM em ambiente aquoso.

6 – Resultados e Discussões

6.1 – Adsorção de lipossomos sobre o eletrodo da EQCM em ambiente aquoso.

As Figura 23 e Figura 24 mostram as variações típicas dos parâmetros *f* e *R* e a corrente da EQCM para a superfície de ouro policristalino em função do potencial do eletrodo. Em uma solução 0,5 M de H_2SO_4, o potencial foi variado entre 0,00 V e 1,00 V (*vs*. Ag/AgCl, KCl satd.). O eletrodo de trabalho foi polarizado inicialmente no potencial de circuito aberto, V_{OCP} = 0,00 V. A partir desse ponto aumentou-se o potencial anodicamente a uma taxa de 20 mV/s até atingir 1,00 V e, em seguida, diminuiu-se o potencial na direção catódica, na mesma taxa até 0,00 V. Após 5 varreduras, não ocorreram mais alterações nas curvas e não houve variações de *R* ($|\Delta R| < 0{,}2\ \Omega$) neste intervalo. Conforme a literatura[83], a pequena corrente observada durante a varredura positiva de 0,00 a 0,50 V corresponde ao carregamento da dupla camada, Figura 23. De 0,50 V a 1,00 V tem-se a região pré-oxido com a formação parcial de $Au\text{-}OH^-$ na superfície do ouro. Neste mesmo intervalo de potencial observa-se que a frequência de ressonância decresce de 3 Hz (Figura 23). A densidade de átomos de ouro na superfície do eletrodo é de $2{,}00 \cdot 10^{-9}$ mol/cm^2 ou $12{,}04 \cdot 10^{14}$ atomos/cm^2 [84]. Assumindo que há uma hidroxila (OH, M = 17 g) presa a cada átomo de ouro e a uma molécula de água (H_2O, M = 18 g) por ponte de hidrogênio, pode-se calcular a correspondente máxima variação de massa registrada pela QCM. Considerando a área ativa do eletrodo de 0,30 cm^2 tem-se:

$$\Delta m \cong 12{,}04 \cdot 10^{14} \times 0{,}30 \times \frac{18+17}{6{,}02 \cdot 10^{23}} = 21 \text{ ng.}$$

Usando a relação entre a variação de massa e a frequência de ressonância do cristal de quartzo da QCM, $S = 5{,}30$ Hz/ng, encontra-se uma variação de frequência de $\frac{21}{5{,}3} \cong 4$ Hz. Este valor mostra que nem toda a superfície do eletrodo de ouro fica coberta pelas hidroxilas, apenas 75% conforme os 3 Hz medidos na região pré-oxido.

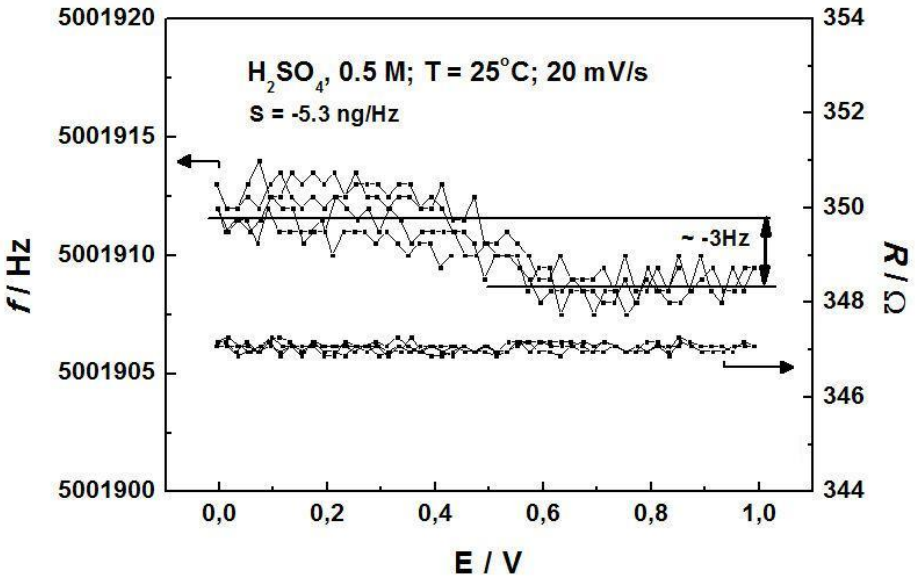

Figura 23– Variações dos parâmetros *f* e *R* após voltametria em 0,5 M de H_2SO_4. (E *vs*. Ag/AgCl, KCl sat.)

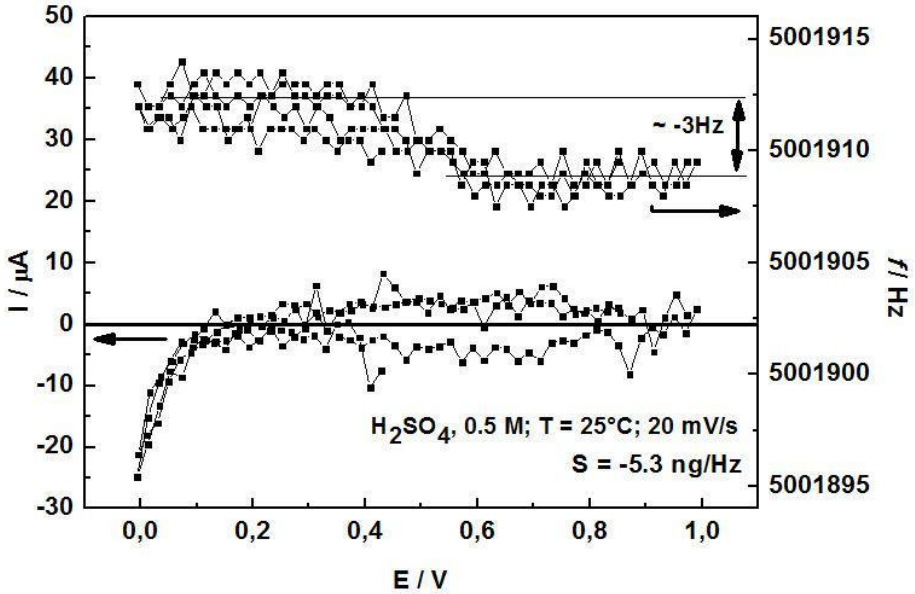

Figura 24 – Variações dos parâmetros *I* e *R* durante voltametria. (E *vs.* Ag/AgCl, KCl sat.).

A varredura foi interrompida no potencial elétrico de *OCP* para garantir que o eletrodo de ouro retornasse ao estado inicial e que não houvesse formação de óxidos na superfície. O eletrodo de ouro da EQCM foi lavado, enxaguado para eliminar qualquer resíduo de H_2SO_4, e mergulhado em água Milli-Q®. A seguir, este mesmo eletrodo foi colocado em uma dispersão de lipossomos de DMPC preparada conforme capítulo 4, seção 4.2.2. O comportamento dos parâmetros de f e R foi registrado e apresentou um padrão em todas as medidas realizadas de diminuição de frequência e aumento de resistência. A Figura 25 mostra uma curva típica representativa desse processo. Observou-se inicialmente (t = 700 s) uma queda abrupta de 90 Hz na frequência, seguida de um decaimento linear a uma taxa de -0,50 Hz/s entre os 700 e 900 segundos seguintes. Então, a taxa de decaimento diminuiu para -0,32 Hz/s entre 900 e 1500 segundos e, finalmente, a frequência estabilizou-se em -363 Hz. A variação de 90 Hz é compatível com a adsorção imediata de lipossomos da solução em contato com a superfície do eletrodo de ouro da EQCM, como representado pela Figura 26 As regiões em amarelo representam o eletrodo de ouro, as falhas em azul a rugosidade da superfície do eletrodo preenchidas com água, os círculos em laranja representam os lipossomos. O detalhe da membrana do lipossomo mostrada abaixo, ilustra o caráter *zwitterionico* da cabeça polar, em pH 7 e as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios constituintes.

Na Figura 25 as regiões lineares de crescimento de massa podem estar relacionadas ao processo de ruptura de alguns lipossomos, com formação de filmes de fosfolipídios, bicamadas, e difusão de lipossomos para o eletrodo de ouro da EQCM até atingir o equilíbrio, isto é, até a estabilidade da frequência em -363 Hz. Este é um processo de dinâmica complexa. A Figura 27 representa o filme de fosfolipídio e lipossomos formado sobre o eletrodo.

A variação total da frequência de Δf = -363 Hz corresponde a um aumento de massa de aproximadamente 2000 ng sobre a superfície do eletrodo, dado pela equação:

$$\Delta m = S\Delta f, \qquad 6\text{-}1$$

onde $S = -5{,}30$ ng/Hz é a sensibilidade do cristal de quartzo.

No instante da imersão, verificou-se que a resistência (fricção) aumentou abruptamenteΔR = + 27 Ω, corroborando a afirmação de que os lipossomos foram adsorvidos na

superfície do eletrodo de ouro da EQCM. O aumento das imperfeições da superfície causadas pelos lipossomos aumenta a fricção do eletrodo vibrante com a massa liquida, Figura 25.

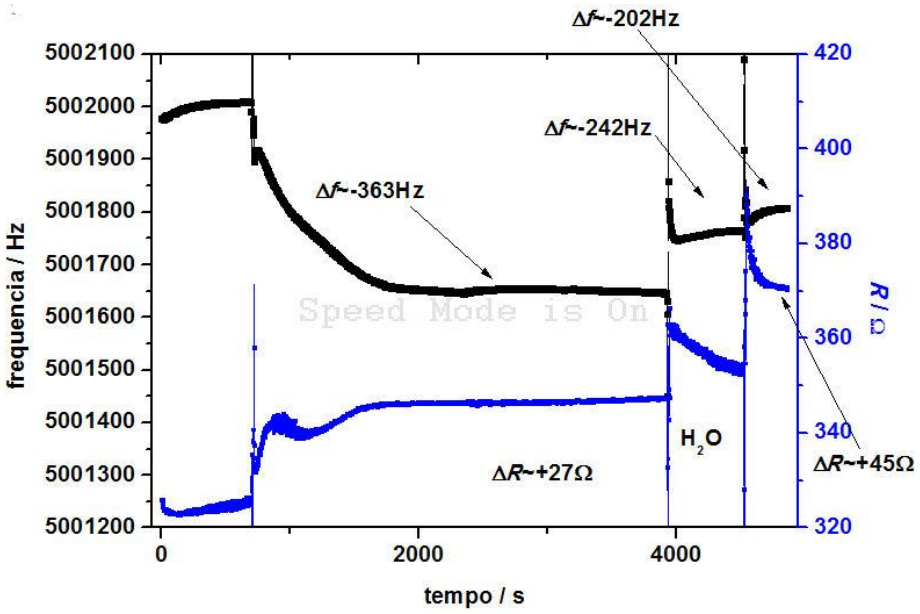

Figura 25 – Variação dos parâmetros *f* e *R* durante "inserção intercalada" da QCM, a) em água deionizada, b) solução de DMPC, c) água deionizada, e d) 0,5 M H_2SO_4.

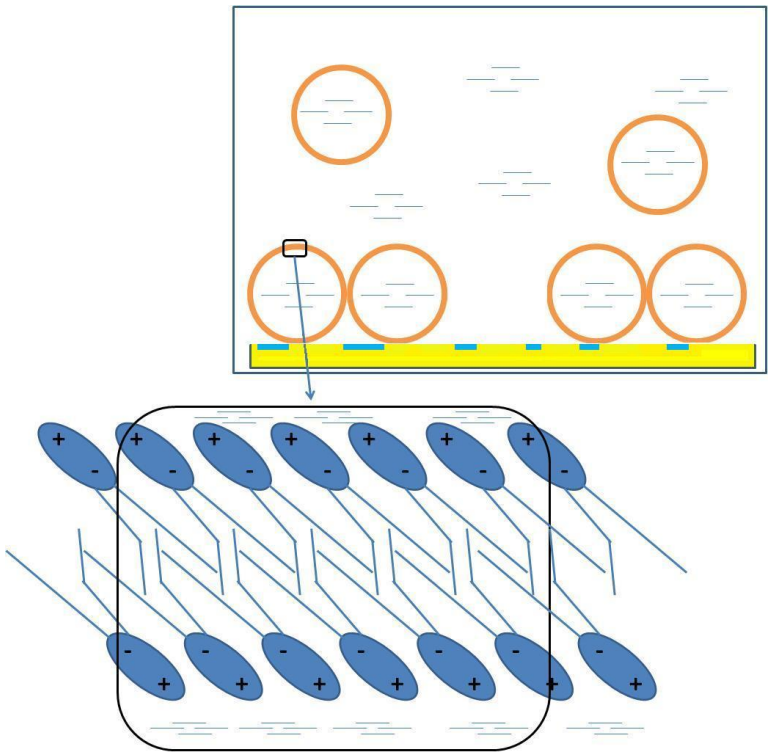

Figura 26 – Adsorção imediata de lipossomos da solução na superfície do eletrodo de ouro da QCM.

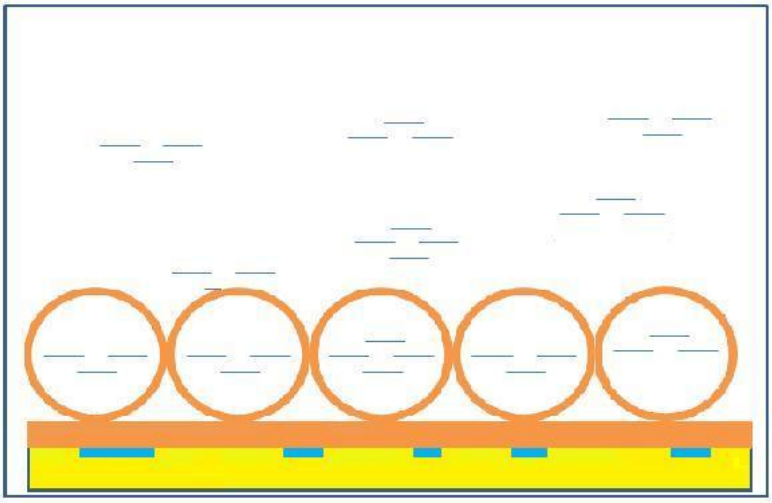

Figura 27 – Ruptura de alguns lipossomos com formação de filmes de fosfolipídios sobre o eletrodo de ouro da QCM.

Supondo que houve somente a formação de uma bicamada de fosfolipídios sobre o eletrodo da balança, foi calculada a área por molécula, a_m, de DMPC. Para estimar a_m das medidas feitas com a EQCM, foi obtido inicialmente o número de moléculas, N:

$$\Delta N = \frac{\Delta m}{X} \qquad 6\text{-}2$$

onde X é a massa de uma molécula de fosfolipídio, dada por:

$$X = \frac{M}{N_{Avo}} = \frac{678}{6{,}02 \cdot 10^{23}} = 1{,}13 \cdot 10^{-21}\text{g} \qquad 6\text{-}3$$

em que M = 678 g/mol é a massa molar do DMPC e N_{Avo} o número de Avogadro.

Pela Equação 6-1, tem-se $\Delta m = 1924$ μg em que $\Delta f = -363$ Hz, valor em que a frequência estabilizou-se, ver Figura 25. Portanto:

$$\Delta N = \frac{1{,}924 \cdot 10^{-6}}{1{,}13 \cdot 10^{-21}} = 1{,}70 \cdot 10^{15}\text{moléculas} \qquad 6\text{-}4$$

Uma monocamada de fosfolipídio, portanto, deverá ter metade do valor de ΔN encontrado na equação 6-4 para uma bicamada: $\Delta N_{1/2} = 0{,}85 \cdot 10^{15}$ moléculas. Considerando que as

moléculas de DMPC formem um arranjo hexagonal compacto (*HCP – hexagonal close packed*) sobre a superfície do eletrodo da EQCM, pode-se estimar a área ocupada por molécula como:

$$a_m = \frac{\pi A}{2\sqrt{3}\Delta N_{1/2}} = 0{,}32 \cdot 10^{-15}\text{cm}^2 \qquad 6\text{-}5$$

onde *A* é a área ativa do cristal.

O correspondente raio da seção polar da molécula seria de aproximadamente 1 Å. Este resultado não é compatível com o das moléculas de DMPC que têm uma seção pelo menos 10 vezes maior[85]. Portanto, a hipótese de que a variação de frequência ocorreu devido à formação de uma bicamada de DMPC sobre o eletrodo da balança não se sustenta. Então, a variação de frequência observada pode estar relacionada à adsorção de lipossomos com formação de filme sobre a superfície do eletrodo devido ao rompimento dos mesmos, defeitos na superfície, etc..

Pode-se descrever a dinâmica de adsorção do seguinte modo: inicialmente, os lipossomos são adsorvidos sobre o eletrodo devido à cabeça polar, estes lipossomos eventualmente se rompem dando origem à formação de um filme de fosfolipídios sobre o eletrodo e de lipossomos sobre o mesmo, ver Figura 27. Uma dinâmica de formação semelhante foi observada por Lipkowski *et.al*[47], por meio de observações da superfície de eletrodos de ouro na presença de dispersão com lipossomos na mesma concentração usada neste trabalho. Com medidas de espalhamento dinâmico de luz, aqueles pesquisadores determinaram que a maior parte da solução possuía lipossomos com uma distribuição de raios entre 190 Å e 350 Å. Os autores ainda filtraram a solução com filtros de 100 nm para eliminar vesículas maiores. Fazendo imagens com AFM de 15 em 15 minutos da superfície do ouro, puderam observar a fusão dos lipossomos sobre a superfície e o aplainamento (diminuição da rugosidade de superfície) da superfície devido à formação da bicamada[47].

No presente trabalho, foi considerado que se poderia obter o mesmo efeito de formação de bicamada. Os "lipossomos internos" das lamelas mais internas, não considerados no trabalho de Lipkowsky[42], se existentes, difundiriam para a solução ou ficariam fracamente adsorvidos à bicamada, e que após imersão da EQCM em água, tenderiam a difundir para a massa líquida.

Voltando à Figura 25 e assumindo-se a adsorção de lipossomos num arranjo *HCP* como na Figura 27, foi feita uma estimativa do raio dos lipossomos adsorvidos. Considerou-se que a

densidade deles é aproximadamente igual à densidade da água, $\rho = 1$ g/cm^3, então a massa de um lipossomo é dada por:

$$X_{Lip} = \frac{4}{3}\pi \mathrm{R}_{\mathrm{Lip}}^3 \rho \qquad 6\text{-}6$$

e o número de lipossomos num arranjo *HCP*, é:

$$N_{Lip} = \frac{A}{2\sqrt{3}\mathrm{R}_{\mathrm{Lip}}^2}, \qquad 6\text{-}7$$

onde A é a área ativa do cristal e $\mathrm{R_{Lip}}$ é o raio do lipossomo.

Pode-se estimar o raio do lipossomo, $\mathrm{R_{Lip}}$, pelas medidas de massa da QCM.

$$N_{Lip} \cdot X_{Lip} = \Delta m \qquad 6\text{-}8$$

Substituindo as equações 6-6 e 6-7 na equação 6-8 e, sendo $\Delta m = S\Delta f = 1924$ ng obtido pela Figura 25, obtêm-se um raio para o lipossomo da ordem de 530 Å. Este número é compatível com a adsorção de lipossomos multilamelares sobre o eletrodo, devido ao tamanho observado, conforme descrito no capítulo 4, seção 4.2.2. O aumento do valor de R ($\Delta R \cong +27\ \Omega$) (Figura 25) pode ser explicado pelo aumento da rugosidade da superfície devido aos lipossomos adsorvidos sobre o filme formado sobre o eletrodo, arrastando o fluido e aumentando a área de atrito da superfície oscilante com a solução.

A Figura 28 também mostra a variação do potencial de circuito aberto, *OCP (open circuit potential)*, durante a formação do filme de lipossomos. Antes da deposição dos lipossomos a superfície do ouro encontrava-se em um estado bastante hidrofóbico (ângulo de molhabilidade ≅ 90º). A água Milli-Q® usada tem um pH de 5.5, levemente ácida, fazendo com que as cabeças polares dos fosfolipídios fiquem levemente positivas através da neutralização de alguns grupos PO_4^-. O filme de fosfolipídio em formação sobre o eletrodo de ouro passa, então, a apresentar um potencial mais positivo do que a solução, Figura 28.

Na sequência, o eletrodo foi retirado da solução de DMPC, imerso em água Milli-Q® durante 8 minutos e mergulhado em solução de 0,5 M de H_2SO_4. O ácido também faz com que a monocamada superior do filme e os lipossomos presentes fiquem carregados positivamente,

perdendo o caráter *zwitteriônico*, Figura 29. A frequência da EQCM aumentou ao passar para o ácido (H_2SO_4 0.5 M), mas ainda continua 200 Hz negativa em relação à água deionizada do inicio do experimento mostrando que existe um filme formado sobre a superfície do eletrodo, isso ocorre devido à eliminação de lipossomos da superfície do eletrodo de ouro causada pela repulsão coulombiana. O potencial elétrico de *OCP* também aumentou, devido à presença de íons SO_4^{2-} junto ao filme, Figura 28

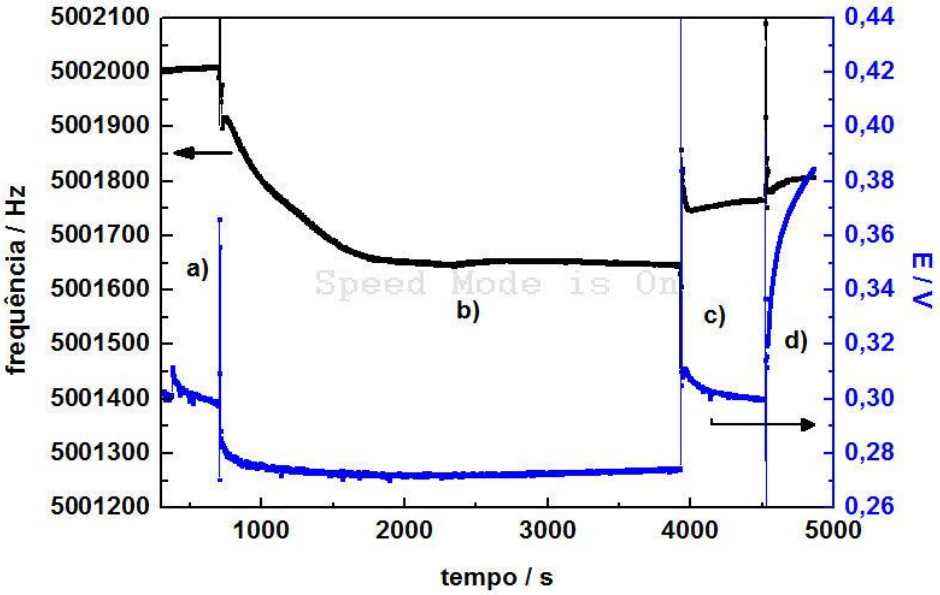

Figura 28 – Variação dos parâmetros *f* e *E* durante "inserção intercalada" da QCM, em: a) água deionizada, b) solução de DMPC, c) água deionizada e d) 0,5 M H_2SO_4.

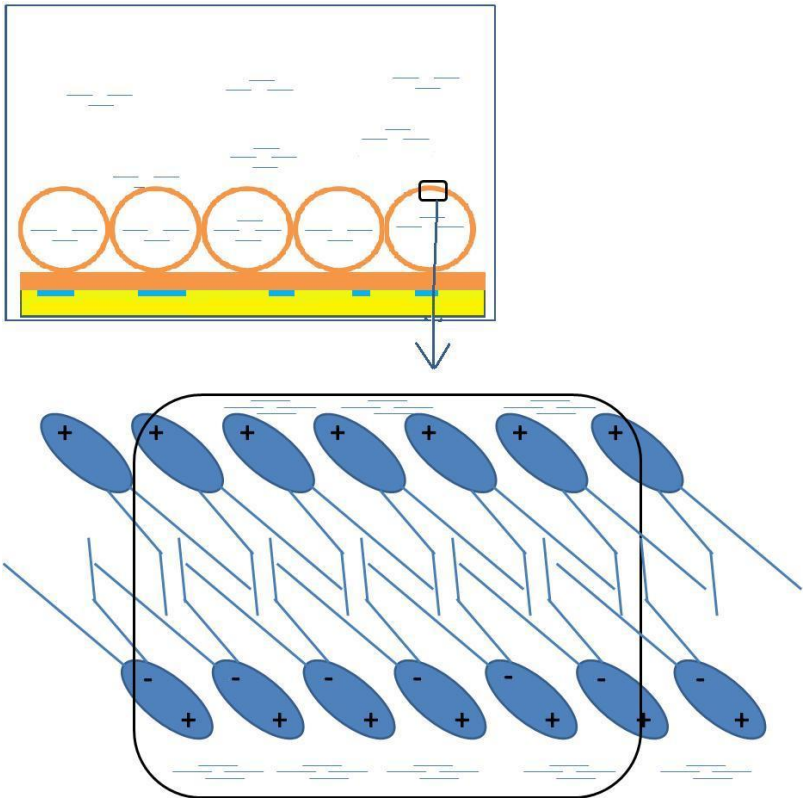

Figura 29 – Modelo representando a monocamada superior do filme e os lipossomos carregados positivamente, perdendo o caráter *zwitteriônico*, em solução de H_2SO_4 0.5 M.

A Figura 30 mostra um modelo representando o filme de fosfolipídio formado sobre o eletrodo da EQCM depois da expulsão dos lipossomos.

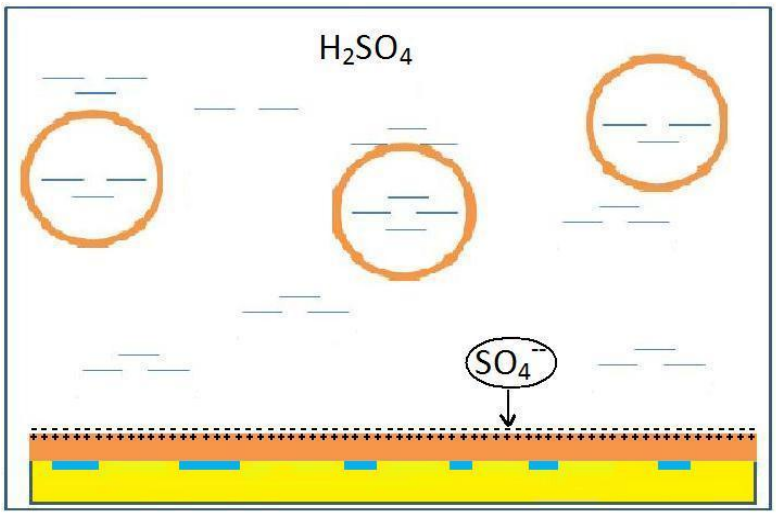

Figura 30 – Modelo representando o filme de fosfolipídio formado sobre o eletrodo da EQCM em solução de H_2SO_4 0.5 M depois da expulsão dos lipossomos.

O potencial do eletrodo de ouro com o filme de DMPC foi variado entre 0,00 V e 1,00 V (*vs*. Ag/AgCl, KCl satd.). Na varredura positiva a inesperada diminuição da massa, isto é, aumento da frequência de 24 Hz, observada entre 0,40 V e 0,60 V e a correspondente diminuição de $\Delta R \cong -4\ \Omega$ colocam um problema a ser interpretado. O aumento de potencial causou uma diminuição de massa e uma concomitante diminuição de atrito, diminuição da resistência. Na varredura no sentido catódico, ao contrário, ocorre aumento de massa e aumento de atrito, Figura 31.

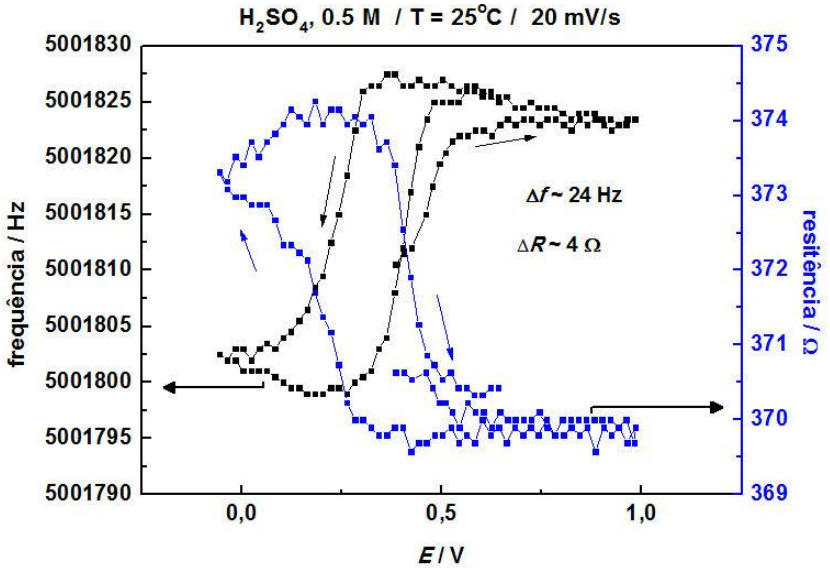

Figura 31 – Variação dos parâmetros *f* e *R* em função do potencial durante voltametria. Note a diminuição de *R* durante a diminuição de massa, e vice-versa. Primeira varredura.

Este comportamento inesperado pode ser revelador da morfologia, da estrutura do filme formado sobre a superfície. A Figura 32-a mostra uma representação do filme de DMPC sobre o eletrodo da EQCM. Entre o filme e o eletrodo há uma camada de água, sobre esta, a monocamada *zwitteriônica* inferior do filme de DMPC, ambas rigidamente acopladas ao eletrodo. A monocamada superior de DMPC em contato com a solução de H_2SO_4 é carregada positivamente. A Figura 32-b mostra um detalhe ampliado desta região. Para esta figura, representou-se o eletrodo no potencial E≈ potencial de carga zero do ouro (E = 0 V). Não há campo elétrico, $\underline{E}$, induzido na região. A monocamada com a solução ácida é bastante rugosa, trazendo massa de solução rigidamente acoplada e arrastando um correspondente volume de solução.

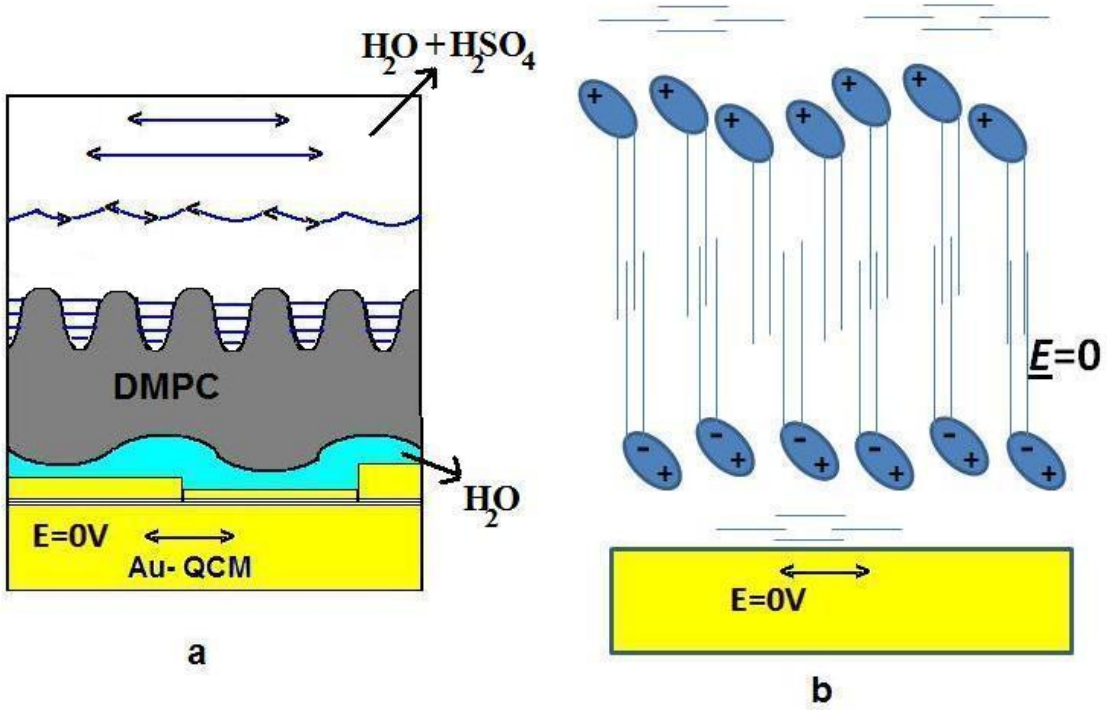

Figura 32 – Esquema representando a filme formado de DMPC sobre o eletrodo da EQCM no potencial de zero carga do ouro.

A Figura 33-a mostra a mesma região, porém sujeita a um campo elétrico $\underline{E}$ devido ao potencial anódico de E = 1,0 V aplicado ao eletrodo de ouro da EQCM. Este campo pode ser estimado considerando a aplicação de 1,0 V anódico somente sobre a bicamada que tem uma espessura de aproximadamente 6 nm, tamanho típico das cadeias lipídicas do fosfolipídio: $\underline{E} = \frac{1}{6\times10^{-9}\times\varepsilon_r}$ V/m. Sendo que ε_r o valor relativo do meio da bicamada é tipicamente 2,5, pois trata-se de um óleo, tem-se :$\underline{E} \approx 4{,}00 \cdot 10^8$ V/m. Esta grande intensidade de campo empurraria as cabeças polares de fosfolipídios em direção à solução. Porém como as caudas hidrofóbicas estão presas aos fosfolipídios *zwitterionicos* junto ao ouro, as rugosidades superficiais ficariam bastante reduzidas pelo alinhamento das moléculas que formam a monocamada superior de DMPC Figura 33-b.

Este alinhamento também causaria um maior empacotamento das moléculas. A monocamada superior possui uma área por molécula, a_m, menor para potenciais anódicos, causando o alisamento da superfície em contato com a solução.

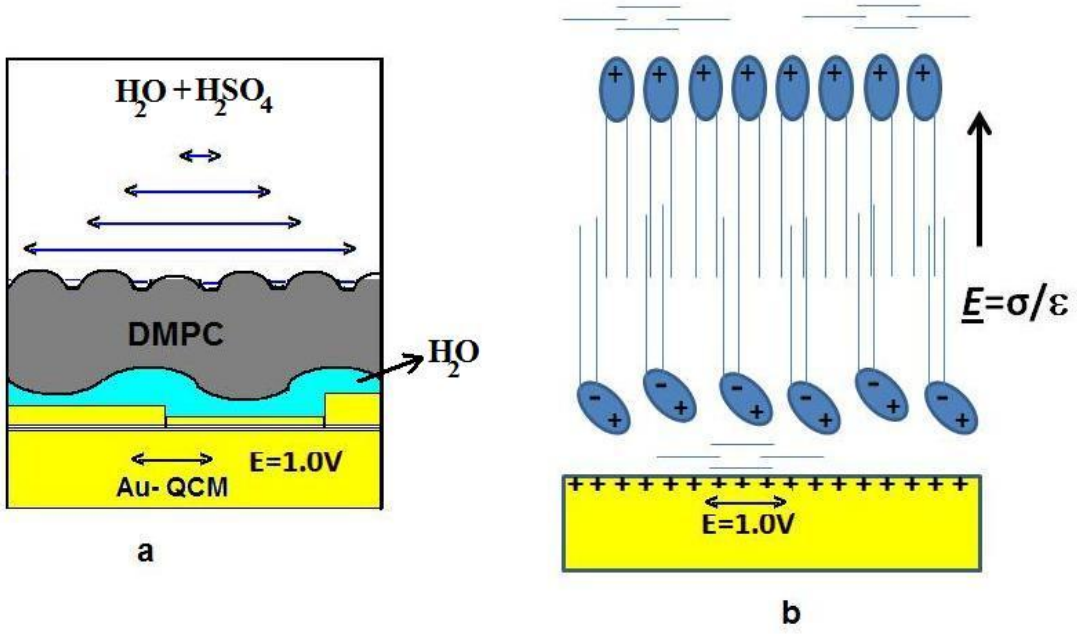

Figura 33 – Esquema representando a filme formado de DMPC sobre o eletrodo na presença de um campo elétrico E devido ao potencial anódico de E = 1,0 V aplicado ao eletrodo da EQCM.

As curvas da Figura 31 traduziriam então esta aparente variação de a_m com o potencial aplicado. Para potencias catódicos a_m é grande e, portanto, o atrito é grande e a massa apresenta o seu maior valor, correspondente ao menor valor de frequência. Para potenciais anódicos, E = 1,0 V, a_m da monocamada superior diminui alisando a superfície, diminuindo o atrito e a massa de liquido arrastada. O filme de fosfolipídios é um fluido bidimensional formado sobre a superfície do eletrodo. Durante a varredura do potencial entre os ciclos anódicos e catódicos, a superfície do filme tem uma dinâmica de diminuir e aumentar a sua rugosidade. Este efeito diminui com o tempo e com a sequência de varreduras. Após 12 varreduras, continua-se observando as variações de frequência e de resistência, porém mais atenuadas, Figura 34.

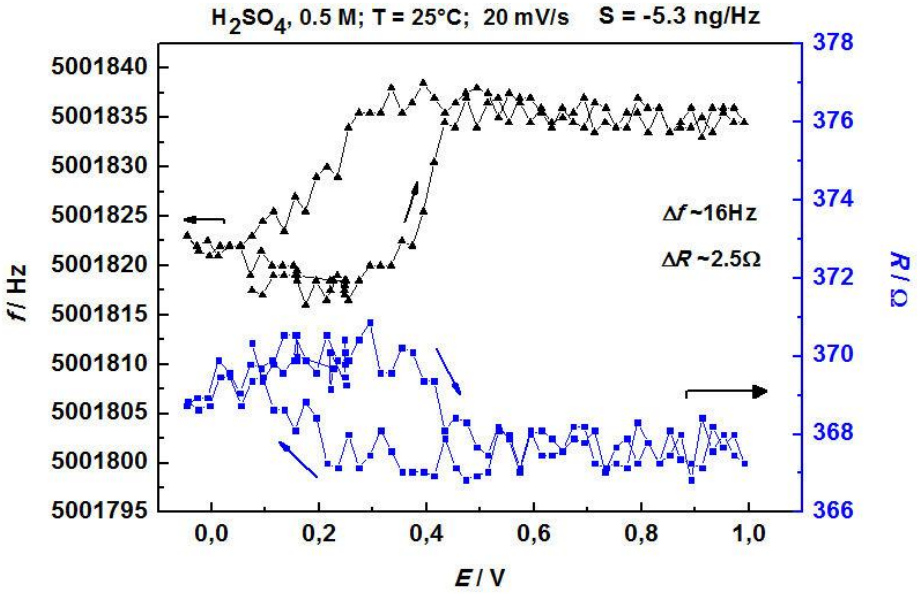

Figura 34 – Variação menor dos parâmetros *f* e *R* em função do potencial durante voltametria, para a 12ª varredura.

Esta diminuição do efeito de modulação de a_m pela tensão pode ser causada pela contaminação da água por H_2SO_4 entre o filme e o eletrodo causando perda do caráter *zwitteriônico*, carregamento do filme e possível descolamento da superfície.

Devido à complexidade do filme formado sobre o eletrodo de ouro da EQCM, curvas de pressão obtidas pelo método do filme de Langmuir, Figura 35, foram feitas por permitirem inferir sobre a área ocupada por molécula de fosfolipídio. Para essas medidas foi usado o fosfolipídio DPPC, o qual possui mesma cabeça polar que o DMPC. De acordo com as curvas de pressão dos filmes de Langmuir pode-se obter $a_m = 60$ Å^2 para um filme de fosfolipídio na fase liquido-condensada. Então, da Equação 6-5, para uma área ativa do eletrodo $A = 0{,}30$ cm^2, tem-se $\Delta N_{1/2} = 2{,}30 \cdot 10^{13}$ moléculas para uma monocamada de fosfolipídios. Portanto, $\Delta N = 4{,}50 \cdot 10^{13}$ moléculas para uma bicamada. Multiplicando ΔN pela massa de uma molécula de fosfolipídio, Equação 6-3, encontra-se: $\Delta m \cong 51$ ng ou $\Delta f \cong$ -9,6 Hz. Considerando uma bicamada tem-se um aumento de $\Delta m \cong 102$ ng ou $\Delta f \cong$ -19,2 Hz.

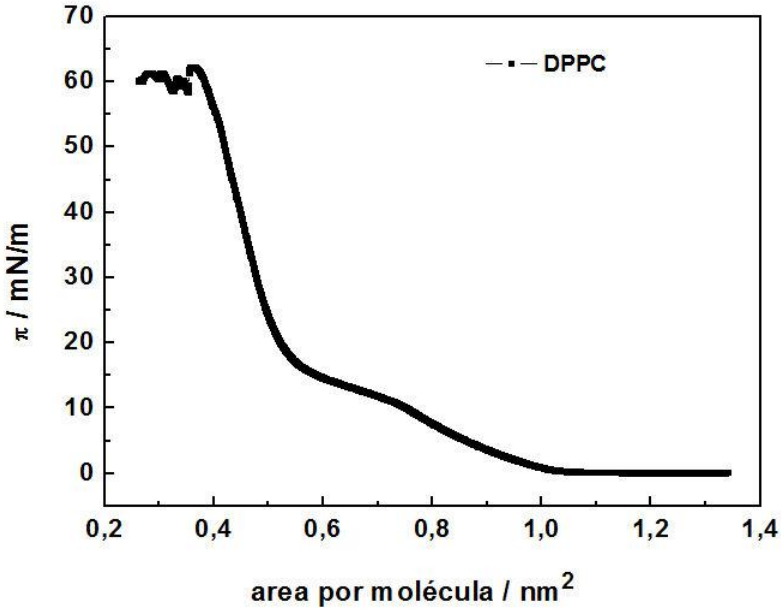

Figura 35 – Isoterma de Langmuir de DPPC.

O mesmo processo de formação de filmes com lipossomos sobre o eletrodo de ouro foi repetido e desta vez observado com a AFM. A Figura 36 mostra as curvas de força *vs.* distância no instante inicial, e 85 minutos depois do eletrodo de ouro estar em contato com a dispersão de lipossomos de DMPC. Considerando zero o valor da força a distâncias "grandes" da superfície do eletrodo, com a aproximação do *tip*, a cerca de 6 nm da superfície, a força sofre um súbito aumento de amplitude de até 0.74 nN, seguida de uma leve queda e contato com o eletrodo quando a força cresce infinitamente, Figura 36-b. Este comportamento é compatível com a formação de um filme de 6 nm de espessura formado sobre o eletrodo e sendo rompido pela ponta do AFM quando da aproximação da mesma. Este fenômeno foi observado logo após 13 minutos da imersão do eletrodo de ouro na dispersão de lipossomos. A formação do filme está em concordância com a formação de uma bicamada sobre o eletrodo de ouro, conforme observado na literatura[47].

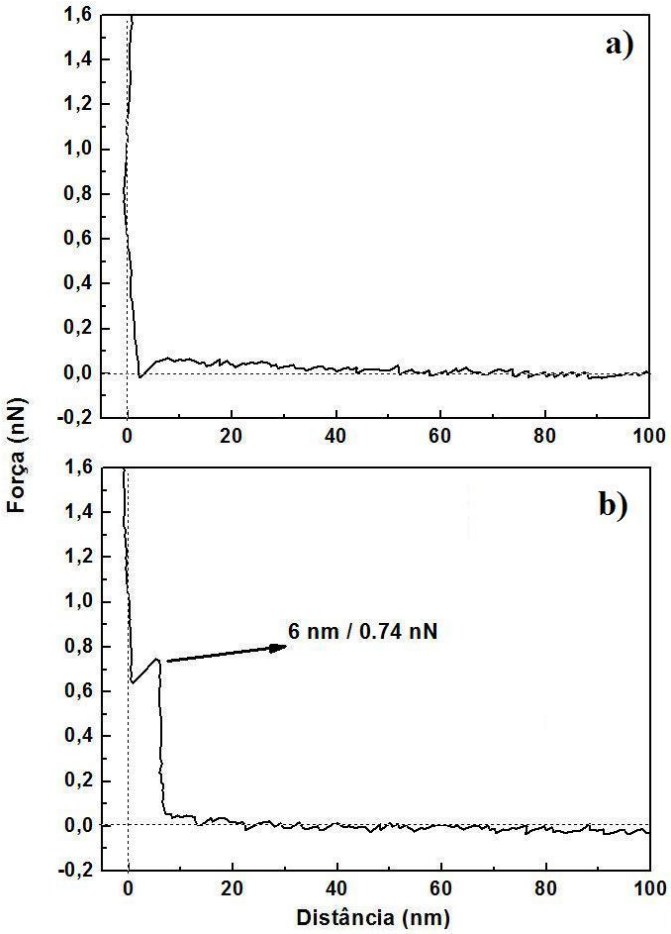

Figura 36 – Curva força *vs.* distância para superfície hidrofóbica de ouro em contato com a dispersão de lipossomos de DMPC, a) logo que o substrato foi colocado em contato com a dispersão de lipossomos e b) 85 minutos depois do contato. Após 13 minutos já havia a formação de camada de fosfolipídio sobre a superfície de ouro.

Imagens feitas com AFM antes e depois da formação do filme de fosfolipídios sobre substrato de ouro mostram que a rugosidade da superfície diminuiu após 85 minutos de imersão do eletrodo na dispersão de lipossomos de DMPC, Figura 37.

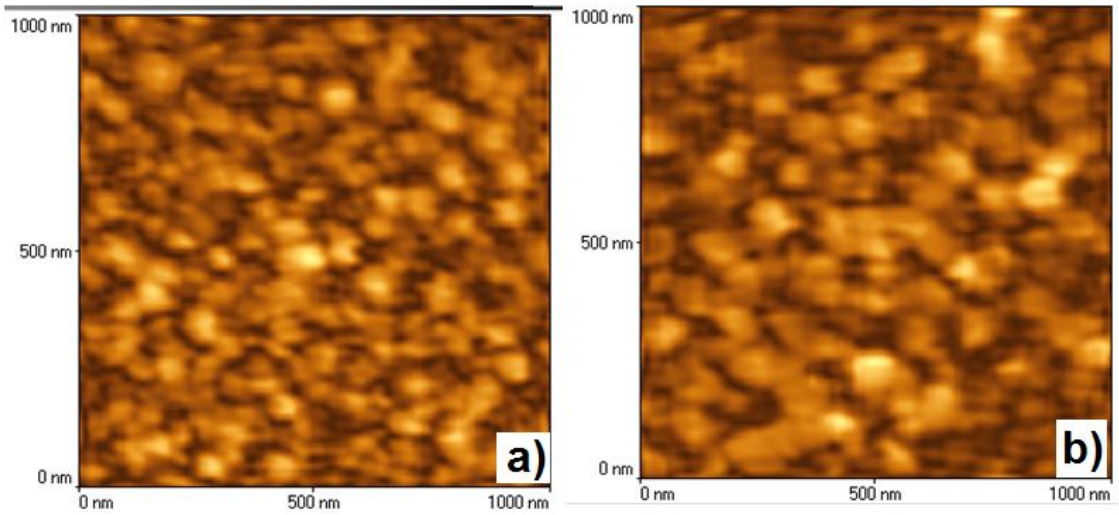

Figura 37 – Medida topográfica com a AFM em modo não contato em meio liquido. a) imediatamente após a inserção do substrato em solução de lipossomos e b) após 85 minutos.

Também, foram feitas medidas de correntes capacitivas e resistivas antes e depois da imersão do eletrodo de ouro na dispersão de lipossomos de DMPC. Conforme Figura 24 e a correspondente citação[83], a formação de $^{-}$OH adsorvido sobre a superfície do eletrodo, causa um fenômeno conhecido como pseudo-capacitância, definida pela equação abaixo:

$$C = \frac{dQ}{dE} = \sigma \frac{d\theta}{dE} \qquad 6\text{-}9$$

onde θ é o fator de cobertura do eletrodo e σ a carga por cm^2 necessária para cobrir o eletrodo com uma monocamada de $^{-}$OH adsorvido por cm^2[86]. Na Figura 38-a pode-se observar que em torno de 0,50 V há um pico e a pseudo-capacidade é de ≈ 37 μF/cm^2 e a resistência mínima é ≈ 55 Ω.

Após 30 minutos da imersão do eletrodo de ouro na dispersão com lipossomos de DMPC a voltametria foi repetida no mesmo eletrólito (0,5 M de H_2SO_4) obtendo a curva mostrada na Figura 38-b. O pico de pseudo-capacitância devido ao $^{-}$OH diminuiu de ≈ 37 μF/cm^2 para ≈ 11 μF/cm^2 e a resistência aumentou de ≈ 55 Ω para ≈ 135 Ω. Estas medidas corroboram a hipótese de que um filme isolante formou-se sobre o eletrodo de ouro da EQCM, diminuindo a adsorção de $^{-}$OH na superfície do eletrodo e aumentando a resistência elétrica a processos de transferência de carga na interface.

Na região do potencial de zero volt, onde não há pseudo-capacitância nem reações de adsorção de $^{-}$OH na superfície do eletrodo, e, por isso, a capacidade medida é apenas a da dupla camada, foi calculada a porcentagem de quanto o eletrodo de ouro foi recoberto pelo filme de DMPC.

Na Figura 38-a tem-se, para $E = 0{,}00$ V, $C_{DL} \approx 10$ µF/cm^2 (C_{DL}= Capacidade da *double layer*). Após o eletrodo de ouro da EQCM ter sido colocado em contato com a dispersão de lipossomos de DMPC, Figura 38-b, tem-se $C_{Filme} \approx 3{,}47$ µF/cm^2 .

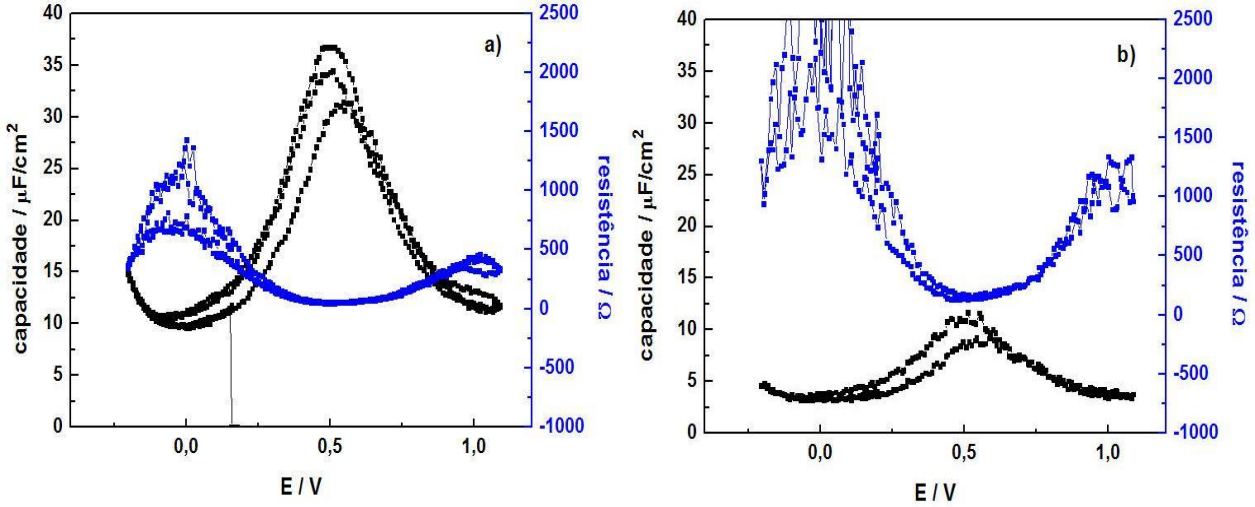

Figura 38 – Medidas com o Lock-in de capacidade e resistência da interface sólido/líquido em função do potencial do eletrodo de trabalho imerso em solução aquosa de H_2SO_4 0,5 M à frequência de 100 Hz. a) antes e b) depois da formação do filme de DMPC sobre a superfície do eletrodo de ouro.

Sobre o eletrodo de ouro pode-se distinguir duas configurações: uma com a superfície do outro sem a cobertura do filme, cuja capacidade é C_{DL}. E outra com a superfície coberta pelo filme, cuja capacidade resultante C é dada pela associação em serie de C_{DL} com C_{bio} que é a capacidade da membrana biológica. Como C_{bio} é muito menor que C_{DL}, C pode ser estimado como sendo igual à capacidade da membrana biológica, $C \approx C_{bio} \approx 0{,}80$ µF/cm^2, Figura 39[47].

As capacidades da *double layer* e a resultante, *C*, estão em paralelo. Portanto a porcentagem da área do eletrodo coberta pelo filme de fosfolipídio foi calculada da seguinte forma:

$$C_{Filme} = \theta \cdot C_{bio} + (1 - \theta) C_{DL} \qquad 6\text{-}10$$

Substituindo os valores de C_{Filme}, C_{bio} e C_{DL} na Equação 6-10 encontra-se $\theta \cong 70\ \%$, isto é, o eletrodo de ouro esta cerca de 70% recoberto pelo filme de DMPC.

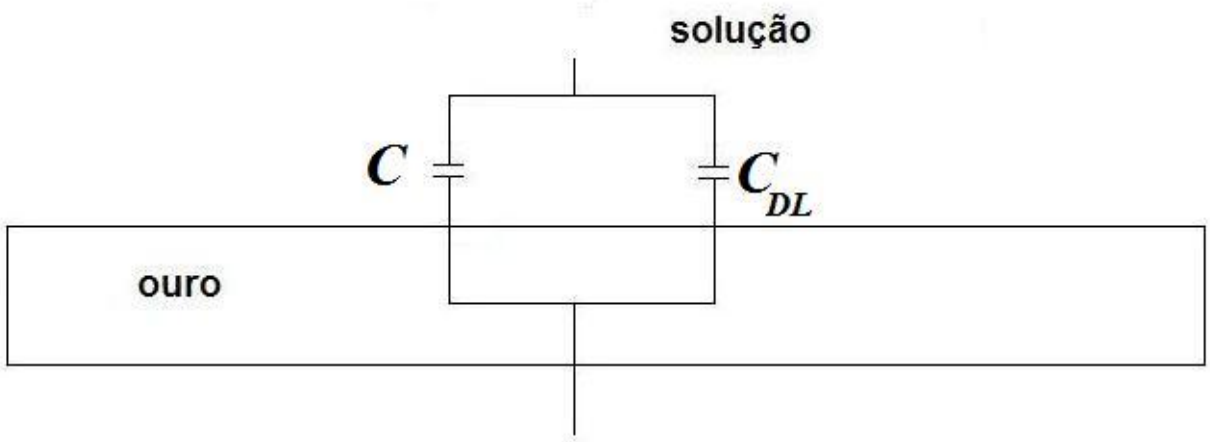

Figura 39 – Representação esquemática da capacidade medida para superfície de ouro coberta com filme de DMPC.

6.2 – Conclusões.

A análise combinada dos dados obtidos com a EQCM, com o Lock-in e com a AFM permitiram constatar a formação de filmes de lipossomos de DMPC sobre o eletrodo de ouro.

O experimento para formar diretamente uma bicamada compacta de DMPC sobre o eletrodo de ouro a partir de lipossomos em água deionizada aparentemente resultou na formação de uma bicamada de fosfolipídios. O valor da massa da bicamada obtida através da técnica de Langmuir permitiu a comparação com o valor de massa obtida com a EQCM. O filme formado mostrou ser bem mais complexo do que uma bicamada de filmes de Langmuir. Além disso, a massa e a fricção registradas pela QCM variaram com o potencial elétrico aplicado ao eletrodo coberto com o filme, na presença de H_2SO_4. Tal variação foi explicada como sendo causada pela variação da rugosidade do filme com o potencial elétrico aplicado, arrastando mais ou menos massa de eletrólito com o movimento oscilatório do eletrodo da QCM.

A técnica da QCM associada às técnicas eletroquímicas e a AFM mostraram ser poderosos instrumentos para o estudo da formação e da dinâmica de estruturas de moléculas anfifílicas sobre eletrodos sólidos imersos.

Capítulo 7

Conclusão do trabalho e perspectivas.

7.1 – Conclusão do trabalho.

A água não é um líquido newtoniano junto a superfícies sólidas, hidrofóbicas e hidrofílicas, ela apresenta estrutura. Íons adicionados podem competir com a superfície pelas moléculas de água, estabelecendo uma estrutura resultante, a qual responde aos movimentos oscilatórios da superfície da QCM. Foi desenvolvido um modelo teórico para explicar as medidas obtidas com a QCM em ambiente com diferentes concentrações de NaCl. A formação de pares iônicos de NaCl, junto a superfícies hidrofóbicas, em soluções aquosas, com concentração biológica, também é importante para as pesquisas tanto em biologia como na indústria.

Com a EQCM registramos a adsorção de lipossomas e formação de bicamadas de DMPC sobre superfícies de ouro sólidas a partir de dispersões de lipossomos. Uma solução de H_2SO_4 que apresenta um comportamento newtoniano foi usada para as medidas de forma a não alterar as propriedades viscoelásticas da água junto ao filme ou ao eletrodo.

O uso da técnica de Langmuir permitiu inferir a densidade superficial das moléculas de DMPC, a_m. Desse modo pode-se ter uma idéia da massa associada à formação de um filme de DMPC.

Através da técnica de AFM foi mostrado que um filme de 6 nm de espessura se forma sobre o eletrodo de ouro após 13 minutos de exposição a uma solução de lipossomos 10^{-3} M.

Usando voltametria e medidas de variação de massa e carga, foi constatada a formação da bicamada de fosfolipídios sobre o eletrodo de ouro da EQCM. Observou-se ainda que o eletrodo coberto com este filme apresentou variações de massa e atrito dependendo do potencial aplicado. Foi mostrado que este fenômeno seria compatível com uma alteração da rugosidade do filme formado devido ao aumento de a_m da monocamada superior para potenciais catódicos.

Foi demonstrado que a técnica da QCM associada a técnicas eletroquímicas, à AFM e à técnica de Langmuir permite inferir a formação, dinâmica e estrutura de filmes sobre a superfície sólida do eletrodo de ouro imerso.

7.2 – Perspectivas.

Construir modelos de membranas biológicas sobre substrato sólido a partir de lipossomos de fosfolipídios. A interação destas com soluções aquosas de NaCl, KCl e $CaCl_2$ simulará os ambientes celulares interno e externo. Uma vez formado o filme de lipossomos sobre a superfície do eletrodo, poder-se-á estudar, então, a dependência das propriedades físicas da água da interface com a superfície da membrana modelo; a interação desse filme com fármacos, com proteínas ancoradas à esse filme, etc..

Apêndice A

Técnica de Microscopia de Força Atômica

A técnica de AFM consiste em "tocar" a superfície estudada com uma ponta de teste (*tip*), obtendo assim parâmetros mecânicos (dureza, adesão, coesão) e estruturais da interface. O *tip* localiza-se na extremidade de um cantilever flexível, que possui liberdade para oscilar em diferentes direções e frequências[87],

Figura A 1 – Ponta de teste, tip, da técnica de AFM.

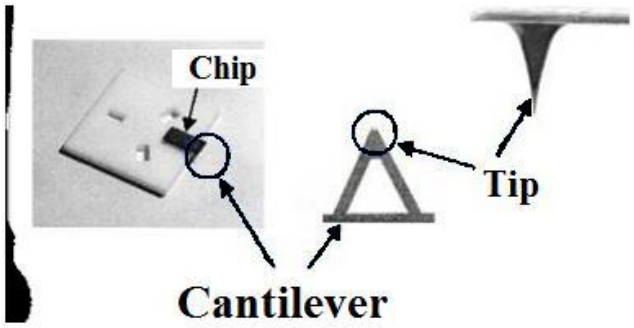

Figura A 1 – Ponta de teste, *tip*, da técnica de AFM.

Um feixe de laser incidente sobre o *tip* e refletido para um arranjo de fotodetectores constitui o sistema de detecção e as informações de posição são processadas por um microcomputador que controla o movimento do substrato piezoelétrico sobre o qual a amostra está colocada. A configuração experimental mencionada está representada na

Figura A 2.

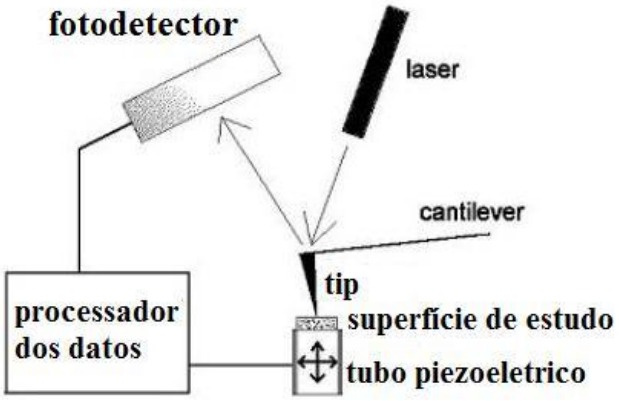

Figura A 2 – Configuração do AFM.

Existem vários métodos de funcionamento para o AFM: quando o *tip* toca ininterruptamente a superfície, o sistema está operando em modo contato. Se o *tip* não chega a tocar a superfície, está no modo não-contato. É possível fazer o sistema operar em modo contato intermitente: o *tip* toca a superfície por pequenos intervalos de tempo, Figura A 3.

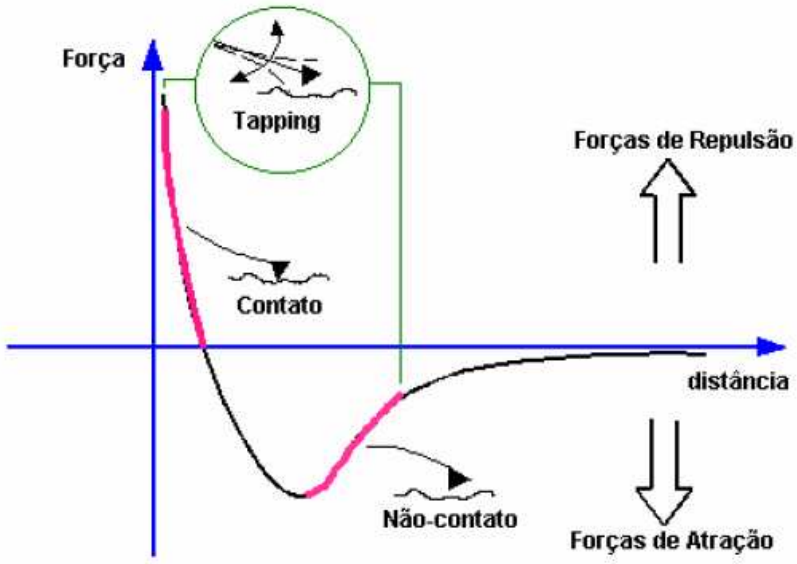

Figura A 3 – Modos de trabalho do AFM.

Uma reconstrução tridimensional da superfície é obtida quando realizamos a varredura de uma região determinada, seja em quaisquer um dos modos supramencionados. Importantes

informações mecânicas são obtidas quando o *tip* se aproxima e entra em contato direto com a superfície. Essa é uma modalidade de medidas chamada força *vs.* distância.

Durante a aproximação, imediatamente o *tip* experimenta uma força atrativa de van der Waals, e verificamos uma abrupta adesão com a superfície. Esse "salto" é denominado *snap-in*, Figura A 5. A presença de cargas na superfície e no *tip* também pode alterar esta força atrativa. Uma vez iniciada a retirada do *tip* da superfície, este pode permanecer aderido, o que é chamado de *snap-out*. Pelo *snap-out*, Figura A 4, conseguimos identificar as magnitudes das forças de adesão entre a superfície e o *tip*. Uma vez obtida a curva de força *vs.* distância, podemos "rebater" a curva (procedimento para eliminar a inclinação) e atermos somente à magnitude dos efeitos de atração/repulsão visualizados.

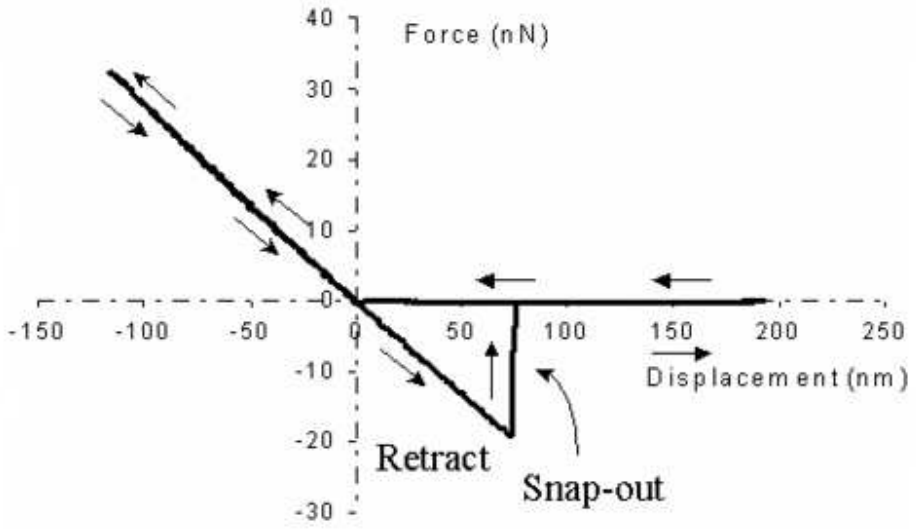

Figura A 4 – AFM *snap-out*.

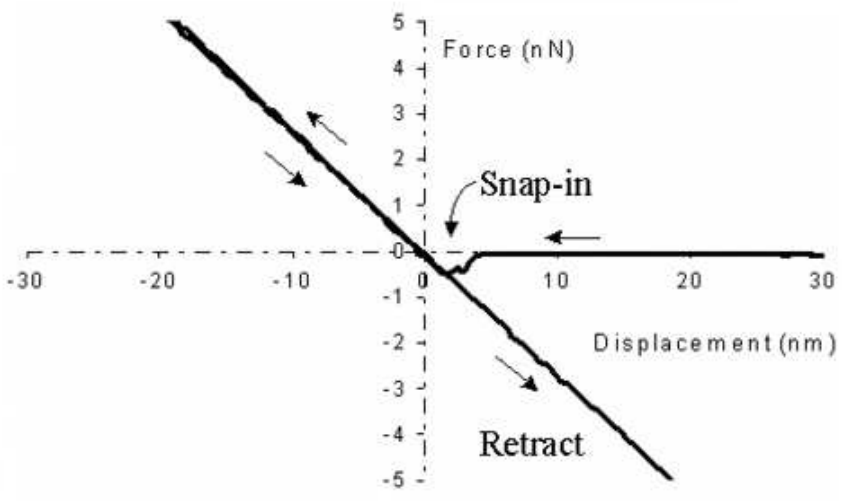

Figura A 5 – AFM *snap-in*.

Apêndice B

Medidas de capacidade utilizando lock-in amplifier

O princípio de funcionamento de um Lock-in amplifier como o da Figura B 1 se baseia na ortogonalidade de funções senoidais.

Princípio de ortogonalidade: se dois sinais *f(t)* e *g(t)* senoidais diferem em frequência, então a somatória integral da multiplicação de ambos os sinais num intervalo de tempo muito maior que o período das duas funções é igual a zero. Apenas sinais que possuem a mesma freqüência e a mesma fase fazem com que essa somatória seja diferente de zero, e valha metade da multiplicação das amplitudes de cada sinal.

O Lock-in basicamente compara a resposta do sistema a um sinal senoidal determinado, separando do ruído sinais com a mesma frequência, com fase possivelmente distinta daquela constituinte do sinal original. O sinal de resposta é separado em duas componentes, com base na fase em relação ao sinal original e defasada de 90 graus, correspondentes a impedâncias capacitivas, e em fase, correspondentes a impedâncias resistivas, respectivamente.

Figura B 1 – Lock-in amplifier.

Medidas de Capacitância e Resistência em Eletroquímica

Para medida de capacidades em células eletroquímicas (Figura B 2) pode-se acoplar um lock-in amplifier a um potenciostato, de maneira que o sinal aplicado pelo equipamento atua como uma perturbação sobre um sinal convencional. A técnica, no entanto, requer a existência de grande quantidade de portadores, ou seja, grande concentração de íons.

A configuração experimental assemelha-se a de ensaios eletroquímicos, nos quais uma célula eletroquímica contendo um eletrodo de trabalho (WE), um de controle (CE) e um de referência (RE) são necessários.

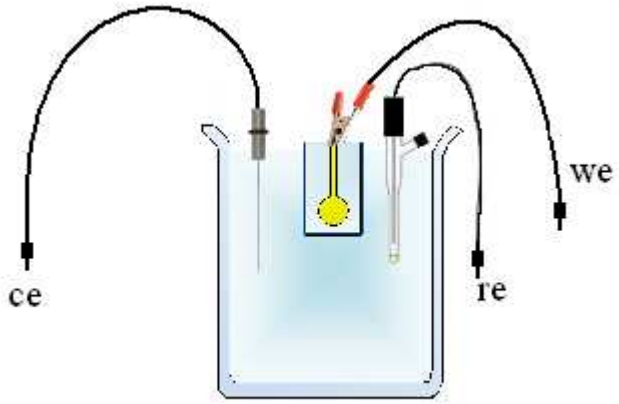

Figura B 2 – Configuração experimental da célula eletroquímica

O potenciostato fica permanentemente realizando uma voltametria no eletrodo de ouro, enquanto o sinal do lock-in é sobreposto, tal como uma pequena perturbação. O sinal resposta do potenciostato volta ao lock-in na forma de amplitudes em fase e defasadas, e por sua vez é retransmitido ao voltímetro com saída para o microcomputador que realiza a aquisição e armazenamento dos dados (Figura B 3).

Expressão utilizada no Lock-in para o cálculo de resistência:

$$\frac{V_{\sim}}{R} = I_R \qquad \text{(Lei de Ohm)} \qquad \text{B 1}$$

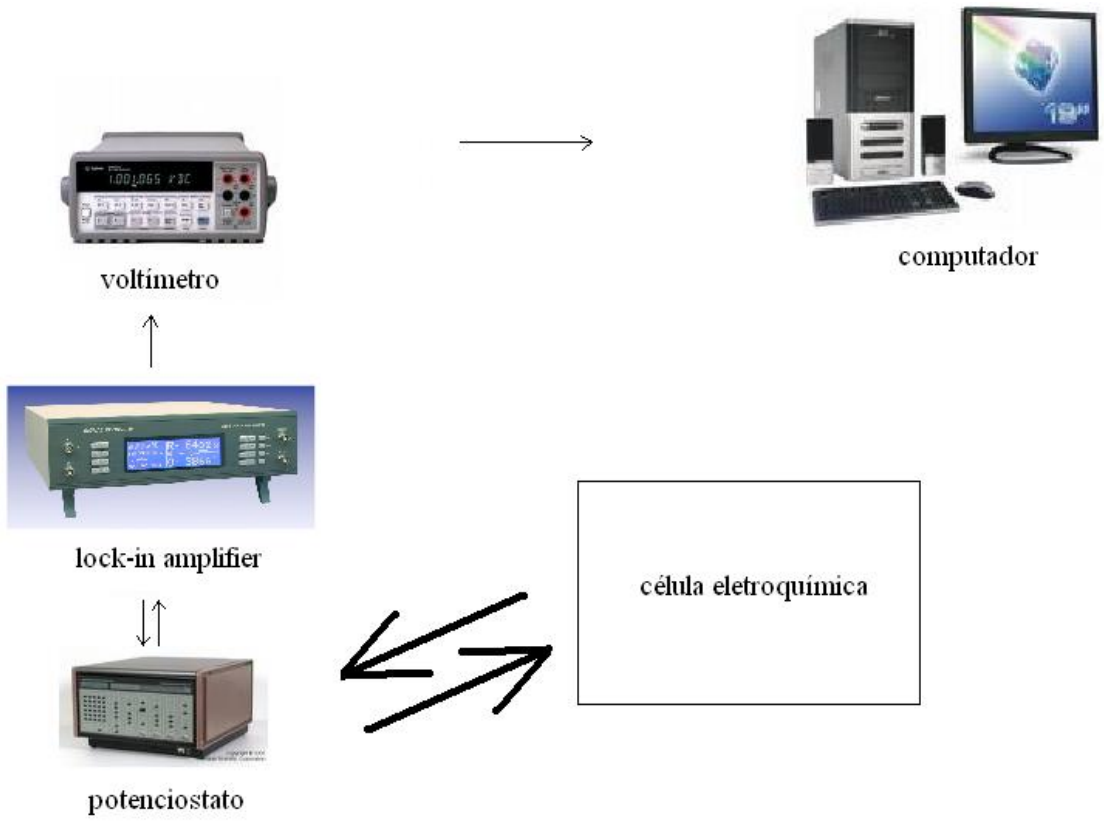

Figura B 3 – Montagem experimental utilizando o lock-in e potenciostato.

Sensitividade

10V => Sensitividade

X_V =>X_L

onde X_V é a impedância real visualizada no voltímetro e X_L é a impedância medida no lock-in

$$X_L = \frac{(X_V \times S)}{10} V \qquad \text{B 2}$$

Conversão da corrente no multímetro com a saída do potenciostato

1 V = 1 mA

$X_L = I_R$

$$I_R = \frac{X_L \times S \times 1mA}{10 \times 1}$$

$$R = \frac{V_{\sim}}{I_R} = \frac{10mV}{I_R} = \frac{10 \times 10^{-3} \times 10}{X_V \times S \times 10^{-3} A} = \frac{10^2}{X_V \times S}$$

De forma análoga foi obtida a expressão utilizada para cálculo de capacidade:

$$I_C = \omega \times C \times V_{\sim}$$

$$Y_L = \frac{(Y_V \times S)}{10} V$$

1V=1mA

$Y_L = I_C$

$$I_C = \frac{Y_L \times S \times 1mA}{10 \times 1}$$

$$C = \frac{I_C}{\omega \times V_{\sim}} = \frac{Y_V \times S \times 1}{1 \times 10} \times \frac{1}{2\pi \times f} \times \frac{1}{10} = \frac{Y_V \times S}{200 \times \pi \times f}$$

onde *f* é a frequência do sinal aplicado no sistema pelo lock-in, Y_v é a amplitude defasada de 90º em relação ao sinal original observada no lock-in e S é a sensitividade do lock-in (fundo de escala) $V_{\sim}$ é a amplitude do sinal gerado pelo lock-in.

Essas expressões foram utilizadas no tratamento dos dados experimentais e obtenção das curvas de capacidade e resistência.

Apêndice C

Artigo publicado na revista *ChemPhysChem* – janeiro de 2010.

DOI: 10.1002/cphc.200900700

Physical Properties of Water Near a Gold Surface: A Nanorheological Analysis

David Mendez Soares,* Mário Alberto Tenan, Andreza Barbosa Gomide, and Wyllerson Evaristo Gomes[a]

Dedicated to the memory of Konrad G. Weil, one of the pioneers in the use and applications of the quartz crystal microbalance

Water at room temperature is not simply a medium for which uniform properties can always be assumed. Water close to solid hydrophobic or hydrophilic surfaces has elasticity, which is measured by monitoring the quartz crystal microbalance (QCM) resonant frequency and resistance. Small additions of salt are shown to modify this elasticity. Furthermore, near the hydrophobic QCM gold electrode, undersaturated aqueous NaCl solutions present a high concentration of ion pairs, which is confirmed by atomic force microscopy through force versus distance measurements.

1. Introduction

The behavior of water at interfaces is strongly dependent on the hydrophobic/hydrophilic nature of the contacting surface. The difference in the ability to optimize hydrogen bonding between the water molecules at the solid/liquid interface and the adjacent bulk liquid will affect the structure of the interfacial water and hence its static and dynamic properties, as reflected in its density, viscosity, and dielectric constant. These considerations give rise to the expectation that liquid water in contact with a solid surface has a different structure from bulk water and that in the extreme it may be "ice-like" or "vapor-like".[1–6]

Aqueous salt solutions permeate the hydrophobic/hydrophilic domains of proteins and living tissues. It is known that salt changes the properties of bulk water causing changes of its vaporization, freezing temperature, etc. The possible changes of the physical properties of salted water close to hydrophobic/hydrophilic surfaces are an important subject for biological studies as well as for nanoengineering of structures in aqueous medium.

Bulk measurements of water properties are easily obtained and are available in the literature.[7] However, the direct measurement of the structure and density of water at a solid/liquid interface is not trivial. Experimental results giving indirect information on interfacial water properties were reviewed by Israelachvili and Wennerström[8,9] and Vogler.[10] Experiments by vibrational sum frequency generation (SFG) can only probe water molecules adsorbed onto surfaces.[1] Those in adjacent water layers cannot be observed. The range of this structural transition region between adsorbed, preferentially oriented water molecules and those in the bulk remains elusive.

Water at a solid/liquid interface was assumed in the literature to be a viscous fluid. This was especially the case for research with the quartz crystal microbalance (QCM), an acoustic-wave sensor device responsive to changes in the physical properties of a contacting medium (see, for example, refs. [11–15]).

Herein, we used the QCM to study the physical properties of the contacting water, assuming that it is a semi-infinite layer of a fluid contacting either a hydrophobic gold surface or a functionalized hydrophilic surface. Our objective with the simple analysis developed below is just to offer evidence of the viscoelastic behavior of water. Even though it is not possible to obtain information about film thickness, the simplified analysis also addresses an interesting point, namely, the effect on salt composition caused by structural changes of water near a surface.

A more complex analysis corresponding to a viscoelastic aqueous layer in series with a semi-infinite viscous aqueous layer, from which some film properties (thickness, composition) can be inferred, will be the subject of a forthcoming paper. The analysis in this article leads to results corroborated by probing water in contact with hydrophobic and hydrophilic surfaces using aqueous NaCl solutions at different concentrations.

We inferred water–salt aggregate/film formation on the hydrophobic QCM gold electrode surface associated with a change in the viscoelastic response of the contacting solution when compared with pure water. This is compatible with the possible partial disruption of hydrogen bonds between water structures involving salt ion pairs close to the electrode surface. With the hydrophilic functionalized QCM gold electrode, only viscoelastic responses of the contacting water not related to ion-pair formation were detected.

[a] Dr. D. M. Soares, Dr. M. A. Tenan, A. B. Gomide, W. E. Gomes
Laboratory of Nanostructures and Interfaces
Institute of Physics
University of Campinas—UNICAMP
C.P. 6165, 13083-970, Campinas, SP (Brazil)
Fax: (+55) 19 35215376
E-mail: soares@ifi.unicamp.br

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

The observed results show that water close to solid/liquid surfaces is different from bulk water in the sense that it is structured, and presents a shear storage modulus different from zero, contrary to the usual assumption. The data also suggest that these structures are different for hydrophobic and hydrophilic surfaces, and are salt concentration dependent.

A complementary experiment using the atomic force microscopy (AFM) tip approximation technique confirmed the existence of the salt aggregates on the electrode for hydrophobic surfaces such as Au, Teflon, and Si. On the other hand, hydrophilic surfaces such as mica did not present water–salt aggregate/film formation. These findings should have a great impact on our present knowledge of solid/aqueous interfaces.

2. Theory

The QCM comprises a thin AT-cut piezoelectric quartz-crystal disk sandwiched between two metal electrodes. A driver circuit establishes an alternating electric field between them.[13,16] A watertight setup assures that, when the QCM is immersed in a liquid, only one crystal face (the sensing face) is exposed to the probing liquid medium. This electrode surface should behave as an ideal shear plane. The small shear oscillatory movements of the QCM electrode (amplitudes of about 1 nm)[17] allow the measurement of the inertial and dissipative forces actuating in the contacting liquid and ensure minimal interference of the molecular movements in the region.

The experimental values obtained with the QCM are the resonant frequency f and the electrical resonant resistance R. These parameters are related to the electrical impedance of the crystal, Z_e, which is the ratio between the complex amplitudes of the potential applied to the crystal electrodes and the resulting electrical current. On the other hand, Z_e is related to the mechanical impedance, Z_m, of the oscillator through its piezoelectric properties, $Z_e = Z_m/k^2$, where k is an electromechanical constant.[13] The mechanical impedance Z_m is the ratio between the complex amplitudes of the shear force at the electrode surface and its corresponding velocity. If one crystal face (the sensing face) makes contact with a probing medium there is an increase of the shear force at this face. Since the crystal properties are constant, any observed change $\Delta Z_e = \Delta Z_m/k^2$ should be related to the properties of the medium.

For a contacting medium consisting of a semi-infinite fluid, the forces opposing the shear oscillations of the electrode surface are due to 1) the friction in the fluid, 2) the acceleration of the fluid mass dragged by the electrode, and 3) the acceleration of any rigid film mass-coupled to the electrode surface. The sum of these forces is the shear force change. The corresponding mechanical impedance change of the oscillator is given by real and imaginary terms [Eq. (1)]:

$$\Delta Z_m = r + j\omega m \tag{1}$$

In Equation (1) the real part is the friction r. The imaginary part is the product of the angular frequency $\omega = 2\pi f$ with any mass m coupled or dragged by the electrode, and $j = \sqrt{-1}$. The mass value is transduced by the resonant frequency change of the crystal oscillator Δf, which is the difference between the frequency f of the loaded crystal (crystal contacting a probing medium) and the frequency f_0 of the unloaded resonator [Eq. (2)]:

$$m = S\Delta f \tag{2}$$

where S is the crystal sensitivity. On the other hand, friction is transduced by the resonant resistance [Eq. (3)]:

$$\Delta R = \frac{r}{k^2} \tag{3}$$

where ΔR is the difference between the R value of the loaded crystal and the R_0 value of the unloaded crystal. Typical values are $R_0 \cong 10\ \Omega$ and $f_0 \cong 5.00$ MHz.

The values R and f define a point $Z(R,f)$ in the f versus R plane as shown in Figure 1. The exact values depend on the

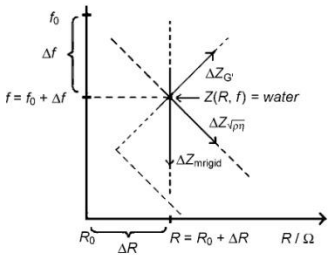

Figure 1. f versus R plane.

QCM setup, the rigidity of the O ring used to obtain a watertight crystal, the applied pressure to hold the O ring, etc. After mounting the system, the R_0 and f_0 values remain fixed.

For a semi-infinite fluid, the ratio between the shear stress and the fluid velocity at the surface is the characteristic impedance of the fluid, z_{Fluid}.[16] The relation between ΔZ_m and z_{Fluid} is given by Equation (4):

$$\Delta Z_m = z_{Fluid} A = \sqrt{\rho G} A \tag{4}$$

where A is the active electrode area, ρ is the fluid density, and G the complex shear modulus of the fluid [Eq. (5)]:

$$G = G' + jG'' \tag{5}$$

The shear storage modulus G' is a measure of the mechanical energy stored and recovered in each cycle of the periodic deformation. The shear loss modulus, $G'' = \omega\eta$, where η is the viscosity, indicates the mechanical energy lost in each cycle. If a fluid is structureless it will have $G' = 0$. Typical G' values for a polymer in the glassy state are $G' \gg 1$ GPa with $G' \gg G''$, in the rubbery state $G' \gg 1$ MPa with $G' > G''$, and in the transition range $G' \cong G''$.[15] For liquid water in contact with the surface electrode of a 5 MHz QCM, $G'' \cong 30$ kPa.

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

In the following analysis it is assumed that $G' \ll G''$. Substituting Equation (5) into Equation (4) with the assumption that $\frac{G'}{\omega\eta} \ll 1$ gives [Eq. (6)]:

$$\Delta Z_m \cong e^{j\pi/4} xA + e^{\ j\pi/4} \frac{\rho G'}{2x} A \tag{6}$$

where [Eq. (7)]:

$$x = \sqrt{\omega\rho\eta} \tag{7}$$

Comparing the real and imaginary parts of Equations (1) and (6), and taking into account Equations (2) and (3), we get [Eqs. (8) and (9)]:

$$\Delta R = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\left(x + \frac{\rho G'}{2x}\right) \tag{8}$$

$$\Delta f = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\left(x - \frac{\rho G'}{2x}\right) \tag{9}$$

The semi-infinite fluid is represented in the f versus R plane as the point $Z(R,f)$ in Figure 1.

Going one step further we add a small quantity of a solute to the fluid to cause a small change, ΔZ, due to the properties of the solution. This addition is represented at $Z(R,f)$ by Equation (10):

$$\Delta Z = \Delta(\Delta R) + j\Delta(\Delta f) \tag{10}$$

The change ΔZ can be represented by a combination of changes in the three directions shown in Figure 1. The following cases should be considered:

Case (a): If the fluid is Newtonian, changes in the properties of the fluid solution, ρ and η, represented by $\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$, lead to changes of ΔR and Δf given by the derivatives of Equations (8) and (9) with respect to x, with $G' = 0$ [Eqs. (11) and (12)]:

$$\Delta(\Delta R) = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\Delta x \tag{11}$$

$$\Delta(\Delta f) = \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\Delta x \tag{12}$$

Any sequence of points $Z(R,f)$ of known Newtonian fluids defines a Newtonian line, indicated by the vector $\Delta Z = \Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$ (see Figure 1). The ratio between Equations (12) and (11) gives the line slope a, which can be used to calibrate the QCM and to estimate k^2 [Eq. (13)]:

$$a = \frac{\Delta(\Delta f)}{\Delta(\Delta R)} = \frac{k^2}{\omega S} \tag{13}$$

Case (b): If the fluid presents some structure ($G' \neq 0$), the added solutes can cause Δx and $\Delta G'$ changes. Considering the assumption that $G' \ll \omega\eta$, it follows from Equations (8) and (9) that [Eqs. (14) and (15)]:

$$\Delta(\Delta R) \cong \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{k^2}\left(\Delta x + \frac{\rho}{2x}\Delta G'\right) \tag{14}$$

$$\Delta(\Delta f) \cong \frac{\sqrt{2}}{2}\frac{A}{\omega S}\left(\Delta x - \frac{\rho}{2x}\Delta G'\right) \tag{15}$$

For small solute additions such that $\Delta x \ll \frac{\rho}{2x}|\Delta G'|$, Equations (14) and (15) reduce to [Eqs. (16) and (17)]:

$$\Delta(\Delta R) \cong \frac{\sqrt{2}}{4}\frac{A}{k^2}\frac{\rho}{x}\Delta G' \tag{16}$$

$$\Delta(\Delta f) \cong -\frac{\sqrt{2}}{4}\frac{A}{\omega S}\frac{\rho}{x}\Delta G' \tag{17}$$

Differently from case (a), $\Delta G'$ changes imply that resistance and frequency changes have the same sign. A G' line can be drawn from water (reference point) to increasing values of G', as shown in Figure 1. The resulting $\Delta Z = \Delta Z_{G'}$ is a vector indicated by the arrow on the characteristic G' line, the slope of which is given by $-a$ [Eq. (18)]:

$$\frac{\Delta(\Delta f)}{\Delta(\Delta R)} = -\frac{k^2}{\omega S} = -a \tag{18}$$

In the special case that the solute additions lead to a decrease of G', $Z(R,f)$ moves along the negative direction of the G' line. Increasing values of the solute concentration eventually cause $\Delta x \gg \frac{\rho}{x}\Delta G'$ and Equations (14) and (15) reduce to Equations (11) and (12) for Newtonian fluids. Thus, the resulting ΔZ will be a vector in a direction parallel to the Newtonian line.

Case (c): If the solutes cause only thin rigid film formation on the electrode contacting the semi-infinite medium, the resonant frequency will change according to Equation (2) without resistance changes [Eqs. (19) and (20)].[18]

$$\Delta(\Delta R) = 0 \tag{19}$$

$$\Delta(\Delta f) = \frac{m_{rigid}}{S} \tag{20}$$

In the following, we apply the theory developed in this section to analyze the values of the parameters R and f obtained from the QCM immersed in water and in aqueous salt solutions.

3. Results and Discussion

We first considered the clean gold electrode surface of the QCM in contact with pure water. The electrode surface smoothness was quantified by the measurement of the average surface roughness, by using the AFM tip. An average roughness, R_a, of 2 nm over a surface scan of 2 μm was obtained. For the small features found, the surface behaves as an ideal smooth surface for a decay length of about 0.24 μm in the liquid.[19] The measured open circuit potential of the QCM polycrystalline gold electrode was close to the potential of zero charge (0.0 V vs. standard hydrogen electrode).[20] At these potential values the water dipoles do not show any pref-

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

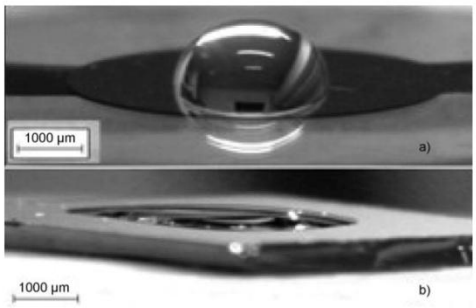

Figure 2. Water droplets on a a) gold surface and on b) 3-MPA-functionalized gold surface (b).

erential orientation, and the gold surface can be looked on as "hydrophobic", as shown in Figure 2a. On the other hand, covering the electrode with a monolayer of 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) turned the gold surface into a hydrophilic functionalized surface (Figure 2b).

For practical purposes, the contact angle indicates the hydrophobic/hydrophilic state of the surface. If the contact angle is greater than 90°, the liquid is said not to wet the substrate. If the contact angle is close to zero, the liquid wets the surface.[21] The QCM gold electrode presented an angle close to 90°; therefore, it is much more hydrophobic than the 3-MPA-functionalized gold electrode which presented an angle close to zero.

We started the experiment by measuring the frequency and resistance changes caused by immersing the "hydrophobic" QCM gold surface, previously exposed to air, in different beakers with water and aqueous salt solutions. The f and R values were taken after the stabilization of the QCM response in each solution. A representative example of the R and f dependence on time, obtained by immersing the QCM in pure water and then in the salt solution, is shown in Figure 3 for a 200 mM NaCl concentration. As shown, immersion in the salt solution caused unexpected negative frequency and resistance jumps.

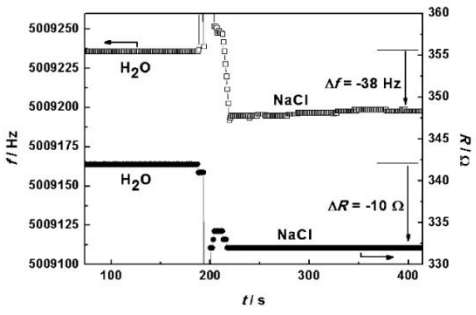

Figure 3. Dependence of f and R on time, obtained by immersing the QCM in pure water and then in a 200 mM NaCl solution, for a hydrophobic gold surface.

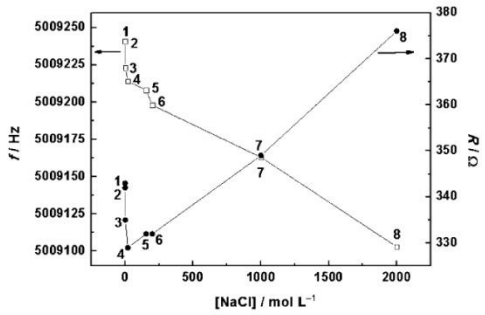

Figure 4. Frequency and resistance versus concentration values of diverse NaCl aqueous solutions, for a hydrophobic gold surface. Point 1: H_2O; points 2: 0.2, 3: 2, 4: 20, 5: 154, 6: 200, 7: 1000, 8: 2000 mM NaCl.

This result and those for other salt concentrations are indicated in Figure 4. The sequence of points 1 to 8 indicates the increasing order of salt solution concentration. Point 1 gives the frequency and resistance reference values for water at 25 °C. For small concentrations up to point 4 (20 mM), a fast decrease in f and R with increase in concentration is noticed. At higher concentrations, f and R are out of phase, that is, f decreases whereas R increases, the changes being less sensitive to the changes in salt concentration.

The measured values were not in agreement with the expected changes in f and R calculated by Equations (11) and (12), that is, case (a) in the Theory section. Following the usual interpretation of the QCM response, the expected changes of f and R would only be due to $\sqrt{\rho\eta}$ changes,[14,22] since ρ and η are increasing functions of the solute concentration as measured and tabulated in ref. [23]. Therefore, a new way to look at the phenomenon is necessary, since changes of ρ and η alone cannot explain the observed results.

These considerations point to the expectation that liquid water in contact with a solid surface has a different structure from bulk water. The assumption that a solid surface causes structural changes in the vicinal water will be analyzed in the light of the ideas developed in the Theory section.

A different view of the measured results is obtained by the use of the f versus R plane to represent the water fluid, $Z_w(R,f)$, and the changes ΔZ caused by the addition of solute. The values of f and R in Figure 4 are plotted in the f versus R plane shown in Figure 5a. The experimental points S1, S2, and S3 correspond to different sucrose solutions, which are observed to cause only changes of the properties of the fluid solution, ρ and η, represented by $\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$ in Figure 5a.[24] The three points for sucrose solution, together with point 1 for water, define the dashed "Newtonian" line for which the slope a is given by Equation (13). The dashed G' line, also added to Figure 5a, is defined by point 1, taken as reference, and slope $-a$ [see Eq. (18)]. Any small change ΔZ due to a change in $\sqrt{\rho\eta}$, or in G' or in m, occurs in a direction corresponding to the $\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$, ΔZ_G, and ΔZ_m axes drawn from point 1.

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

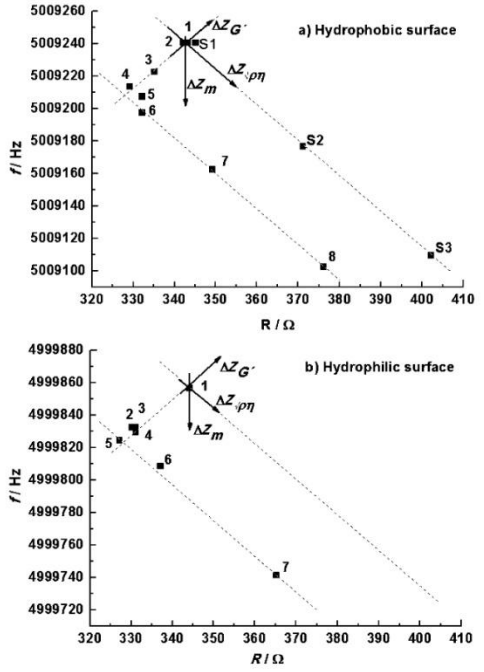

Figure 5. Frequency versus resistance points for water and diverse aqueous NaCl solutions: a) Point 1: H_2O; points 2: 0.2, 3: 2, 4: 20, 5: 154, 6: 200, 7: 1000, 8: 2000 mM NaCl. Additional points (aqueous sucrose solutions): S1: 2, S2: 149, and S3: 303 mM. b) Point 1: H_2O; points 2: 50, 3: 100, 4: 200, 5: 400, 6: 1000, 7: 2000 mM NaCl.

In Figure 5a, the sequence of points 1 to 8 indicates the dependence of $Z(R,f)$ on the salt concentration. The resulting $Z(R,f)$ moves in the $-\Delta Z_{G'}$ axis direction, being very sensitive to the salt concentration increase, up to point 4. These displacements of $Z(R,f)$ in the G' axis correspond to the in-phase changes of f and R shown in Figure 4. Beyond point 4 in Figure 5a, $Z(R,f)$ starts to follow a line parallel to the "Newtonian" line in the $+\Delta Z_{\sqrt{\rho\eta}}$ direction.

This behavior was described as case (b) in the Theory section. It is compatible with the assumption that the contacting water responds to the shear motions of minute amplitude as a non-Newtonian fluid with $G' \neq 0$. The shear storage modulus diminishes as the salt concentration increases and eventually stops varying at a given concentration. For higher concentrations, changes in $\sqrt{\rho\eta}$ become important in determining changes of Δf and ΔR [cf. Eqs. (14) and (15)].

The same experiment was performed with the hydrophilic 3-MPA-functionalized QCM electrode. The results for f and R are shown in Figure 5b. The "Newtonian" dashed line is defined by point 1 for water, with a slope taken from the points for sucrose solutions (Figure 5a). The dashed G' line was drawn as in Figure 5a. The resulting salt solution points 2–5 are on the decreasing G' line direction. Points 2–4 practically present the same G' value. The salt solution points 5–7 are on the dashed line parallel to the "Newtonian" line (Figure 5b). The resulting point $Z(R,f)$ moves in the f versus R plane in a way similar to how it moved in the case of the hydrophobic surface.

Both Figure 5a and b show that addition of small quantities of NaCl to water causes a small change, ΔZ, which does not follow the Newtonian direction. Besides that, the point on the G' axis for which $\Delta G'$ attains its maximum value corresponds to quite different solute concentrations, depending on the nature of the surfaces. For the hydrophobic surface it occurs around 20 mM (point 4, Figure 5a) and for the hydrophilic surface, around 400 mM (point 5, Figure 5b).

For both cases analyzed it seems that water near to the surfaces does present some structure. On the other hand, ions structure water in a process called ion hydration: due to the strong water-molecule dipole, the added ions are surrounded by a sheath of water molecules. Therefore, the ionic solutes should compete with the surface for the water molecules in determining the overall water structure and its response to the QCM surface motions.

A maximum decrease of $\Delta G' \cong -2900$ Pa, caused by the salt additions, was obtained for both surfaces by using the corresponding frequency or resistance shifts observed in Figure 5a and b and by substituting them in Equation (16) or (17). At the point where $\Delta G'$ is a maximum no more changes in G' occur. For higher salt concentrations, the $Z(R,f)$ position moves only due to $\sqrt{\rho\eta}$ changes. From Equation (14) or (15), this occurs when the magnitudes of the terms in the brackets are equal [Eq. (21)]:

$$\Delta x \cong \frac{\rho}{2x}|\Delta G'| \qquad (21)$$

Using Equation (21) and $\Delta G' \cong -2900$ Pa, a value of $\Delta x = \sqrt{\omega}\left(\sqrt{\rho\eta}_{\text{solution}} - \sqrt{\rho\eta}_{\text{water}}\right) \cong 274.5\ \text{kg m}^{-2}\text{s}^{-1}$ is found. Assuming that for water the values of ρ and η are, on average, close to the bulk ones, $\sqrt{\rho\eta}_{\text{water}} \cong 0.942174$.[23] Hence we get $\sqrt{\rho\eta}_{\text{solution}} \cong 0.991060$, which corresponds to a salt concentration of 750 mM. This value should be compared with the concentration values of the solutions used in the experiment. The salt concentrations were about 20 and 400 mM for the hydrophobic and hydrophilic surfaces, respectively.

The result of 750 mM concentration is satisfactory only for the hydrophilic surface, since the experimental values for $\Delta G'_{\text{max}}$ were between 400 and 1000 mM. On the other hand, for the hydrophobic surface the 20 mM salt solution alone cannot cause the change in Δx. The observed $\sqrt{\rho\eta}_{\text{solution}}$ value for the 20 mM salt solution at the hydrophobic gold surface indicates a more complex situation, in which hydrophobicity should play a fundamental role.

For plane hydrophobic surfaces, water density is predicted to be close to zero at the surface, increasing smoothly with increasing distance from the surface and attaining 90% of the bulk value at about 1.8 nm.[2] The reduction of H-bond exchange possibilities of water molecules at the hydrophobic interface diminishes considerably the dielectric susceptibility by up to an order of magnitude.[25] Therefore, water structured by

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

the hydrophobic surface enhances the effective forces between charged groups causing a possible (partial) association of oppositely charged ions in electrolyte solutions to form a distinct chemical species called an ion pair.[26,27] The increased concentration of NaCl ion pairs in the interfacial region contributes significantly to the increase of the $\sqrt{\rho\eta}_{solution}$ value. To test this hypothesis, we carried out AFM measurements of force versus distance for hydrophobic and hydrophilic surfaces in the presence of water and salt solutions. Figure 6 shows the

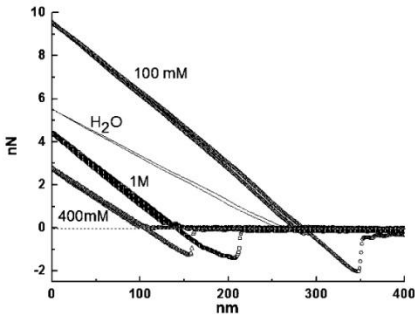

Figure 6. Force versus distance curves for the hydrophobic gold electrode immersed in water and NaCl solutions at different concentrations.

force versus distance curves for the gold hydrophobic electrode. By moving the tip from the solution, where force was assumed to be zero, to the surface, pressing it against the substrate, and then back and pulling it out, we obtained the curves shown. The curve for water was used as reference.

At large distances between tip and substrate (400 nm), the force is constant and is used as reference. The slope of the curve after contact measures the surface stiffness.[28] For the 100, 400, and 1000 mM salt solutions the corresponding slopes were 34.53, 28.19, and 33.2 mN m^{-1}, respectively, thus revealing the presence of a film with stiffness greater than the stiffness of 21.4 mN m^{-1} found for the gold surface in water. The tip adhered strongly to the substrate for all samples immersed in salt solutions. The forces necessary to pull out the tip from the substrate were about 2, 1.3, and 1.5 nN for concentrations of 100, 400, and 1000 mM, respectively. The adherence observed for water was much smaller, about 0.2 nN.

The appearance of the surface stiffness and adherence force for the force versus distance measurements with salt solutions were compatible with the formation of a salt film on the hydrophobic gold substrate due to the tip pressing into the sample. NaCl ion pairs are expected to form at the hydrophobic surfaces of the gold electrode and at the hydrophobic tip (Si_3N_4). Pressing energy was given to the ion pairs confined between the surfaces to form a small salt region connecting tip to substrate. To pull out the tip from the substrate a "disrupting" force was necessary (see Figure 6).

Force versus distance measurements were repeated for the hydrophilic mica surface immersed in water and in salt solutions of the same concentrations (data not shown). No significant changes in the slope of the force versus distance curve were found and no significant adherence force between the tip and the mica surface was observed.

4. Conclusions

Although the analysis of the QCM technique in immersed systems is well known,[12,15] there is a need for understanding the behavior of the QCM in contact with salt solutions. We used a simple model to show that water in contact with surfaces does present some structure. The addition of ions should compete with the surface for the water molecules in determining the overall water structure, and consequently its response to the QCM surface motions.

The model used herein assumed that the distance from the electrode over which the structure effect operates extends beyond the acoustic shear wave decay length. Shear storage modulus, density, and viscosity values characterizing this region should be different from those of the bulk. For the hydrophilic surface this seems to be the case, as shown by Pollack et al.[29] On the other hand, for hydrophobic surfaces the structured water region with viscoelastic properties can have a definite thickness. In this case, the measured values for shear storage modulus, density, and viscosity are averages taken over the whole medium (viscoelastic film plus viscous bulk water). These averages, therefore, are consequences of the viscoelastic behavior of water and its effect on salt composition near a surface.

Water close to the QCM gold surface behaves as a structured fluid, and presents a shear storage modulus different from zero, contrary to the usual assumption of it being a Newtonian fluid. The diminution of the local density and dielectric constant of the interfacial water at the hydrophobic surface causes the formation of NaCl ion pairs. The formation of a salt film on the gold electrode was observed, even at low salt concentrations, due to the pressing work of the tip against the ionic pairs confined between tip and substrate. As a first approach, a theory for analyzing semi-infinite non-Newtonian fluids was developed and applied to understanding some aspects of the near-surface aqueous media behavior in response to fast (~μs) and small-amplitude (~nm) perturbations (shear waves) imposed by the active QCM gold surface.

Experimental Section

The NaCl aqueous solutions were prepared immediately before use. Milli-Q water and analytical-grade chemicals (Merck) were used throughout. Sucrose solutions (P.A., Allkimia products) were prepared just before use. The QCM sensor used was a Stanford Research QCM200, 5 MHz polished quartz crystal, with parallel capacity compensation C_p and automatic R measurement with an active area for gravimetric measurements of 0.30 cm^2 and sensitivity $S = -5.30$ ng Hz^{-1}.

Functionalization of the QCM gold electrode surface was carried out as follows. A 3-MPA monolayer was prepared on the gold substrate by immersing the gold disk working electrode in ethanol

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

(5 mL) containing 3-MPA (0.005 mol L^{-1}) for at least 15 min as described in ref. [30].

The experiments were performed by keeping the QCM set in a support and by alternately immersing it in beakers filled with water and with the analyzed solution. The dependence on time of the changes of the resonant frequency and resonant resistance were monitored. In an independent experiment, a TopoMetrix TMX 2000 atomic force microscope was used to carry out force versus distance measurements on gold, Si, and mica substrates. A general-purpose cantilever, 0.03 N m^{-1} with a sharpened pyramidal tip of silicon nitride (Si_3N_4), was used. All measurements were carried out at 25 °C. At this temperature the density and viscosity of water are $\rho = 0.99797 \times 10^3$ kg m^{-3} and $\eta = 0.8903$ mPa s, respectively.[23]

Acknowledgements

The authors thank Dr. C. A. Bertran for helpful discussions. We are also grateful to L. O. Bonugli for technical assistance, to CAPES/PROEX, to CNPq for funding through Grant No. 135429/2007-2, and to FAPESP for the financial support through Grant No. 03/12529-4.

Keywords: ion pairs · nanorheology · quartz crystal microbalance · surface chemistry · water chemistry

[1] D. Schwendel, T. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, F. Schreiber, *Langmuir* **2003**, *19*, 2284.
[2] K. Lum, D. Chandler, J. D. Weeks, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4570.
[3] D. M. Huang, D. Chandler, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2047.
[4] D. Chandler, *Nature* **2002**, *417*, 491.
[5] M. Mezger, S. Schöder, H. Reichert, H. Schröder, J. Okasinski, V. Honkimäki, J. Ralston, J. Bilgram, R. Roth, H. Dosh, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 244705.
[6] E. Choi, Y. Yoon, S. Lee, H. Kang, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 085701.
[7] *Handbook of Chemistry and Physics, 78th ed.* (Ed.: D. R. Lide), CRC, Boca Raton, **1997**, pp. 6.3 – 6.5, 6.194.
[8] J. Israelachvili, M. H. Wennerström, *Nature* **1996**, *379*, 219.
[9] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, **1992**.
[10] E. A. Vogler, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *74*, 69.
[11] K. Doblhofer, K. G. Weil, *Bunsen Mag.* **2007**, *9*, 162.
[12] V. E. Granstaff, S. J. Martin, *J. Appl. Phys.* **1994**, *3*, 75.
[13] D. M. Soares, M. A. Tenan, S. Wasle, *Electrochim. Acta* **1998**, *44*, 263.
[14] K. Kanazawa, J. G. Gordon II, *Anal. Chim. Acta* **1985**, *175*, 99>.
[15] R. Lucklum, D. M. Soares, K. Kanazawa in *Piezoeletric Transducers and Applications, 2nd ed.* (Ed.: A. Arnau), Springer, Heidelberg, **2008**, pp. 63 – 96.
[16] R. Lucklum, D. M. Soares in *Piezoeletric Transducers and Applications, 2nd ed.* (Ed.: A. Arnau), Springer, Heidelberg, **2008**, pp. 205 – 221.
[17] F. Eggers, Th. Funck, *J. Phys. E* **1987**, *20*, 523.
[18] M. A. Tenan, D. M. Soares, C. A. Bertran, *Langmuir* **2000**, *16*, 9970.
[19] S. J. Martin, V. E. Granstaff, G. C. Frye, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2272.
[20] W. Kautek, M. Sahre, D. M. Soares, *Ber. Bunsen-Ges.* **1995**, *99*, 667.
[21] A. W. Adamson, *Phys. Chem. Surf.* **1990**, 386.
[22] H. Muramatsu, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2142.
[23] Z. Hai-Lang, H. Shi-Jun, *J. Chem. Eng. Data* **1996**, *41*, 516.
[24] E. J. Calvo, C. Danilowicz, R. Etchenique, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91*, 4083.
[25] F. Despa, A. Fernández, R. S. Berry, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 228104.
[26] Y. Marcus, G. Hefter, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4585.
[27] C. V. Krishnan, M. Garnett, B. Chu, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, *2*, 958.
[28] O. Teschke, G. Ceotto, E. F. de Souza, *Phys. Rev. E* **2001**, *64*, 011605.
[29] J. Zheng, W. Chin, E. Khijniak, E. Khijniak, Jr., G. H. Pollack, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *127*, 19.
[30] W. Sanders, M. R. Anderson, *Langmuir* **2008**, *24*, 12766.

Received: September 3, 2009
Revised: November 16, 2009
Published online on February 1, 2010

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Referências bibliográficas

[1] D. S. Goodsell. Bionanotechnology: Lessons from nature. Wiley-Liss, Inc., Hoboken,New Jersey, (2004).
[2] J. Katsaras, T. Gutberlet (Eds.). Lipid Bilayers: Structure and Interactions. *Springer-Verlag, Berlin*, (2000).
[3] C. Tanford. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. *John Wiley & Sons*, New York, 2nd Ed., (1980).
[4] D. Myers. Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications. *Wiley - VCH*, New York, 2nd Ed.
[5] F. Evans, H. Wennerstrom. The Colloidal Domain, Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet. *John Wiley*, New York, 1st Ed., (1994).
[6] A.W. Adamson. Physical Chemistry of Surfaces. *John Wiley and Sons*, New York, (1990).
[7] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira Brett. Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications. Oxford Science Publications, Oxford, (1994).
[8] A. Arnau, R. Lucklum, D. Soares, K. Kanazawa. Piezoelectric Transducers and Applications. Springer Verlag, Berlin, Cap. 4, 1st Ed., (2004).
[9] Y. Tang, Z. Wang, J. Xiao, S. Yang, Y.J. Wang, P. Tong, *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, p. 14925, (2009).
[10] E. Nováková, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Facultäten der Georg-August-Universtät ze Göttingen, (2008).
[11] Y. Yamamoto, T. Ando, M. Takayama, T. Egami, Y. Ohtsu, A. Sakurai, T. Yoshida, K.Taga, H. Kamaya, I. Ueda, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 317, p. 568–575, (2008).
[12] Y. Yamamoto, T. Ando, M. Takayama, T. Egami, Y. Ohtsu, A. Sakurai, T. Yoshida, K.Taga, H. Kamaya, I. Ueda, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 367, p. 47–51, (2010).
[13] T.H. Vu, T. Shimanouchi, H. Ishii, H. Umakoshi, R. Kuboi, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 336, p. 902-907, (2009).
[14] A. Michanek, N. Kristen, F. Höök, T. Nylander, E. Sparr, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1798, p. 829–838, (2010).
[15] J. H., Hurley, *Chem. Biol*., vol. 10, p.2–3, (2003).
[16] White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe, K. Hristova, *J. Biol. Chem*., vol. 276, p. 32395–32398, (2001).
[17] P. Ball, Life's Matrix: A Biography of Water. University of California Press, Berkeley, (2001).
[18] P. Ball, *Nature*, 452:291-292, (2008).
[19] P. Ball, *Chemical Review*, 108(1):74-108, (2008).
[20] J. Zheng, W. Chin, E. Khijniak, E. Khijniak Jr., G.H. Pollack. *Advances in Colloid and Interface Sciences*, 127:19, (2006).
[21] D. M. Soares, W. E. Gomes, M. A. Tenan, *Langmuir*, vol. 23, p. 4383-4388, (2007).
[22] M. A. Tenan, D. M. Soares, C. A. Bertran, Study, *Langmuir*, vol. 16, p. 9970-9976 (2000).
[23] D. M. Soares, S. Wasle, K. Doblhofer, M. A. Tenan, *Chemphyschem*, vol.3, p.817, (2002).
[24] O. Teschke, E.F. de Souza, *Chemical Physics Letters*, vol. 447, p. 379-383, (2007).
[25] T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru, M. Takayanagi, *Chem. Lett.*, vol. 4, 387-390, (1977).
[26] Chemdraw program.
[27] R. Nagarajan, E. Ruckenstein, *Langmuir*, 12:2934-2969, (1991).
[28] V. P. Poliakov. Introdução a Termodinâmica dos Materiais. Editora UFPR, Curitiba, (2005).
[29] K. Lum, D. Chandler, J. D. Weeks, *J. Phys. Chem. B*, 103:4570-4577, (1999).
[30] D.E., Vance, J.E., Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, vol. 31, Lipid and Lipoprotein Research Group, University of Alberta, Edmonton, Canada.
[31] J. N., Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces. London, Academic Press (1992).
[32] J.N. Israelachvili, D.J., Mitchell, B.W., Ninham, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 470, p. 185-201, (1977).
[33] A.D., Bangham, J., De Gier, J., G.D., Greville, *Chem. Phys. Lipids*, vol.1, p. 225-246, (1967).
[34] H., Eibl; A., Blume, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 553, p. 476-488, (1979).
[35] M.J., Blandamer, B., Briggs, P.M., Cullis, J.B.F.N., Engberts, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 24, p. 251-257, (1995).
[36] A.G.,Lee, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 472, p. 237-281, (1977).

[37] Sang-Woo Lee, Woo-Jin Chang, Rashid Bashir, Yoon-Mo Koo. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 12, p.185-199, (2007).
[38] D. Schwendel, T. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, F. Schreiber. *Langmuir*, vol. 19, p.2284, (2003).
[39] D.M. Huang, D. Chandler. *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, p.2047, (2002).
[40] F. Despa, A. Fernandez, R. S. Berry, *PRL*, vol. 93, p.228104, (2004).
[41] C.V. Krishnan, M. Garnett, B. Chu, *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 2, (2007).
[42] M. Tanaka, E. Sackmann, *Nature,* vol 437, (2005).
[43] D. H. Murray, L. K. Tamm, V. Kiessling, *Journal of Structural Biology*, vol. 168, p. 183–189, (2009).
[44] F. Giess, M.G. Friedrich, J. Heberle, R.L. Naumann, W. Knoll, *Biophysical Journal*, vol. 87, p. 3213-3220, (2004).
[45] M., Winterhalter, Black lipid membranes. Curr. Opin. Colloid*, Interface Sci.*, vol. 5, p. 250–255, [Review], (2000).
[46] M., Li, M. Chen, E., Sheepwash, C., L. Brosseau, H., Li, B., Pettinger, H., Gruler, J., Lipkowski, *Langmuir*, vol. 24, p. 10313-10323, (2008).
[47] M,. Chen, M., Li, C.L., Brosseau, J., Lipkowski, *Langmuir*, vol. 25, p. 1028-1037, (2009).
[48] R.P. Richter, R. Bérat, A.R. Brisson, *Langmuir*, vol. 22, p. 3497-3505, (2006).
[49] A.M., CARMONA-RIBEIRO, *Chem. Soc. Rev*,. vol. 30, p. 241-247, (2001).
[50] E.E:, Fenn, D.E., Moilanen, N.E:, Levinger, M.D., Fayer, *J. AM. CHEM. SOC*, vol. 131, 5530–5539, (2009).
[51] D.M., Soare, M.A., Tenan, A.B., Gomide, W.E., Gomes, *ChemPhysChem*, vol. 11, 905-911 (2010).
[52] Chandler D., *NATURE*. vol. 417. (2002).
[53] D.M. Soares, M.A. Tenan, S.Wasle, *Electrochimica Acta*, vol. 44, p. 263-268 (1998).
[54] W. Kautek, M. Sahre, D. M. Soares, Berichte Der. Bunsen-Gesellschft-Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 99, p.667, (1996).
[55] D. M. Soares, C. Fruböse, K. Doblhofer, W. Kautek, Ber. Bunsenges. *Phys. Chem.*, vol. 98, p. 219, (1994).
[56] G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, vol. 155, p. 206, (1959).
[57] E. M. Pinto, D. M. Soares, C. M.A. Brett, *Electrochimica Acta*, Submetido em 18 January 2008.
[58] D. A. Buttry, M. D. Ward, *Chem. Rev*., vol. 92, p. 1355, (1992).
[59] N.K. Permjakov, M.A. Ananyan, P.N. Luskinovich V.I. Sorokovoi, S.V. Saveliev, *Appl. Surface Sci*., vol. 164, p. 169, (2000).
[60] J.-M. Cho; W.M., Sigmund, *J. Coll. Interface Sci*., vol. 245, p. 405, (2002).
[61] K. Cooper, N. Ohler, A. Gupta, *J. Coll. Interface Sci*., vol. 222, p. 63, (2000).
[62] M. Stolz, et al., *J. Struc. Biol*., vol. 131, p. 171, (2003).
[63] O. Teschke, E.F. de Souza and G. Ceotto*, Langmuir*, vol. 15, p. 4935, (1999).
[64] O. Teschke, E.F. de Souza, *Applied Physics Letters*, vol. 74, p. 1755, (1999).
[65] O. Teschke, E.F. de Souza, *Review of Scientific Instruments*, vol. 69, p. 3588, (1998).
[66] E.F. de Souza, R.A. Douglas, O. Teschke, *Langmuir*, vol. 13, p. 6012, (1997).
[67] D.A. García, M.A. Perillo, *Biophysical Chemistry*, vol. 95, p. 157–164, (2002).
[68] C.Fruböse, Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation, Schwingquarzuntersuchungen organischen Monoschichten unter elektrochemischen Bedingungen, Berlin (1995).
[69] M,. Chen, M., Li, C.L., Brosseau, J., Lipkowski, *Langmuir*, vol. 25, p. 1028-1037, (2009).
[70] D.E., Vance, J., Vance, Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, *Elsevier*, vol. 31, (1996).
[71] H.Reichert, H. Schröder, J. Okasinski, V. Honkimäki, J. Ralston, R. Roth, H. Dosh, M. Mezger, S. Schöder, *The Journal of Chemical Physics*, vol. 128, p. 244705, 2008.
[72] S. Lee, H. Kang, E. Choi, Y. Yoon, *PRL*, vol. 95, p. 085701, 1995.
[73] Handbook of Chemistry and Physics. 78 edition.
[74] M.H., Wennerström, J. Israelachvili, *Nature*, vol. 379, p. 219, 1996.
[75] E.A. Vogler, *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 74, p. 69, 1998.
[76] V.E. Granstaff, S.J. Martin, *J. Appl. Phys.*, vol. 75, p. 1319, (1994).
[77] K.G. Weil, K. Doblhofer, *Bunsen-Magazin*, vol. 9, p. 9, (2007).
[78] K. Kanazawa, J.G. Gordon II, *Anal. Chim. Acta*, vol. 99, p. 175, (1985).
[79] A. Arnau, R. Lucklum, D. Soares, Piezoelectric Transducers and Applications. Springer Verlag, Berlin, Cap. 4, 2nd Ed., (2004).
[80] Z. Hai-Lang, H. Shi-Jun, *J. Chem. Eng. Data*, vol. 41, p. 516, (1996).

[81] E.J. Calvo, C. Danilowicz, R. Etchenique, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 91, p. 4083, (1995).
[82] O. Teschke, G. Ceotto, E.F. de Souza, Physical Review E, Statistical Physics, Plasmas, Fluids and Related Interdisciplinary Topics, vol. 64, p. 011605, (2004).
[83] J S. Gordon, D C. Johnson, *Journal of Electroanalytical Chemistty,* 365, 267 (1994).
[84] W.Kautek, M. Sahre, D. M. Soares, *Ber Bunsenges. Phys. Chem*, vol. 99, p.667-676, (1995).
[85] R.R.C., New, Liposomes – a practical approach, IRL press at Oxford University Press, (1997).
[86] Tese de doutorado do David Mendez Soares.
[87] M. Rosoff, *Nano-Surface Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, (2002).