



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza – CCEN
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

DQF

Dissertação de Mestrado

Caracterização Físico-Química da Adsorção
de Concanavalina A em Eletrodo de
Carbono Vítreo via Espectroscopia de
Impedância Eletroquímica

Diego José Raposo da Silva

Recife-PE Brasil

Setembro/2013

Diego José Raposo da Silva

Caracterização Físico-Química da Adsorção
de Concanavalina A em Eletrodo de
Carbono Vítreo via Espectroscopia de
Impedância Eletroquímica

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química Fundamental da
UFPE como parte integrante dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz

Recife-PE
Setembro/2013

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno, CRB 4-1758

Silva, Diego José Raposo da.

Caracterização físico-química da adsorção de concanavalina A em eletrodo de carbono vítreo via espectroscopia de impedância eletroquímica./ Diego José Raposo da Silva. – Recife: O Autor, 2013.

137f.: fig.

Orientador: Flamarion Borges Diniz

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental , 2013.

Inclui referências bibliográficas, apêndice e anexo.

1. Adsorção. 2. Química de superfície. 3. Cinética. 4. Proteínas. I. Diniz, Flamarion Borges. (orientador). II. Título.

547

(22. ed.)

FQ 2013-41

Título:

Caracterização Físico-Química da Adsorção de Concanavalina A
em Eletrodo de Carbono Vítreo via Espectroscopia de Impedância
Eletroquímica

Defendida por: Diego José Raposo da Silva

Orientador: Prof. Flamarion Borges Diniz

Data: 27 de setembro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Flamarion Borges Diniz – DQF/UFPE
(orientador)

Prof. Ricardo Luiz Longo – DQF/UFPE

Dr. Euzébio Skovroinski – DQF/UFPE

Obs.: _____

Dedico primeiramente este trabalho a Deus, pelos estalos intuitivos que me deu.

À minha família, pela união frente às adversidades.

À minha noiva Geanne, pelos momentos juntos.

Aos meus companheiros de “laboratório”, Gilson, Miguel, Jayra, Eduardo e Mônica, pelas conversas, desabafos e risadas que demos nesse curto espaço de tempo.

Aos meus amigos de formatura de graduação, Carol, Suelle, Amanda, Elaine e Victor, unidos apesar das adversidades.

A Dimitri, pelas conversas ótimas que tivemos.

A Marcelo Farias de Andrade, sempre um bom exemplo de químico competente.

Ao professor Flamarion, pelas excelentes discussões que tivemos, pelos conselhos valiosos, e por me mostrar o que é ser um experimental de primeira linha.

Aos professores que marcaram este semestre com sua ajuda em trabalhos paralelos, Oscar Malta e Thereza Soares.

A professora Janaína Versiani dos Anjos, pelos conselhos e conversas divertidas.

Ao prof. Benício, por ter-me dado um norte pra seguir, mesmo sem saber.

Aos que por ventura esqueci, mas que por justiça deveriam estar aqui, e/ou que se sintam ofendidos por não estarem. A vocês minha gratidão.

Agradecimentos

Agradeço ao prof. Flamarion, por ter me orientado com firmeza e perseverança que certamente nos levaram aos melhores resultados que poderíamos ter.

À professora Thereza, por ter me ensinado como empregar algumas ferramentas computacionais no estudo de proteínas.

Aos professores Benício de Barros Neto e Fernanda Pimentel, pelas primeiras lições em estatística que reverberam neste trabalho.

À professora Ana Paula, por gentilmente ceder o espectrofotômetro do LIAAQ para algumas medidas de cinética, algumas das quais apresento nesta dissertação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

"Então não sigo meus predecessores? Sim, mas eu me permito descobrir novas coisas, modificar algumas e deixar outras de lado. Não sou um servidor deles, mas alguém que concorda com suas ideias."

Sêneca, Sobre os enganos do mundo

"Qu'on ne dise pas que je n'ai rien dit de nouveau: la disposition des matières est nouvelle..."

Blaise Pascal, Pensées, 22

Resumo

Diego José Raposo da Silva; Caracterização físico-química da adsorção de concanavalina A em eletrodo de carbono vítreo via espectroscopia de impedância eletroquímica. Dissertação de Mestrado; Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, setembro de 2013.

A adsorção da concanavalina A desmetalizada em eletrodo de carbono vítreo foi estudada através da espectroscopia de impedância eletroquímica, por meio de medidas de capacitância e resistência. A capacitância interfacial medida em solução de NaCl indicou um recobrimento de proteína constante e em torno de 23% no intervalo de 200 mV a 800 mV vs. Ag/AgCl. Observou-se uma dispersão dielétrica influenciada pelo potencial, atingindo um mínimo em 500 mV vs. Ag/AgCl. Este efeito foi atribuído à reorientação dos momentos de dipolo da proteína em função da alteração do campo elétrico na interface. Em medidas realizadas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda redox foi possível verificar que a oxidação do eletrodo em potenciais acima de 1,1 V aumenta a quantidade de proteína adsorvida. Variando-se a concentração de proteína obteve-se uma pseudo-isoterma, e nestas condições a adsorção pôde ser modelada por um processo cinético de primeira ordem. Para adsorção por até 5 minutos o processo mostrou-se controlado por difusão em soluções à baixa concentração, e através deste comportamento pôde-se constatar que os dímeros da concanavalina A são as espécies dominantes na adsorção, com uma área de contato de 44 nm^2 , implicando uma adsorção do tipo “side-on”. As medidas de impedância também mostraram que o tratamento anódico do eletrodo produz espécies eletroativas na superfície, possivelmente responsáveis pelo aumento da adsorção. Por medidas de adsorção realizada em diferentes potenciais constatou-se que a carga não é um fator relevante neste processo, sendo este provavelmente controlado pelo aumento da hidrofiliabilidade do eletrodo. Considerações sobre o comportamento da concanavalina A nas diferentes condições oxidativas levaram a conclusão de que ela deva ser classificada como uma proteína do tipo “hard”.

Palavras-chave: Adsorção de proteínas, Concanavalina A, Cinética de adsorção, Carbono vítreo

Abstract

Diego José Raposo da Silva; Physico-chemical characterization of concanavalin A adsorption onto glassy carbon by using electrochemical impedance spectroscopy. Master's Thesis, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, September, 2013.

The adsorption of demetallized concanavalin A onto glassy carbon electrode was studied by electrochemical impedance spectroscopy, through capacitance and resistance measurements. The interfacial capacitance measured in NaCl solution as a function of electrode potential indicated a constant coverage around 23% between 200 mV and 800 mV vs. Ag/AgCl. It was observed a dielectric dispersion related to potential, reaching a minimum at 500 mV vs. Ag/AgCl. This effect was ascribed to protein dipole moment reorientation due to changes in the electric field at the interface. Measurements performed with the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox probe shows that the electrode oxidation at potentials above 1.1 V increases the amount of protein adsorbed. By changing the protein concentration a pseudo-isotherm was obtained, and at those conditions the adsorption could be explained by a first order kinetic process. For adsorption up to 5 minutes the process shows diffusion control in low concentration solutions, and through this behavior it was deduced that the concanavalin A dimers dominate the adsorption, with a contact area of 44 nm², implying a side-on type adsorption. Impedance measurements also showed that anodic treatment of electrode produces electroactive species on the surface, probably responsible for the adsorption increase. Following the adsorption at different potentials it was found that the charge is not relevant in the process, which is probably controlled by the hydrophilicity increase on electrode. According to the behavior of concanavalin A at the oxidative conditions applied it was deduced that it probably should be classified as a “hard” type protein.

Keywords: Protein adsorption, Concanavalin A, Adsorption kinetics, Glassy carbon

Lista de Figuras

FIGURA 1: (A) PRIMEIROS 10 AMINOÁCIDOS DA CONCAVALINA A, REPRESENTANDO A ESTRUTURA PRIMÁRIA (ÁTOMOS SIMBOLIZADOS POR ESFERAS SEGUNDO A LEGENDA DE CORES: ● – OXIGÊNIO, ● – NITROGÊNIO, ● – CARBONO E ○ – HIDROGÊNIO); (B) FITAS B REPRESENTANDO A ESTRUTURA SECUNDÁRIA, COM ALGUMAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO DESTACADAS EM VERMELHO E A SETA AMARELA INDICANDO A DIREÇÃO DAS FITAS, RESSALTANDO O ANTIPARALELISMO ENTRE ELAS; (C) MONÔMERO DA CONCAVALINA A REPRESENTADO A ESTRUTURA TERCIÁRIA COMPOSTA POR FOLHAS B PREGUEADAS ANTIPARALELAS; (D) DÍMERO COMO EXEMPLO DE ESTRUTURA QUATERNÁRIA FORMADA POR DOIS MONÔMEROS (CADEIAS EM VERMELHO E AZUL) UNIDOS POR LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO. FIGURAS OBTIDAS PELOS DADOS DE BOUCKAERT ET AL. [2] E EMPREGANDO O SOFTWARE VMD [3].	19
FIGURA 2: EXEMPLOS DE CONFORMAÇÕES (A) “SIDE-ON” E (B) “END-ON” PARA O DÍMERO DA CONCAVALINA A.	22
FIGURA 3: GRUPOS FUNCIONAIS EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO SUBMETIDO A POLIMENTO CONVENCIONAL COM ALUMINA. ADAPTADO DE [60].	25
FIGURA 4: (A) DIMENSÕES APROXIMADAS DO DÍMERO DA CONCAVALINA A DE ACORDO COM WANER ET AL. [40] E (B) RESPECTIVAS ÁREAS DE CONTATO PARA DIFERENTES FACES DO PARALELEPÍPEDO.	27
FIGURA 5: TETRÂMERO DA APO-CONCAVALINA A, SEGUNDO COORDENADAS ATÔMICAS DE BOUCKAERT ET AL. [2] E A VISUALIZAÇÃO DOS DÍMEROS (EM VERMELHO E AZUL) NO SOFTWARE VMD [3].	28
FIGURA 6: ISOTERMAS DE ADSORÇÃO COMPLETAS, ASCENDENTE (EM AZUL) E DESCENDENTE (VERMELHO), PARA UM CASO (A) COMPLETAMENTE REVERSÍVEL E (B) COMPLETAMENTE IRREVERSÍVEL. ADAPTADO DE NORDE ET AL. [43].	35
FIGURA 7: ESQUEMA REPRESENTANDO OS MAIS FREQUENTES MECANISMOS PROPOSTOS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS. ADAPTADO DE RAMSDEN [39].	37
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO DA IMPEDÂNCIA NO PLANO COMPLEXO PELA FORMA RETANGULAR (COR PRETA) E MODULAR (COR AZUL).	41
FIGURA 9: CIRCUITO (A) RC, BLOQUEANTE; (B) DE RANGLES, REATIVO.	42
FIGURA 10: GRÁFICOS DE NYQUIST E BODE (GRÁFICO MENOR) COM DADOS SIMULADOS PARA CIRCUITO RQ ONDE $R_{\Omega} = 100 \Omega$, $Q = 5 \times 10^{-6} \text{ F} \cdot \text{s}^{-(1-\alpha)}$ E $\alpha = 1; 0,9; 0,8$ E $0,7$.	44
FIGURA 11: GRÁFICOS DE NYQUIST E BODE (GRÁFICO MENOR) COM DADOS SIMULADOS PARA CIRCUITO DE RANGLES, COM $R_{\Omega} = 100 \Omega$, $R_{CT} = 5 \text{ k}\Omega$, $Q = 5 \times 10^{-6} \text{ F} \cdot \text{s}^{-(1-\alpha)}$, $\sigma = 2 \cdot 10^{-4} \text{ F} \cdot \text{s}^{-1/2}$ E $\alpha = 1; 0,9; 0,8$ E $0,7$.	45
FIGURA 12: CIRCUITO (A) RQ E (B) DE RANGLES COM DISPERSÃO NA CAPACITÂNCIA.	46
FIGURA 13: ESQUEMA REPRESENTANDO A CÉLULA NA QUAL A ADSORÇÃO DE CONA FOI CONDUZIDA AO MESMO TEMPO EM QUE UM DETERMINADO POTENCIAL CONSTANTE É APLICADO VIA CRONOAMPEROMETRIA.	52

FIGURA 14: GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA EM 460 NM VS. TEMPO DA MISTURA DE UMA SOLUÇÃO DE CONA ATIVADA COM GLICOGÊNIO DISSOLVIDO.....	58
FIGURA 15: GRÁFICOS DE (A) NYQUIST E (B) BODE PARA GCE EM NaCl 0,15 M EM POTENCIAIS E_{DC} DE 200 À 800 mV.	60
FIGURA 16: GRÁFICOS DE (A) NYQUIST E (B) BODE PARA GCE EM NaCl 0,15 M E $E_{DC} = 500$ mV, EM QUE (■) REPRESENTAM OS VALORES EXPERIMENTAIS E O AJUSTE NÃO-LINEAR É MOSTRADO EM LINHA VERMELHA.	61
FIGURA 17: GRÁFICO DE $\log Z' $ VS $\log \omega$ PARA GCE EM NaCl 0,15 M E $E_{DC} = 500$ mV.	62
FIGURA 18: COMPARAÇÃO DOS VALORES DE α OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MÉTODOS: (■) PELO AJUSTE NÃO-LINEAR DE UM CIRCUITO RQ E (●) PELO COEFICIENTE ANGULAR DE UM MODELO LINEAR AJUSTADO NOS GRÁFICOS DE $\log Z' $ VS. $\log \omega$	63
FIGURA 19: GRÁFICOS DE (A) NYQUIST E (B) BODE PARA GCE EM NaCl 0,15 M PARA POTENCIAIS ABAIXO DE 200 mV.....	64
FIGURA 20: VOLTAMETRIA CÍCLICA EM GCE E NaCl 0,15 M , COM VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $0,9 \rightarrow -0,2 \rightarrow 0,9$ V (1 CICLO).	64
FIGURA 21: GRÁFICO 3D DOS VALORES DE Q OBTIDOS A PARTIR DA EQ. 22, EM FUNÇÃO DE E_{DC} E DE f . AS LINHAS EM VERMELHO FORAM OBTIDAS EMPREGANDO A EQ. 32.	65
FIGURA 22: COMPARAÇÃO DOS VALORES DE Q ESTIMADOS PELO AJUSTE NÃO-LINEAR DE UM CIRCUITO RQ, PELA MÉDIA DOS VALORES PARA DIFERENTES FREQUÊNCIAS SEGUNDO A EQ. 22 E ATRAVÉS DA EQ. 32.....	66
FIGURA 23: GRÁFICO DE Z' VS. Z'' PARA GCE EM NaCl 0,15 M PARA OBTENÇÃO DE R_{Ω} PELO COEFICIENTE LINEAR DA CURVA PARA $E_{DC} = 500$ mV.....	68
FIGURA 24: COMPARAÇÃO DOS VALORES DE R_{Ω} OBTIDOS A PARTIR DO COEFICIENTE LINEAR DOS DADOS DE Z' VS. Z'' E A PARTIR DO AJUSTE NÃO-LINEAR DO CIRCUITO RQ EM DIFERENTES POTENCIAIS.	68
FIGURA 25: VALORES DE (A) C_0 PARA O GCE EM NaCl 0,15 M COM E SEM PROTEÍNA E (B) ΔC PARA E_{DC} ENTRE 200 E 800 mV.....	69
FIGURA 26: RECOBRIMENTO DE CONA EM GCE CALCULADO SEGUNDO A EQ. 27 EM FUNÇÃO DO POTENCIAL E_{DC}	70
FIGURA 27: GRÁFICO DOS VALORES DE (A) α ANTES E DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA E DE (B) $\Delta \alpha$ EM FUNÇÃO DO POTENCIAL E_{DC}	71
FIGURA 28: CARGA (EM UNIDADES DA CARGA ELEMENTAR) EM FUNÇÃO DO pH PARA DÍMERO E TETRÂMERO DEMETALIZADOS.	72
FIGURA 29: (A)-(C) MAPA DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO PARA O DÍMERO DA CONA EM pH 6, COM REGIÕES POSITIVAMENTE CARREGADAS EM AZUL E NEGATIVAMENTE CARREGADAS EM VERMELHO.....	73
FIGURA 30: LINHAS DE CAMPO ELÉTRICO DO DÍMERO DA CONA EM pH 6.	74
FIGURA 31: ESQUEMA REPRESENTANDO INTERPRETAÇÕES ACERCA DA INFLUÊNCIA DO POTENCIAL NA CAPACITÂNCIA E NO VALOR DE α	75

FIGURA 32: VOLTAMETRIAS CÍCLICAS DO GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M ANTES (LINHAS TRACEJADAS) E DEPOIS (LINHAS SÓLIDAS) DA SUBMERSÃO DO ELETRODO EM SOLUÇÕES DE CONA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (DIFERENTES CORES).	77
FIGURA 33: DIFERENÇAS DE POTENCIAIS DE PICO PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M ANTES E DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA.	78
FIGURA 34: GRÁFICOS DE (A) NYQUIST E (B) BODE PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M ANTES E DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	80
FIGURA 35: GRÁFICO DE NYQUIST PARA MÉDIA DE CINCO MEDIDAS FEITAS COM GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M ANTES DA ADSORÇÃO EM CONA.	81
FIGURA 36: GRÁFICO DE BODE PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M EM QUE OS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) SÃO COMPARADOS COM RESULTADO DE AJUSTE NÃO-LINEAR (LINHAS) PARA O MODELO DE CIRCUITO EQUIVALENTE APRESENTADO NA FIGURA 12(B). OS DADOS ANTES DA ADSORÇÃO SÃO APRESENTADOS COMO UMA MÉDIA DE CINCO MEDIDAS E OS RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA.	82
FIGURA 37: RESISTÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA OBTIDA POR AJUSTE NÃO-LINEAR DO CIRCUITO EQUIVALENTE DA FIGURA 12(B) NOS DADOS OBTIDOS PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONA EM SOLUÇÃO USADA NA ADSORÇÃO.	83
FIGURA 38: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ E NaCl 0,15 M PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DO GCE, OBSERVAÇÕES FEITAS DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA EM SOLUÇÃO 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	85
FIGURA 39: GRÁFICOS DE BODE PARA MEDIDAS REPETIDAS EM GCE E $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M OBTIDAS (A) ANTES E (B) DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA EM SOLUÇÃO 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NOS PRIMEIROS TESTES COM TRATAMENTO C3.	86
FIGURA 40: MEDIDAS SEQUÊNCIAIS DE IMPEDÂNCIA E VOLTAMETRIA APÓS SUBMERSÃO DO GCE EM CONA 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (REPLICATAS 3-5) OU ÁGUA MILLI-Q (BRANCO), ACOMPANHADAS POR MUDANÇAS EM (A) R_{ct} E (B) ΔE SEGUNDO ANÁLISE DE DADOS OBTIDOS EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M.	87
FIGURA 41: GRÁFICOS DE BODE PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M ANTES (\square) E DEPOIS (\blacksquare) DA ADSORÇÃO EM SOLUÇÕES DE CONA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (DIFERENTE CORES).	88
FIGURA 42: RESISTÊNCIAS DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONA, CALCULADAS PELO AJUSTE DO MODELO REPRESENTADO NA FIGURA 12(B), A PARTIR DE DADOS DE GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M.	89
FIGURA 43: RECOBRIMENTO SEGUNDO EQ. 34 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONA NA SOLUÇÃO EM QUE O GCE FOI SUBMERSO POR 10 MINUTOS.	90
FIGURA 44: MODELO CINÉTICO SEGUNDO MECANISMO $P+S \xrightarrow{k_1} P-S$ AJUSTADO NOS DADOS OBTIDOS EM CONDIÇÕES PSEUDO-ISOTÉRMICAS, EM QUE A ADSORÇÃO OCORRE POR UM TEMPO FIXO DE 10 MINUTOS.	92

FIGURA 45: (A) GRÁFICOS DE BODE (COM AJUSTES) E (B) VOLTAMETRIAS CÍCLICAS OBTIDAS PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M DEPOIS DA ADSORÇÃO DE CONA 0,01 MG·ML ⁻¹ POR DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.	95
FIGURA 46: RECOBRIMENTO SEGUNDO EQ. 34 PARA DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO DO GCE EM CONA 0,01 MG·ML ⁻¹	96
FIGURA 47: GRÁFICO DE θ , OBTIDO A PARTIR DA EQ. 34, EM FUNÇÃO DE $t^{1/2}$ PARA OS DADOS OBTIDOS ATÉ 5 MINUTOS DE ADSORÇÃO, COM LINHA VERMELHA INDICANDO O AJUSTE LINEAR E LINHA TRACEJADA EVIDENCIANDO OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DO MODELO.	97
FIGURA 48: GRÁFICOS DE BODE PARA GCE EM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM E NaCl 0,15 M APÓS PROCEDIMENTOS C1 OU C3, ANTES (SÍMBOLOS ABERTOS) E DEPOIS (SÍMBOLOS FECHADOS) DA ADSORÇÃO EM CONA 0,1 MG·ML ⁻¹ POR 10 MINUTOS.	98
FIGURA 49: GRÁFICOS DE (A) NYQUIST E (B) BODE PARA GCE EM NaCl 0,15 M APÓS OXIDAÇÃO DO ELETRODO ATRAVÉS DO TRATAMENTO C3.	100
FIGURA 50: GRÁFICO DE LOG $ Z'' $ VS LOG ω PARA GCE EM NaCl 0,15 M E $E_{DC} = 500$ mV APÓS PROCEDIMENTO OXIDATIVO C3.	101
FIGURA 51: GRÁFICOS DE (A) Q E (B) α OBTIDOS PARA O GCE EM NaCl 0,15 M, COM ELETRODO SUBMETIDO OU NÃO PREVIAMENTE À OXIDAÇÃO.	102
FIGURA 52: CAPACITÂNCIA PARA GCE EM NaCl 0,15 M PARA ELETRODO SUBMETIDO OU NÃO AO PROCEDIMENTO OXIDATIVO C3.	103
FIGURA 53: VALORES DE (A) R_θ E (B) θ PARA DIFERENTES POTENCIAIS APLICADOS NO MOMENTO DA ADSORÇÃO EM CONA 0,1 MG·ML ⁻¹ POR 10 MINUTOS.	104

Lista de Símbolos

Símbolo	Definição	Unidades
Γ	Excesso (ou densidade) superficial	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$
n	Número de moles de uma espécie adsorvida	mol
A	Área total de uma superfície	cm^2
Γ_m	Excesso (ou densidade) de massa superficial	$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$
m	Massa do componente adsorvido	g
θ	Recobrimento da superfície	
Γ_s	Densidade superficial de monocamada	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$
a	Área de contato do adsorbato com a superfície	nm^2
M	Massa molar	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
K	Razão entre a constante de equilíbrio de adsorção em interface gás-sólido e a pressão padrão p^0	bar^{-1}
p	Pressão	bar
$[A]_0$	Concentração do adsorbato	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
a_s	Atividade do solvente	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
K'	Razão entre a constante de equilíbrio de adsorção em interface sólido-líquido e a atividade do solvente	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$
$\Delta_{ads}\mu$	Potencial químico de adsorção	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
T	Temperatura	K
J	Fluxo difusional	$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
t	Tempo	s ou min
$[P]_0$	Concentração inicial de proteína na superfície, ou concentração analítica de proteína	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
D	Coefficiente de difusão	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$
A'	Fração da superfície disponível para adsorção	
Z	Impedância	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
E	Potencial	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
I	Corrente	$\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$
ω	Frequência angular	$\text{rad}\cdot\text{Hz}$ ou $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$
E_{DC}	Potencial contínuo aplicado em medidas de EIS	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
E_{AC}	Potencial alternado aplicado em torno de um contínuo na EIS	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
Z'	Parte real da impedância	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
Z''	Parte imaginária da impedância	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
$ Z $	Módulo da impedância	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
ϕ	Ângulo de fase entre corrente e potencial nas medidas EIS	graus
f	Frequência	Hz ou s^{-1}
C	Capacitância	$\text{F} = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$

R	Resistência	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
C_d	Capacitância de dupla-camada	$F = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$
R_Ω	Resistência ôhmica ou da solução	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
R_{ct}	Resistência de transferência de carga	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
k^0	Constante de velocidade padrão	$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
C^*	Concentração analítica das espécies eletroativas em solução	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} = 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$
E_a	Energia de ativação	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Z_W	Impedância do elemento de Warburg	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
α	Constante associada à dispersão do tempo de relaxação na interface descrita por um elemento de fase constante	
Q	Constante associada ao elemento de fase constante tal qual Q ($\alpha = 1$) = C_d	$F\cdot\text{s}^{-(1-\alpha)} = \text{s}^\alpha\cdot\Omega^{-1} = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}\cdot\text{s}^{-(1-\alpha)}$
σ	Coefficiente de transferência de massa	$F\cdot\text{s}^{-1/2} = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}\cdot\text{s}^{-1/2}$
τ	Tempo de relaxação	$\Omega\cdot F = \text{s}$
C_0	Valor esperado da capacitância para interfaces com dispersão na capacitância	$F = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$
q	Carga	C
q_θ	Carga do eletrodo para um dado recobrimento	C
$q_{\theta=0}$	Carga do eletrodo sem adsorbato	C
$q_{\theta=1}$	Carga do eletrodo quando saturado com adsorbato	C
C_θ	Capacitância do eletrodo para um dado recobrimento a um dado potencial elétrico	$F = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$
$C_{\theta=0}$	Capacitância do eletrodo sem adsorbato a um dado potencial elétrico	$F = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$
$C_{\theta=1}$	Capacitância do eletrodo quando saturado com adsorbato para um dado potencial elétrico	$F = \text{C}^2\cdot\text{J}^{-1}$
d	Distância da ponta da proteína em contato com a superfície até o extremo oposto desta (na direção normal à superfície)	nm
R_θ	Resistência de transferência de carga para um dado recobrimento	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
$R_{\theta=0}$	Resistência de transferência de carga para eletrodo sem adsorbato	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
$R_{\theta=1}$	Resistência de transferência de carga para eletrodo saturado com adsorbato	$\Omega = \text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{C}^{-2}$
E_{OCP}	Potencial de circuito aberto	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
χ^2	Qui-quadrado	
p	Momento de dipolo	$\text{C}\cdot\text{m}$
X	Campo elétrico	$\text{V}\cdot\text{m}^{-1} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$
(\perp)	Orientação “side-on” com momento de dipolo da proteína perpendicular ao campo elétrico	
(\parallel)	Orientação “side-on” com momento de dipolo da proteína paralelo ao campo elétrico	

c_P^0	Concentração comum de proteína em solução	$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
E_{PA}	Potencial de pico anódico	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
E_{CP}	Potencial de pico catódico	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
ΔE	Diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico	$\text{V} = \text{J}\cdot\text{C}^{-1}$
D_O	Coefficiente de difusão da espécie oxidada	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$
D_R	Coefficiente de difusão da espécie reduzida	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$
β	Coefficiente de transferência complementar	
v	Velocidade de varredura	$\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$
k_0^0	Constante de velocidade para processo redox	$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
k_P^0	Constante de velocidade para processo redox após adsorção de proteína	$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
τ_0	Valor esperado do tempo de relaxação	s
f_0	Frequência característica	Hz ou s^{-1}

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	18
1.1 - ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM INTERFACES SÓLIDO/LÍQUIDO	18
1.1.1 – Relevância.....	18
1.1.2 - Fatores influentes	21
1.2 - CARBONO VÍTREO	24
1.3 - CONCANAVALINA A	26
1.3.1 - Breve histórico.....	26
1.3.2 - Concanavalina A desmetalizada.....	27
1.2.3 – Aplicações da concanavalina A e estudos de adsorção	29
1.4 - O ESTUDO DO FENÔMENO DA ADSORÇÃO	31
1.4.1 – Noções básicas.....	31
1.4.2 - Isotermas de adsorção.....	32
1.4.3 - Aplicação em adsorção de proteínas.....	33
1.5 - CINÉTICA.....	36
1.5.1 – Adsorção de proteínas em interface sólido/líquido.....	36
1.5.2 - Difusão	37
1.5.3 - Adsorção.....	38
1.5.4 - Desnaturação.....	39
1.6 - ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA	40
1.6.1 - Aplicações em adsorção de proteínas	48
1.7 - OBJETIVOS.....	50
2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	51
2.1 – SOLUÇÕES.....	51
2.2 – APARELHAGEM	51
2.3 – CÉLULAS E ELETRODOS.....	51
2.4 - EXPERIMENTOS	53
2.4.1 – Atividade da Concanavalina A.....	53
2.4.2 – Experimentos para medida de capacitância	53
2.4.3 – Experimentos para medida de R_{ct}	54
2.5 – CÁLCULOS ELETROSTÁTICOS E MODELAGENS.....	56
3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
3.1 – ATIVIDADE DA CONCANAVALINA A.....	58
3.2 – ESTUDOS COM CAPACITÂNCIA	59
3.2.1 – Avaliação metodológica: obtenção de Q e a	59
3.2.2 – Adsorção de concanavalina A.....	69
3.3 – ESTUDOS COM RESISTÊNCIA.....	76

3.3.1 – Primeiros ensaios.....	76
3.3.2 - Pseudo-isoterma.....	87
3.3.3 – Cinética de adsorção.....	94
3.3.4 – Investigando o efeito da oxidação.....	98
3.3.5 – Investigando efeito da carga da superfície durante adsorção.....	103
4 - CONCLUSÕES.....	107
5 – REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICES.....	128
APÊNDICE A – MODELOS DE CINÉTICA DE ADSORÇÃO.....	128
APÊNDICE A.1 – Sequencial de uma etapa.....	128
APÊNDICE A.2 – Modelo de Langmuir.....	128
APÊNDICE B – FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS.....	129
APÊNDICE B.1 - Teste de correlação de Spearman.....	129
APÊNDICE B.2 - Teste da Falta de Ajuste.....	130
ANEXOS.....	133
ANEXO A – DEDUÇÃO ALTERNATIVA DO RECOBRIMENTO EM FUNÇÃO DA CAPACITÂNCIA.....	133
ANEXO B – DEDUÇÃO DO RECOBRIMENTO EM FUNÇÃO DA RESISTÊNCIA VIA MODELO ELETROQUÍMICO.....	134
ANEXO C – ASSOCIAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO DE BOLTZMANN E ORIENTAÇÕES DE MOLÉCULAS ADSORVIDAS EM INTERFACE ELETRIZADA.....	135
ANEXO D - DEDUÇÃO DO RECOBRIMENTO EM FUNÇÃO DA RESISTÊNCIA VIA MODELO ELÉTRICO.....	137

1 - Introdução

1.1 - Adsorção de proteínas em interfaces sólido/líquido

1.1.1 – Relevância

Proteínas são macromoléculas indispensáveis na manutenção da vida. Como outros polímeros, elas são formadas pela ligação sucessiva de monômeros, neste caso aminoácidos. Estas ligações são formadas por reações de condensação de um grupo carboxilato de um aminoácido com o grupo amino de outro, formando uma ligação amida, e como os aminoácidos apresentam as duas funções, carboxila e amina, essas ligações ditas peptídicas podem se estender para uma sequência de aminoácidos. A ordem destes aminoácidos é conhecida como *estrutura primária* da proteína. Diferentemente de outros polímeros, sua complexidade estrutural é visualizada/dividida em diferentes níveis. A *estrutura secundária* é caracterizada por motivos estruturais formados pelas interações entre os grupos C=O e N-H dos peptídeos através de ligações de hidrogênio. As mais conhecidas estruturas secundárias são as α -hélices e as folhas β pregueadas. A organização desses motivos tridimensionalmente em toda a proteína é conhecida como *estrutura terciária*, e neste caso as interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos (ou resíduos) são incluídas. Por fim, a associação entre diferentes cadeias polipeptídicas mantida por interações químicas forma a *estrutura quaternária* [1]. Para exemplificar esta hierarquia estrutural são apresentadas na Figura 1 (a), (b), (c) e (d), ao menos parcialmente, as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária da concanavalina A, proteína envolvida nos estudos descritos neste manuscrito, sendo melhor explorada na seção 1.3.

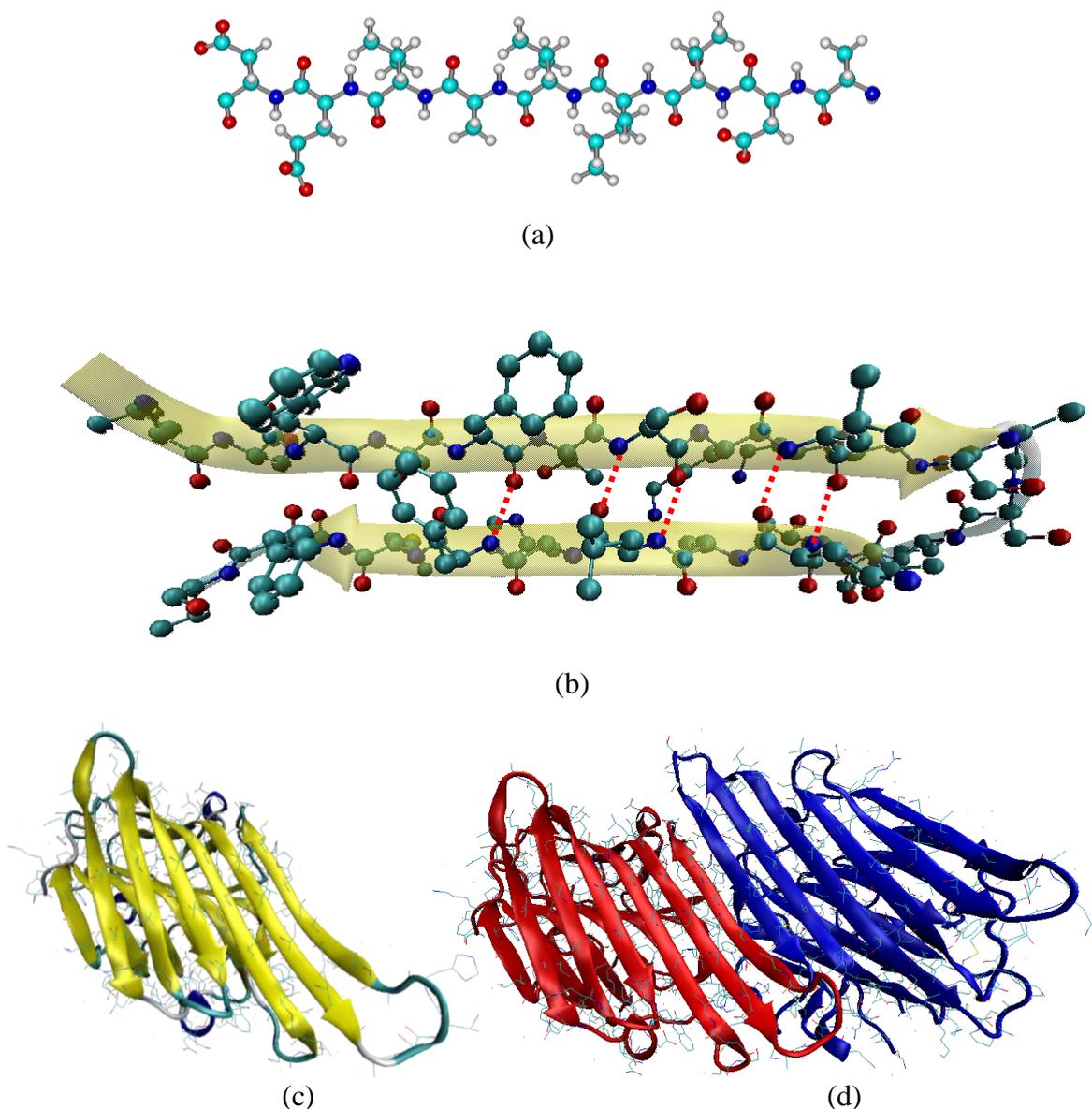


Figura 1: (a) Primeiros 10 aminoácidos da concanavalina A, representando a estrutura primária (átomos simbolizados por esferas segundo a legenda de cores: ● – oxigênio, ● – nitrogênio, ● – carbono e ○ – hidrogênio); (b) Fitas β representando a estrutura secundária, com algumas ligações de hidrogênio destacadas em vermelho e a seta amarela indicando a direção das fitas, ressaltando o antiparalelismo entre elas; (c) Monômero da concanavalina A representado a estrutura terciária composta por folhas β pregueadas antiparalelas; (d) Dímero como exemplo de estrutura quaternária formada por dois monômeros (cadeias em vermelho e azul) unidos por ligações de hidrogênio. Figuras obtidas pelos dados de Bouckaert et al. [2] e empregando o software VMD [3].

Praticamente todas as características inerentes aos organismos vivos são afetadas pelas proteínas, da codificação e expressão de material genético a processos metabólicos essenciais

[4], alguns deles ocorrendo em interfaces sólido/líquido, como no limite entre membranas e solução. Em tecidos, por exemplo, onde as células são mantidas juntas, a ausência de certas proteínas e polissacarídeos na superfície celular pode levar a apoptose (autodestruição da célula) [5]. Adicionalmente foi demonstrado que estímulos elétricos podem promover a regeneração e o crescimento de células nervosas pela sua influência na adsorção de fibrogênio [6]. A presença de proteínas na superfície de solos, por outro lado, é necessária para o desenvolvimento de ciclos biogeoquímicos, como as glomulinas na fixação de carbono [7].

De maneira um tanto quanto correlata, a adsorção de proteínas tem sérias implicações na medicina. O revestimento de implantes por proteínas do plasma sanguíneo, por exemplo, é a primeira etapa na formação de trombos (coágulos sanguíneos no interior dos vasos) na superfície do material, pois promove a adsorção de plaquetas, ativando mecanismos de coagulação [8, 9]. A trombose resultante deste processo é o grande obstáculo no desenvolvimento e implementação de dispositivos médicos mantidos em contato com sangue [10]. Em função disso biomateriais que minimizem esta adsorção são muito estudados, como o óxido de polietileno (PEO), por sua resistência a formação de filmes protéicos [8, 11]. A adsorção de proteínas é um processo essencial na osseointegração de implantes de titânio, usados em aplicações ortodônticas ou odontológicas [12, 13], enquanto proteínas da saliva formam filmes nos dentes que influenciam significativamente a saúde bucal [14].

No que diz respeito a aplicações industriais, a adsorção/desnaturação de proteínas na indústria alimentícia leva a grandes prejuízos. Na pasteurização de leite, por exemplo, o acúmulo de proteínas nas paredes de containeres de aço inoxidável, especialmente β -lactoglobulina, leva à formação de depósitos sólidos propícios ao desenvolvimento de microorganismos [15, 16]. O entupimento de membranas para microfiltração devido a agregados protéicos também é um problema [17]. Na indústria farmacêutica, por outro lado, a facilidade com que proteínas adsorvem em superfícies sólidas pode ser usada para sua extração de matrizes celulares [18].

Para propósitos analíticos, o desenvolvimento de biosensores está profundamente ligado a estudos que permitam controlar a adsorção de proteínas, seja em quantidade, orientação ou seletividade. Deve-se estabelecer um balanço, de modo que a concentração de proteína adsorvida seja alta o suficiente para conferir sensibilidade à técnica, mas de maneira que a desnaturação das espécies não a comprometa [19]. A adsorção não controlada de proteínas pode levar a problemas como limitações no transporte de microfluidos em dispositivos “Lab-on-chip” [20, 21], perda de sensibilidade em imunoenaios enzimáticos devido à desnaturação

[22, 23] ou orientação não-controlada [24], bioacumulação em biosensores *in vivo* [25], interações não-específicas em microarranjos protéicos [26], entre outros.

1.1.2 - Fatores influentes

Segundo Wahlgren e Arnebrant [27], o processo de adsorção de proteínas em superfícies é afetado por propriedades/características da *superfície*, da *proteína* e da *solução*. É da opinião destes autores que o campo elétrico, ou a carga, na superfície, são referentes à interface em si mais do que a qualquer uma das fases, diferentemente da maneira usualmente reportada, como uma propriedade da superfície.

Com relação à superfície, fatores como rugosidade e hidrofobicidade se mostraram altamente influentes na adsorção de proteínas. De uma maneira geral, maior *hidrofobicidade* implica maior quantidade de proteína adsorvida [28–30], por causa do aumento de entropia do sistema resultante da liberação de moléculas de água em contato com a superfície hidrofóbica [30], principal responsável pela facilidade com que proteínas adsorvem em superfícies sólidas [31]. A exceção são glicoproteínas, que apresentam comportamento oposto pela grande parcela polar externa às proteínas [31].

Uma maior *rugosidade* na superfície favorece a adsorção, pois aumenta a área disponível para interações não específicas da proteína, especialmente se as dimensões das cavidades correspondem às da proteína, tendo o efeito inverso se as cavidades forem menores [32]. Esta interação de proteínas por cavidades pode ser usada inclusive na nanofabricação de dispositivos onde as moléculas adsorvem em depressões criadas na superfície [33]. A direta proporcionalidade entre rugosidade e quantidade máxima de proteína adsorvida também é atribuída à facilitação de orientações da proteína com menor área de contato, aumentando o total adsorvido em função disso [34].

No tocante às características estruturais da proteína, a distribuição e composição de aminoácidos, parcela hidrofóbica, formato, estabilidade e tamanho, são informações valiosas que permitem explicar certas tendências no processo adsortivo. Atualmente a estrutura cristalográfica de uma grande quantidade de proteínas é disponibilizada no servidor do PDB (sigla em inglês de “*Protein Data Bank*”) [35], de modo que estas podem ser visualizadas e submetidas a cálculos computacionais em softwares como o VMD (sigla em inglês de “*Visual Molecular Dynamics*”) [3]. Essa acessibilidade é uma vantagem na associação entre estrutura e comportamento adsortivo de moléculas tão complexas quanto proteínas.

Para polímeros em geral, a quantidade adsorvida é maior para polímeros de maior *massa molar*, mas se torna independente deste fator para polímeros muito longos [36]. Em se tratando de proteínas, no entanto, este não parece ser um fator determinante, pois proteínas relativamente pequenas podem ser muito mais ativas que grandes [37]. Geralmente as moléculas de proteína apresentam um formato elíptico, de modo que geralmente são reconhecidos dois tipos de *orientação* na adsorção: “end-on” (ou “head-on”), com menor área de contato e o eixo de maior extensão paralelo ao vetor normal da superfície, ou “side-on”, na qual maior área da superfície da proteína está em contato com a superfície, e o eixo de maior extensão é perpendicular à normal da superfície. Uma ilustração da concanavalina A na sua forma dimérica sob uma superfície de grafeno nas orientações “side-on” e “end-on” é apresentada na Figura 2:

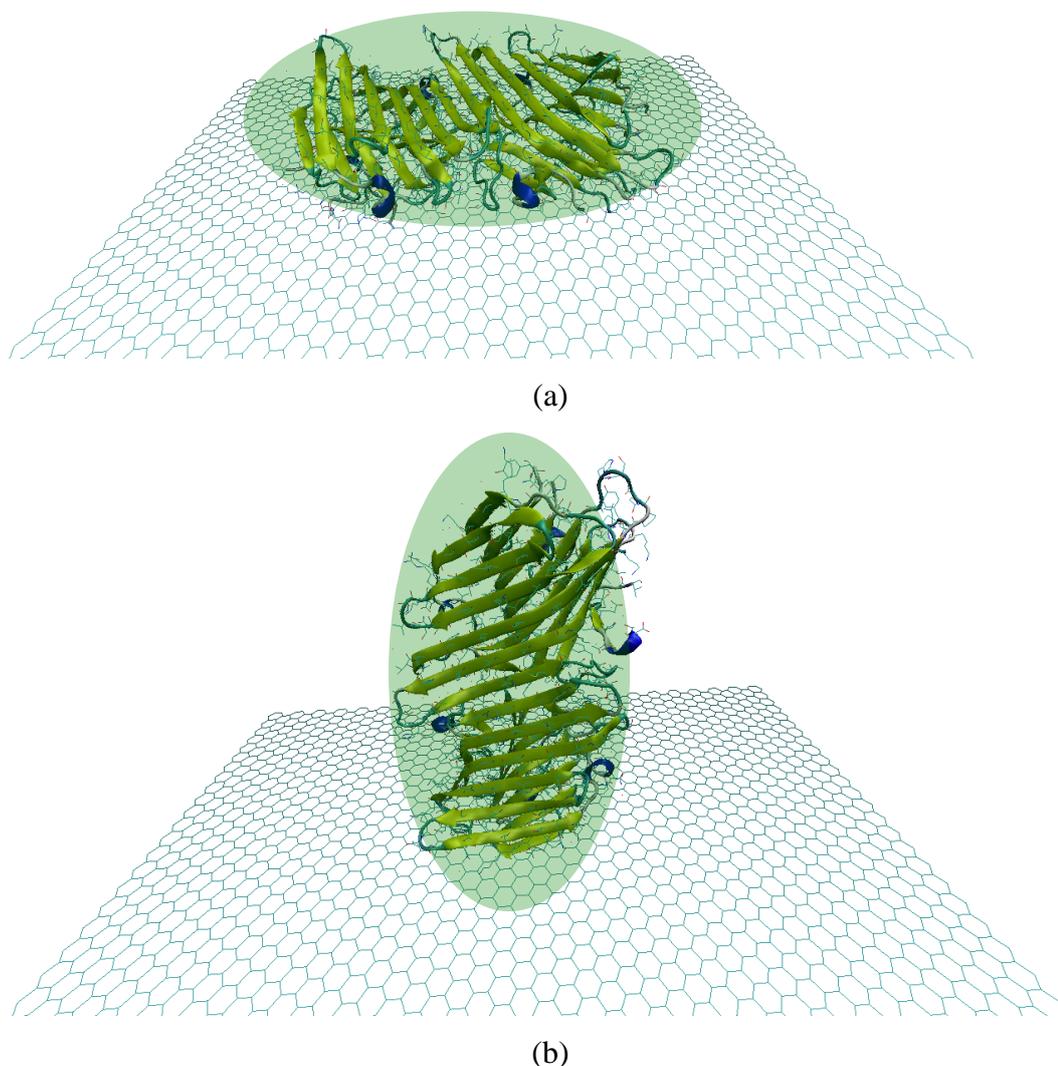


Figura 2: Exemplos de conformações (a) “side-on” e (b) “end-on” para o dímero da concanavalina A.

Por vezes a orientação é estipulada pela quantidade de proteína adsorvida [38], porém a variação, dentre outros fatores, da concentração da proteína em solução, influencia na conformação das moléculas. Em baixas concentrações há uma preferência pela forma “side-on”, pois ela maximiza o número de interações entre a proteína e a superfície, enquanto que para altas concentrações a forma “end-on” geralmente é majoritária [27, 38, 39]. Se as energias livres por unidade de área para a adsorção em diferentes orientações forem próximas, é possível estimar a probabilidade de uma dada orientação, de modo que esta probabilidade é superior para orientações com maior a área de contato [40].

Modificações estruturais da proteína após adsorção são influenciadas pela hidrofobicidade total da proteína. Neste caso, proteínas altamente hidrofóbicas tendem a ter uma *estabilidade estrutural* menor frente à adsorção, sendo, portanto, chamadas de proteínas “soft” [37, 41]. Entre elas estão as albuminas de soro bovino e humano (BSA e HSA), a α -lactoalbumina, a β -caseína, a hemoglobina e a catalase [31, 38]. Elas adsorvem em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, mesmo que a adsorção seja eletrostaticamente desfavorável. Já proteínas estáveis são chamadas de “hard”, e só adsorvem em superfícies hidrofílicas caso haja um favorecimento eletrostático (carga da proteína oposta à da superfície) [38, 42]. Alguns exemplos deste tipo de proteína são a lisozima, a β -lactoglobulina e a ribonuclease [31, 38]. Uma maior hidrofobicidade superficial da proteína, por outro lado, implica num aumento da quantidade máxima de proteína adsorvida [37].

Dos parâmetros controláveis em solução, os mais estudados são a *força iônica* e o *pH*. Geralmente o aumento da força iônica implica uma maior quantidade de proteína adsorvida [30, 38]. Como a força iônica tem a capacidade de potencializar o caráter eletrostático das interações envolvidas, foi observado que no ponto isoelétrico da proteína (pI) a interferência da força iônica é mínima (pois a carga líquida da proteína é zero), e em outros pH's a quantidade máxima de proteína adsorvida aumenta com o aumento da força iônica [41], sendo o efeito mais pronunciado em superfícies hidrofílicas que em hidrofóbicas [43]. A força iônica também pode influenciar dificultando as modificações estruturais das moléculas adsorvidas [41], ou favorecendo uma conformação específica, como a “end-on” em detrimento da “side-on” para elevadas forças iônicas [37].

É bem conhecida a tendência de que um máximo de adsorção ocorra em pH's próximos ao pI da proteína, pois a repulsão entre as moléculas na superfície é mínima [27, 31, 44], a curva de máximo de adsorção vs. pH exibindo um formato de sino centrada próxima ao pI (resultado da competição entre interações eletrostáticas proteína-proteína e proteína-

superfície) [28, 37, 41]. Alterar o pH muda o estado de protonação de diversos grupos funcionais presentes na proteína (além de grupos funcionais na interface, se houverem), mudando não só sua *carga líquida* como a distribuição desta carga. Esta distribuição influencia na orientação final da proteína [45, 46] e permite entender, por exemplo, como a orientação é modificada para minimizar a energia de interação entre moléculas vizinhas na superfície (ver Figura 1 da referência [31]). Esta *distribuição superficial de carga* pode ser obtida através de métodos computacionais baseados na resolução da equação de Poisson-Boltzmann para proteínas [47, 48], entre eles o APBS (sigla em inglês de “*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*”) [49], que fornece uma resolução numérica a partir de arquivos depositados no PDB.

Espera-se que superfícies com cargas opostas a das moléculas de proteína levem a uma maior adsorção, mas embora esse efeito seja bastante verificado [50–52], é certo que mesmo proteínas com cargas de mesmo sinal que a superfície, ainda que a superfície seja hidrofílica, podem adsorver [27]. Isto ocorre porque proteínas “soft” adsorvem dominadas pelo aumento de entropia conformacional, de modo que as interações eletrostáticas têm influência secundária. Para proteínas “hard” a interação eletrostática pode ser o fator determinante na quantidade adsorvida, sobretudo em superfícies hidrofílicas, onde a contribuição entrópica é menor ainda [38, 42].

Para determinar a *carga da superfície* usualmente mede-se o potencial de carga zero (abreviado em inglês como “PZC”) que, dentre várias abordagens [53], pode ser estimado a partir de medidas de capacitância em diferentes potenciais [54]. Potenciais superiores ao PZC implicam uma superfície positivamente carregada, e potenciais inferiores, superfícies negativamente carregadas. De um modo geral adsorção de ânions (Cl^- , Br^- , I^-) implica um deslocamento catódico (para potenciais mais negativos) do PZC [55], e adsorção de cátions (como Tl^+ e Cs^+) provoca um deslocamento no sentido anódico [56].

1.2 - Carbono Vítreo

A grande estabilidade frente a ataques químicos comparado a outros tipos de carbono e o fato de apresentar poros de tamanho muito pequeno (3,5 a 35 nm), bem como o baixo custo e a ampla janela de potencial de trabalho, fazem do carbono vítreo (cuja sigla em inglês geralmente é GC de “Glassy Carbon”) um material atrativo para a preparação de eletrodos inertes [57, 58]. Outra característica interessante neste tipo de superfície em comparação às

Saturado de Calomelano) [59]. Na verdade tão logo o potencial seja mantido positivo em relação a este eletrodo de referência, grupos carbonila e até carboxila são formados [57]. Dependendo da duração da anodização pode-se formar na superfície um filme de óxido de grafite eletrogerado. Esse filme possui razão O/C abaixo de 0,2, contêm muitos sítios aniônicos e é permeável a solventes e moléculas pequenas [59]. Foi reportado que a pré-anodização em 1,75 V (vs. SCE) por 10 minutos leva a formação de algo em torno de 11 grupos/Å² (assumindo reação de 2 elétrons por grupo) [63]. Outra possível alteração decorrente da oxidação é a diminuição da hidrofobicidade da superfície após anodização em 1,5 V vs. Ag/AgCl (NaCl 3 M) [61].

1.3 - Concanavalina A

1.3.1 - Breve histórico

A concanavalina A (conA) é uma proteína que pertence ao grupo das lectinas, proteínas que se aglutinam e/ou precipitam glico-conjugados [64]. Ela foi primeiro isolada como uma das globulinas do “jack bean” (*Canavalia ensiformis*, uma espécie de feijão) por J. B. Sumner em 1919 [65] (ganhador do Nobel de química de 1946 por obter a primeira enzima na forma cristalina, a urease). Seu ponto isoelétrico foi determinado alguns anos depois como sendo de 5,5 [66, 67], de modo que a proteína possuiria uma carga líquida negativa em pH fisiológico.

O potencial da proteína na aglutinação de glóbulos vermelhos (ou eritrócitos) de certos animais foi revelado em 1935 [68], o que a tornou a primeira aglutinina obtida na forma cristalina [67]. Sabendo que a conA precipita na presença de glicogênio em soluções neutras [68], bem como na adição de amido ou sacarose, especulou-se que a atividade da proteína seria devido a uma ligação com carboidratos [67]. A precipitação do glicogênio passou a indicar a atividade da proteína, e estudos mostraram que sua inativação poderia ser realizada pela retirada de íons metálicos essenciais na ligação com o polissacarídeo, notadamente o Ca²⁺ e o Mn²⁺ [69], embora a presença do segundo não seja obrigatória [70]. Os estudos de Goldstein mostraram que a concanavalina A pode se ligar a mono-, oligo- e polissacarídeos com grupos hidroxila acessíveis nas posições C-3, C-4 e C-6 de grupos α -D-manopiranosil e α -D-glucopiranosil, e a certos resíduos não terminais de manose [71, 72].

Discordâncias nas primeiras medidas da massa molar da lectina suscitaram estudos que mostraram que o valor observado dependia do pH [73, 74]. Os primeiros estudos de raio-X [75–77] e eletroforese [78, 79] revelaram que a proteína é um oligômero composto de

unidades monoméricas de algo em torno de 27.000 daltons, existindo como dímero em pH's próximos a 5,0 ou majoritariamente como tetrâmero em condições neutras, proporção influenciada pela força iônica e a temperatura do meio [80].

A conA foi a primeira lectina cujas estruturas primária [81–83] e terciária [81, 84] foram determinadas, com 237 aminoácidos por monômero e um arranjo espacial dominado por folhas β antiparalelas, como investigações empregando dicroísmo circular indicavam previamente [85]. O papel das interações de hidrogênio e outras ligações não-covalentes na coesão da estrutura quaternária foi então profundamente estudado [86]. Destes estudos constatou-se que as dimensões do monômero são $42 \times 40 \times 39 \text{ \AA}^3$ [77, 87], do dímero $30 \times 45 \times 80 \text{ \AA}^3$ [76] (depois $84 \times 40 \times 39 \text{ \AA}^3$ [86]) e do tetrâmero ficam em torno de $63 \times 87 \times 90 \text{ \AA}^3$ [75–77, 84, 88]. As dimensões do dímero segundo Waner et al. [40] podem ser aproximadas a de um paralelepípedo de dimensões $30 \times 45 \times 75 \text{ \AA}^3$, como ilustrado na Figura 4:

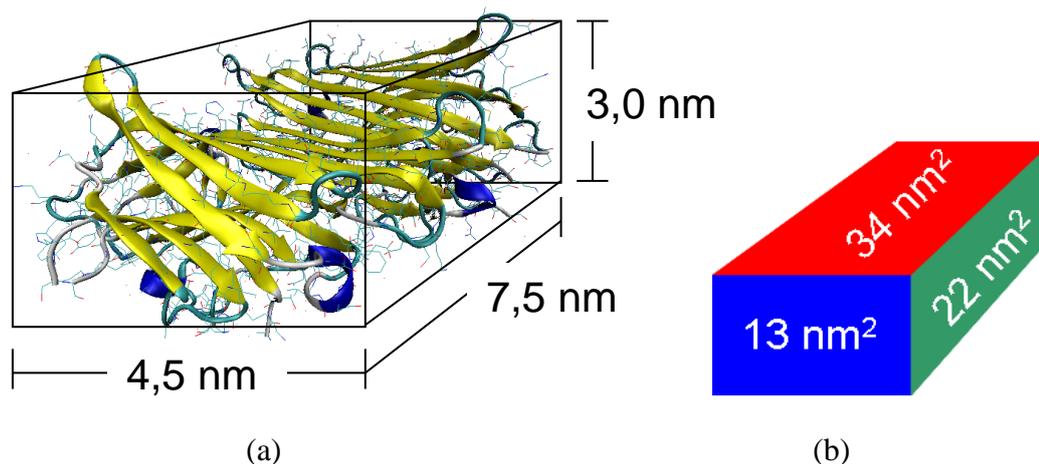


Figura 4: (a) Dimensões aproximadas do dímero da concanavalina A de acordo com Waner et al. [40] e (b) respectivas áreas de contato para diferentes faces do paralelepípedo.

1.3.2 - Concanavalina A desmetalizada

Não só a ligação da concanavalina A com carboidratos é reversível - o que a qualifica como lectina - mas, uma vez destituída dos metais que atuam como cofatores para a ligação carboidrato-proteína, sua atividade pode ser restaurada por exposição a sais destes metais [69]. Essa reversibilidade associada à ligação metal-proteína levantou interesses acerca das modificações estruturais que ocorriam com a complexação e seu papel na ativação da proteína. Como outras lectinas da família Leguminosae precipitam ao serem desmetalizadas, a concanavalina A é o único membro da família cujas coordenadas atômicas da estrutura

desmetalizada são conhecidas [2]. A chamada apo-concanavalina A (o prefixo apo significa “isenta de cofator”) foi primeiro cristalizada por A. Jack e J. Weinzierl em 1971 [89], e possui dimensões em torno de $61 \times 84 \times 91 \text{ \AA}^3$ (tetrâmero) [2, 89, 90]. A estrutura do tetrâmero, similarmente ao da proteína metalizada, tem formato tetraédrico resultante da junção dos dois dímeros, como ilustrado na Figura 5 a partir da representação dos dados obtidos por Bouckaert et al. [2]:

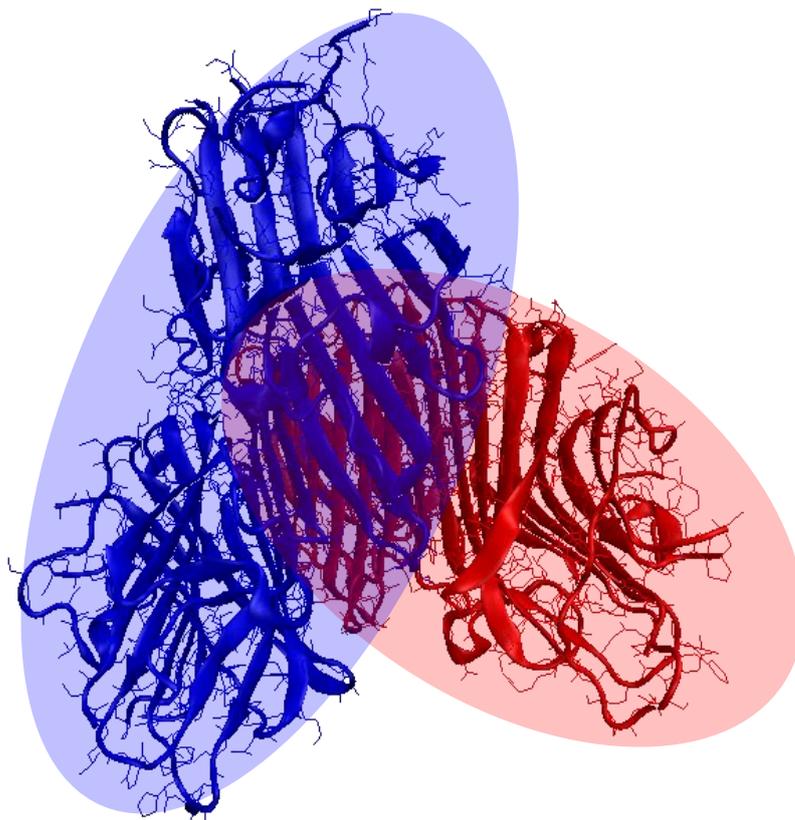


Figura 5: Tetrâmero da apo-concanavalina A, segundo coordenadas atômicas de Bouckaert et al. [2] e a visualização dos dímeros (em vermelho e azul) no software VMD [3].

Estudos da complexação da apo-conA com íons cálcio e manganês realizados por Rodney D. Brown III et al. (1977) permitiram inferir a existência de duas formas da conA, chamadas “locked” e “unlocked” [91], ou ativa e inativa segundo Bouckaert et al. [2]. A barreira de ativação e constante de equilíbrio de conversão da forma “unlocked” para “locked” são $22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e 0,15, respectivamente, de modo que a forma “unlocked” é predominante em soluções de apo-conA [91, 92]. Entretanto este equilíbrio é influenciado pela presença dos metais, pois a forma “locked” possui maior afinidade pelos íons, levando a um domínio desta conformação em soluções da proteína nativa (ou holo-conA). Mostrou-se

que a forma “locked” na apo-proteína possui uma interação muito mais forte com sacarídeos que a “unlocked” [93], e como a concentração da conformação “locked” na proteína ativada pelos metais é aproximadamente 100% [94], esta forma é tida como ativa, e a “unlocked” como inativa [2]. Estruturalmente verificou-se que a diferença entre as duas formas ocorre na ligação peptídica entre Ala-207 e Asp-208, que é *cis* na forma “locked” e *trans* na forma “unlocked” [95, 96]. As estruturas apresentadas nas Figuras 1, 2, 4 e 5 são referentes a forma “unlocked” (inativa) da apo-concanavalina A, predominante em solução.

A presença de diferentes formas da conA, como dimérica/tetramérica e “locked”/“unlocked”, suscitou estudos mais detalhados na medida do pI da proteína. A proteína estruturalmente intacta apresenta pI de 8,35 e 8,15 para dímero e tetrâmero, respectivamente. Já a apo-conA desativada apresenta pI 6,5 na forma dimérica, e a ativada de 6,4 para o dímero e 6,25 para o tetrâmero [97]. Naturalmente observou-se uma tendência do dímero possuir um pI ligeiramente superior ao do tetrâmero, em torno de 0,2 unidades de pH.

1.2.3 – Aplicações da concanavalina A e estudos de adsorção

A capacidade da conA de adsorver em superfícies sólidas sem perder substancialmente sua especificidade ao ligar-se à carboidratos, uma consequência de sua estabilidade estrutural [98], tem permitido seu uso em várias aplicações. A forte interação da conA com carboidratos foi aproveitada na construção de multicamadas enzimáticas, camada-por-camada, em superfícies de quartzo, platina e carbono vítreo, para aplicações em bioreatores, eletrocatalise e biosensores, bem como para detecção de glicose [99–101]. Estas camadas alternam a lectina com enzimas, que podem ser modificadas para conter grupos glicosídicos e assim serem ancoradas às camadas de conA (embora a abordagem não seja recomendada, por diminuir a atividade da enzima). A proteína imobilizada em fibras de microdiálise também mostrou-se importante no desenvolvimento dos primeiros detectores de glicose baseados em fluorescência [102, 103], que precedeu um significativo aumento nos sensores de glicose *in vivo* para diabéticos empregando a proteína [104].

Estudos visando um maior entendimento do processo de adsorção da conA em diversas superfícies foram realizados. Em superfícies de Ta₂O₅ e SiO₂ foi verificado que a adsorção da conA leva a multicamadas depois de algumas horas, mas as moléculas adsorvidas podem ser retiradas quase por completo ao lavar-se a superfície [105]. Waner et al. observaram, via microscopia de força atômica, a adsorção da proteína em mica em baixas concentrações da proteína, implicando a adsorção de dímeros mesmo em pH 7,3 [40]. Eles desenvolveram um

modelo para explicar a distribuição de orientações das moléculas na superfície, sendo uma soma de distribuições normais de diferentes orientações, da qual a preferencial foi a “side-on”. Este modelo prevê que para uma adsorção não seletiva de proteínas, a orientação que maximize a área de contato com a superfície é a mais provável de ser observada. Eles estimaram dimensões para o dímero ($29 \times 45 \times 59 \text{ \AA}^3$) e uma energia de interação com superfície de $-20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a orientação favorável.

No desenvolvimento de multicamadas enzimáticas, a adsorção de concanavalina A foi estudada em quartzo, platina e carbono vítreo [99, 100]. A adsorção foi monitorada em função de tempo nos dois primeiros casos, e estimou-se para a superfície de quartzo (hidrofóbico) um recobrimento percentual de 42% após 10 minutos (adsorção irreversível frente à lavagem com o tampão), e algo próximo de uma monocamada na superfície de platina. Considerando o pH, foi-se atribuída a adsorção aos tetrâmeros da conA.

Diniz e Ueta constataram que a adsorção da conA pode ser potencializada pela oxidação (química ou eletroquímica) da platina, neste caso formando multicamadas protéicas [106], e que a proteína nativa adsorve menos prontamente que a desmetalizada (diferença notável em superfícies oxidadas) [107]. Mielczarski et al. estudaram a adsorção de conA em poliestireno como superfície hidrofóbica [108] e germânio como hidrofílica [98]. Ele verificaram que em pH 4,8 uma camada do dímero na orientação “side-on” é formada sob o poliestireno nos primeiros 15 minutos, mas que após 22 horas de adsorção uma mudança para a forma “end-on” ocorre. Em pH 7,4, por outro lado, há a formação de uma primeira camada de dímeros “side-on”, que difundem mais rápido em solução, e posteriormente uma segunda de tetrâmeros [108]. Na superfície de germânio, hidrofílica por conter óxidos e hidróxidos na superfície, eles observaram comportamento similar, porém uma adsorção mais intensa. Não se verificou desorção das moléculas adsorvidas após limpeza com água e NaCl 1 M, porém empregando uma solução de SDS (sigla para “*Sodium Dodecyl Sulfate*”, um forte detergente) foi possível retirar boa parte da quantidade de proteína posteriormente adsorvida. Com isso constatou-se que, apesar da estabilidade da camada em soluções salinas, a adsorção em germânio é de natureza física [98].

1.4 - O estudo do fenômeno da adsorção

1.4.1 – Noções básicas

Antes de discutir os aspectos cinéticos e termodinâmicos da adsorção de proteínas em eletrodos sólidos, é importante descrever alguns conceitos básicos envolvendo adsorção. Grande parte destas definições foi obtida em literatura especializada [109].

A região limite entre duas fases em contato é conhecida como **interface**. Nela as espécies expostas à outra fase apresentam estados energéticos diferentes do das localizadas no interior de ambas as fases. O processo de adesão de espécies provenientes de uma das fases na interface, de modo que sua concentração seja maior que a do interior da mesma, é denominada **adsorção**. O processo contrário é chamado de **desorção**. O material no estado adsorvido é chamado de **adsorbato**, e a superfície na qual adsorve de **adsorvente** (o termo em geral é usado para superfícies sólidas, mas pode ser usado para a de líquidos). Em condições de equilíbrio à temperatura constante, a relação entre a concentração inicial do adsorbato e seu excesso na interface é conhecida como **isoterma de adsorção**. Essa concentração, segundo o tratamento das funções de excesso de Willard Gibbs [110, 111], é chamada de **excesso (ou densidade) superficial** Γ , e se há um único adsorbato à baixa concentração numa das fases, pode ser obtido pela Eq. 1:

$$\Gamma = n / A \quad \text{Eq. 1}$$

Em que n é o número de mols da espécie adsorvida e A é a área total da superfície. Por vezes o excesso de massa superficial (Γ_m) é reportado, em que n na Eq. 1 é substituído pela massa do componente adsorvido, m . Outra medida da quantidade do adsorvente em isotermas de adsorção é o **recobrimento da superfície** (θ). Ele é uma proporção da quantidade adsorvida (Γ) em uma dada condição em relação ao esperado (ou observado) para uma **monocamada** (Γ_s), como descrito pela Eq. 2:

$$\theta = \Gamma / \Gamma_s \quad \text{Eq. 2}$$

Uma adsorção de monocamada ocorre quando todas as espécies adsorvidas estão em contato com o adsorvente, a monocamada sendo formada quando todos os sítios disponíveis para a adsorção estão ocupados com o adsorbato. Este ponto pode ser chamado de saturação,

quando $\Gamma = \Gamma_s$, e conseqüentemente $\theta = 1$. A Eq. 2 é igualmente válida para multicamadas. Quando a adsorção não ocorre em sítios específicos e qualquer região do adsorvente pode ser ocupada com o adsorbato, o recobrimento da saturação é equivalente a $(a \cdot N_A)^{-1}$, em que a equivale a área de contato do adsorbato e N_A é o número de Avogadro. O recobrimento da superfície pode ser relacionado, portanto, com o excesso superficial:

$$\Gamma = \frac{\theta}{aN_A} \quad \text{Eq. 3}$$

Uma vez que a relação entre Γ_m e Γ é $\Gamma = \Gamma_m/M$, em que M é a massa molar da espécie adsorvida, a Eq. 3 pode ser rearranjada para relacionar Γ_m com θ :

$$\Gamma_m = \frac{M\theta}{aN_A} \quad \text{Eq. 4}$$

1.4.2 - Isotermas de adsorção

Os primeiros modelos para isotermas de adsorção tiveram como foco a interface sólido-gás. Um dos mais famosos é o de Irving Langmuir [112–114], deduzido a partir de argumentos cinéticos, no qual se assume que:

- 1) as partículas do adsorbato não interagem entre si (ou no limite em que as interações com o adsorvente são muito mais favoráveis);
- 2) a superfície é idealmente plana;
- 3) a energia de interação adsorvente-adsorbato apresenta um único valor (homogênea);
- 4) não há formação de multicamadas;
- 5) a adsorção é reversível;
- 6) a adsorção ocorre em sítios específicos.

A equação que relaciona a pressão do adsorbato na fase gasosa (p) com o recobrimento é:

$$\theta = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad \text{Eq. 5}$$

Em que K é a razão entre a constante de equilíbrio da reação (de adsorção) e a pressão padrão p^0 [115]. Como equilíbrio implica reversibilidade, a isoterma de Langmuir é reversível, ou seja, o aumento da pressão eleva o recobrimento até um patamar, mas a diminuição da pressão também permite a desorção completa do adsorbato.

Outras isotermas foram propostas, para superfícies heterogêneas como a de Temkin [116], para adsorbatos interagentes como a de Frumkin/Fowler [117, 118] e para multicamadas como a isoterma BET [119].

Como a aplicação da termodinâmica estatística para a obtenção de isotermas pode se valer do uso da aproximação de um solvente primitivo (não-estruturado), a princípio as isotermas deduzidas desta forma para interface sólido-gás – como as de Langmuir [120, 121], Temkin [122] e Frumkin/Fowler [118, 121] – podem ser empregadas para interfaces sólido-líquido, substituindo a pressão do adsorbato pela sua concentração (em soluções diluídas) [123].

Além da mudança de p para a concentração do adsorbato, $[A]_0$, as isotermas de adsorção em soluções aquosas possuem outro fator que as diferencia das isotermas em fase gasosa, pois a atividade do solvente (a_s) deve ser considerada. Neste caso a isoterma de Langmuir, por exemplo, seria:

$$\theta = \frac{K'[A]_0}{1 + K'[A]_0} \quad \text{Eq. 6}$$

Em que $K' = (a_s)^{-1} \exp(-\Delta_{ads}\mu/RT)$, sendo $\Delta_{ads}\mu$ o potencial químico de adsorção, R a constante dos gases ideais e T a temperatura.

Para que isotermas deduzidas para interfaces sólido-gás sejam aplicadas em interfaces sólido-solução, o tamanho do adsorbato deve ser equivalente ao do solvente, caso contrário as isotermas precisam ser modificadas [124–126]. Esta implementação a princípio é necessária em se tratando da adsorção de proteínas [127].

1.4.3 - Aplicação em adsorção de proteínas

Dentre as informações mais relevantes que podem ser obtidas das isotermas de adsorção de proteínas estão pistas sobre mecanismos de adsorção, a densidade superficial de saturação, e em alguns casos a energia livre do processo [128].

As curvas de recobrimento vs. concentração de macromoléculas, inclusive proteínas, frequentemente são isotermas de alta afinidade [37], uma vez que polímeros podem adquirir muitas conformações estáveis [129]. Neste tipo de curva a quantidade adsorvida é elevada mesmo para baixas concentrações de proteína em solução. Deste modo a isoterma apresenta uma elevação íngreme seguida de um plateau, ponto em que a superfície está saturada com moléculas de proteína [130]. O quão inclinado é o início da isoterma depende da sensibilidade da técnica usada para determinar a concentração na superfície [123]. Vários exemplos deste tipo de isoterma como resultado da adsorção de proteínas são encontrados na literatura [41, 42, 44, 131]. Para proteínas “soft” este comportamento quase sempre é observado, apesar de que para proteínas compactas uma inclinação inicial finita não é uma exceção [30], como observado em adsorção de colágeno em vidro [28]. O conhecimento da densidade superficial na região do plateau permite inferir se há formação de uma ou mais camadas, ou algum tipo de orientação preferencial da proteína nestas condições, uma vez que os valores de Γ no plateau geralmente são próximos ao de uma camada compacta de moléculas lado a lado, na orientação “side-on” ou “end-on” [30, 130].

Os modelos de isoterma usualmente empregados para modelar a adsorção de proteínas são os de Langmuir e o de Freundlich [132–136], embora a isoterma de Temkin também tenha sido considerada [137, 138]. Há muita discussão em torno do emprego destas isotermas para modelar os dados e obter, a partir deles, parâmetros como energia livre de adsorção.

A isoterma de Langmuir, como descrita na seção anterior, assume certas premissas, as quais nem sempre são aceitáveis no caso da adsorção de proteínas. As interações entre proteínas não podem ser menosprezadas [30], sobretudo em elevados recobrimentos, onde a orientação pode mudar devido a moléculas vizinhas, como no fibrogênio [31, 139]. A adsorção na maior parte das superfícies não ocorre em sítios específicos, mas em posições aleatoriamente selecionadas [39], e provavelmente não envolve uma energia única, mas uma distribuição de energia [127], além de que a proteína pode adsorver em diferentes posições em função da concentração, como discutido anteriormente. As proteínas podem formar multicamadas de adsorção (se os monômeros não são solúveis no meio líquido) [39, 140] e, mais importante, a adsorção geralmente não é completamente reversível [39], possuindo uma parcela adsorvida irreversivelmente que impede um tratamento termodinâmico convencional. Deste modo, isotermas reversíveis como as apresentadas anteriormente a princípio não podem ser aplicadas em casos em que a desorção não ocorre frente à diluição da concentração de adsorbato no meio líquido. Desorção por modificação de pH, força iônica e presença de outras

proteínas são fenômenos verificados, mas desorção frente a diluição geralmente não ocorre ou ocorre numa velocidade lenta demais, na prática podendo ser desprezada [39, 43, 44].

A maioria das medidas de isotermas de adsorção podem não ser verdadeiras isotermas de equilíbrio, pois leva considerável período de tempo até que o equilíbrio da adsorção de proteínas seja atingido [130]. Neste sentido obtêm-se pseudo-isotermas e um pseudo-plateau [141]. Assumindo que se obtenha uma isoterma verdadeira, é necessário constatar a reversibilidade do processo para obtenção de $\Delta_{ads}\mu$. Para isso uma medida completa de isoterma de adsorção, ou seja, no sentido ascendente (aumentado a concentração do adsorbato) e descendente (diminuindo a concentração do adsorbato) deve ser feita. Para uma adsorção reversível as curvas ascendente e descendente devem coincidir em todos os valores de concentração [37, 142], como ilustrado na Figura 6(a). Embora reversibilidade seja comumente observada em adsorção de moléculas pequenas, a adsorção de proteínas raramente pode ser tratada como reversível, exceto para proteínas “hard” em superfícies com carga oposta a da proteína [38]. Como consequência as isotermas no sentido ascendente e descendente não coincidem, com a isoterma descendente sendo de mais alta-afinidade [43, 142], como ilustrado na Figura 6(b) para um caso extremo de adsorção sem desorção.

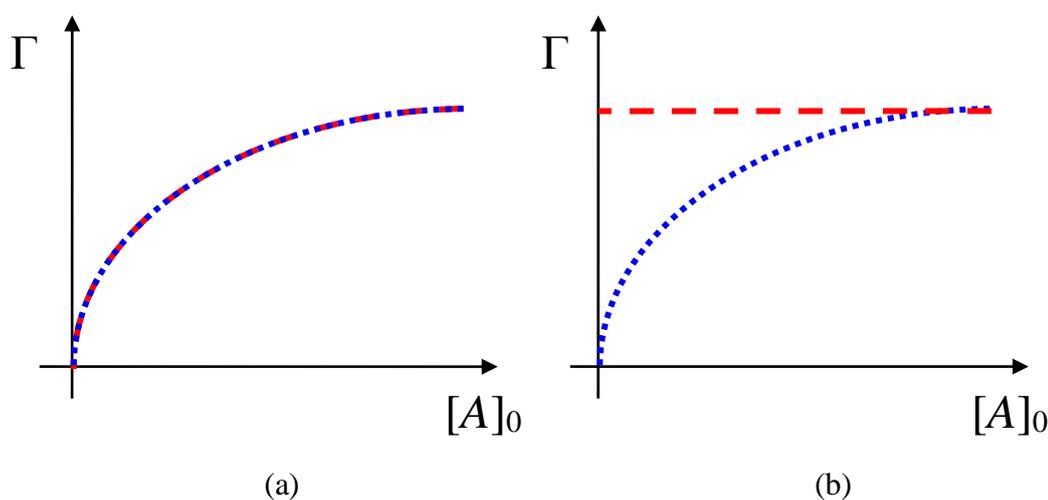


Figura 6: Isotermas de adsorção completas, ascendente (em azul) e descendente (vermelho), para um caso (a) completamente reversível e (b) completamente irreversível.

Adaptado de Norde et al. [43].

Para a obtenção da energia livre de adsorção a partir isotermas é necessário um modelo de isoterma [115, 143]. Caso seja verificada que a adsorção da proteína numa dada superfície é reversível pela medida da isoterma completa, equações como a de Langmuir (Eq. 6) podem

ser usadas [27], como procedeu Roscoe e colaboradores [136]. Caso contrário, ou obtêm-se a energia livre a partir da entalpia e da entropia de adsorção medidas por outros métodos [37] ou usa-se um modelo de isoterma que considere a adsorção ao menos em parte irreversível, seja ela derivada das leis da termodinâmica irreversível [142] ou a partir do equilíbrio dinâmico [144]. Neste último caso deduz-se a cinética de velocidade da reação de acordo com um mecanismo e resolve-se a equação para tempos infinitamente longos de adsorção [145, 146].

Apesar das ressalvas em empregar o modelo de Langmuir para sistemas irreversíveis, a Eq. 6 geralmente promove bons ajustes e pode-se associar K' não à constante de equilíbrio, mas a uma medida da afinidade relativa da proteína pela superfície [37, 130]. Interessantemente, estudos em termodinâmica estatística de não-equilíbrio mostraram que a isoterma de Langmuir pode ocorrer como resultado da associação de fenômenos difusionais e adsortivos [147].

1.5 - Cinética

1.5.1 – Adsorção de proteínas em interface sólido/líquido

Embora a adsorção a partir de soluções seja geralmente estudada em condições de equilíbrio em detrimento a estudos cinéticos [148], o inverso ocorre na adsorção de proteínas, devido à dificuldade em descrever termodinamicamente a adsorção por meio de modelos de isoterma [130, 149].

A adsorção de proteínas geralmente é descrita por mecanismos com etapas distintas. Estas etapas em geral são: 1) transporte até a superfície (pelo fluxo difusional J), 2) adsorção, 3) rearranjos estruturais, 4) desprendimento da superfície e 5) transporte para longe da mesma [27, 30, 130]. Naturalmente que certos tipos de sistemas não apresentam todos os processos, e tipicamente o que se observa é o efeito da limitação da velocidade por um ou mais destes eventos. Outras classificações não ordenam as etapas como sendo uma sequência, mas um conjunto de tipos de adsorção, em regiões onde ela pode ocorrer reversivelmente (com ou sem modificação estrutural) e outras irreversivelmente [150, 151]. De uma maneira geral os mecanismos empregados no estudo da adsorção de proteínas são variações dos apresentados na Figura 7, segundo o esquema proposto por Ramsden [39]:

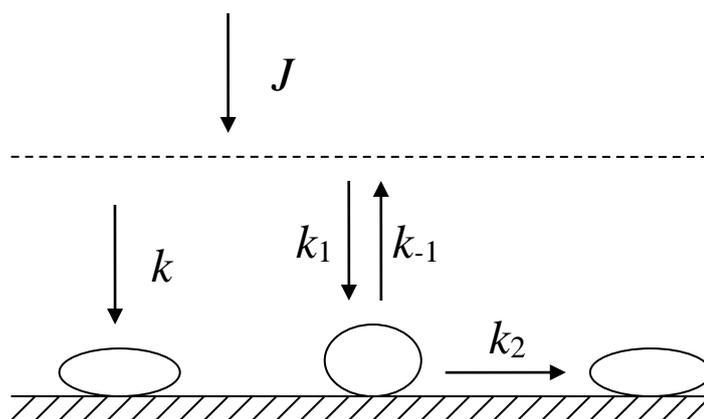


Figura 7: Esquema representando os mais freqüentes mecanismos propostos para adsorção de proteínas. Adaptado de Ramsden [39].

1.5.2 - Difusão

Um dos primeiros a propor uma equação que permitisse relacionar quantidade de material adsorvido em função do tempo t para um processo controlado por difusão foi Langmuir [152], segundo a Eq. 7:

$$\Gamma(t) = 2[A]_0 (Dt / \pi)^{1/2} \quad \text{Eq. 7}$$

Em que D é o coeficiente de difusão do adsorbato. A teoria da adsorção controlada por difusão em uma superfície plana na ausência de transporte convectivo foi formalizada por Ward e Tordai [153] (para casos onde nem toda colisão causa adsorção), e posteriormente generalizada para diferentes geometrias de superfície, com ou sem camada estagnante [148, 154].

O transporte das moléculas de proteína é controlado, nos casos mais simples, por difusão. Especialmente para baixas concentrações de proteína, observa-se que o transporte ocorre de maneira mais lenta que a adsorção em si, de modo que a Eq. 7 mostra-se aplicável, como verificado posteriormente em interfaces ar-líquido [155, 156] e sólido-líquido [28, 140, 150, 157]. No entanto, à medida que a concentração de espécies adsorvidas aumenta na superfície as interações entre as moléculas promovem um desvio desta dependência, uma vez que a velocidade da adsorção passa a ser limitada pela própria [27, 30].

A influência do controle difusional na velocidade da reação pode ser verificada a partir de um gráfico de $\Gamma(t)$ vs. $t^{1/2}$ [28], em que na região de linearidade o coeficiente angular assume o valor:

$$\left(\frac{d\Gamma(t)}{dt^{1/2}}\right)_{t \rightarrow 0} = 2[A]_0(D/\pi)^{1/2} \quad \text{Eq. 8}$$

1.5.3 - Adsorção

Vários modelos que descrevem a cinética de adsorção de proteínas foram formulados segundo mecanismos distintos, dos mais simples, como o de Langmuir [114], aos mais complexos, como os de Soderquist e Walton [158] ou o de Lundström e Elwing [151], embora se tenha uma preferência pelos modelos mais simples (com menos parâmetros) [31]. Se apenas duas formas da proteína estão envolvidas, em solução e adsorvida, pode-se descrever a cinética da reação através da equação abaixo:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_1[P]_0\Phi(\theta) - k_{-1}\theta \quad \text{Eq. 9}$$

Em que k_1 e k_{-1} são as constantes de velocidade de adsorção e desorção, respectivamente, $[P]_0$ é a concentração inicial de proteína na superfície e $\Phi(\theta)$ é uma função que descreve a área da superfície acessível para adsorção. Na adsorção em sítios específicos esta função equivale a $1 - \theta$, de modo que a Eq. 9 passa a ser:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_1[P]_0(1 - \theta) - k_{-1}\theta \quad \text{Eq. 10}$$

que foi primeiramente descrita por Langmuir [114], e que no equilíbrio ($d\theta/dt = 0$) leva a isoterma de Langmuir se $K' = k_1/k_{-1}$ (Eq. 6). Outras formas para a função $\Phi(\theta)$ foram propostas, como no modelo RSA (do inglês “*Random Sequential Adsorption*”), para o caso de adsorção em regiões aleatoriamente distribuídas na superfície e na ausência de repulsão entre as moléculas [159], ou por uma série de potências de θ cujos coeficientes dependem da natureza da adsorção e da geometria das espécies adsorvidas [160].

A adsorção de proteínas é com frequência observada e citada como sendo um fenômeno irreversível [44, 161], de modo que a quantidade de material adsorvido permanece constante, ou varia muito pouco, frente à limpeza da superfície com o solvente [151]. Neste caso $k_{-1} = 0$, e o recobrimento θ_t varia com o tempo de acordo com a Eq. 11 (resolução deste e de outros modelos cinéticos no APÊNDICE A):

$$\theta_t = 1 - e^{-k_1[P]_0 t} \quad \text{Eq. 11}$$

Este modelo simples foi empregado por Penners et al. [150], embora tenha-se verificado que k_1 apresenta uma dependência com a concentração de proteína.

Ao considerar $k_{-1} \neq 0$, alguns trabalhos empregaram a Eq. 10 para modelar a cinética de proteínas [138, 162–164], no entanto de uma maneira geral a comunidade científica considera seu formalismo inadequado para descrever o fenômeno [31]. O recobrimento é descrito neste caso por:

$$\theta_t = \frac{k_1[P]_0}{(k_1[P]_0 + k_{-1})} (1 - e^{-(k_1[P]_0 + k_{-1})t}) \quad \text{Eq. 12}$$

assumindo-se que $[P]_0$ não varia com tempo (concentração grande o suficiente para gerar um processo de pseudo-primeira ordem [138]).

Outros trabalhos mostraram que é possível considerar este tipo de cinética (de Langmuir) acrescida da contribuição do transporte difusional [165, 166]. Bornzin e Miller [150] deduziram, inclusive, a seguinte relação:

$$\Gamma_m = \Gamma_m^* \{1 - \exp[-2[P]_0 A' (Dt / \pi)^{1/2} / \Gamma_m^*]\} \quad \text{Eq. 13}$$

em que A' é a fração da superfície disponível para adsorção e Γ_m^* é a densidade superficial de saturação. Empregando-se a Eq. 4, pode-se modificar a Eq. 13 para tornar θ a variável dependente:

$$\theta = 1 - \exp(-2[P]_0 A' a N_A (Dt / \pi)^{1/2} / M) \quad \text{Eq. 14}$$

1.5.4 - Desnaturação

Foi observado experimentalmente [131, 167] e obtido teoricamente [168] que a desnaturação da proteína adsorvida poderia ser considerada um processo de primeira ordem (irreversível). Este comportamento pode ser observado por gráficos de $\log(\Gamma_s - \Gamma)$ vs. t , que mostra tendências lineares para processos de primeira ordem [169]. Se duas curvas com diferentes coeficientes angulares são detectadas, então adota-se um modelo sequencial. O

mais simples envolve uma forma de proteína em solução (P) e duas formas adsorvidas, uma pouco modificada (P_1) e outra desnaturada (P_2). Modelos sequenciais do tipo $P \xrightarrow{k_1} P_1 \xrightarrow{k_2} P_2$ foram muito empregados por Caprani et al. [170–173] e Fievet et al. [174, 175]. Neste modelo não se considera que a velocidade de formação de P_2 seja influenciada pela área disponível. Caso a desnaturação ocorra mais rapidamente numa superfície sem proteína e diminua de velocidade em altos recobrimentos, o modelo deve ser modificado, o que foi feito por Seigel et al. [146]. Modelos sequenciais com mais de três estados da proteína também foram explorados [176].

Se a adsorção é considerada, por outro lado, um processo reversível, o modelo então descreve um pré-equilíbrio entre P e P_1 e depois uma transformação irreversível de P_1 em P_2 . Este tipo de modelo foi usado em alguns trabalhos [29, 177, 178].

1.6 - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (cujas siglas em inglês são “EIS”) é uma técnica eletroquímica empregada no estudo de fenômenos interfaciais, geralmente eletrodissolução. Suas aplicações são bastante abrangentes, envolvendo desde estudos de mecanismos das reações químicas e/ou eletroquímicas que ocorrem na interface até aplicação em biosensores [179, 180]. Ela permite investigar reações de transferência de elétrons e/ou adsorção de espécies, sendo bastante utilizada em estudos de corrosão e revestimentos poliméricos. Algumas grandezas acessíveis a partir da técnica são constantes de velocidade de processos redox ou de adsorção, coeficientes de difusão e mobilidade iônica, além da constante dielétrica de um dado material [181].

O desenvolvimento da impedância em sistemas elétricos foi em grande parte devido aos trabalhos de Oliver Heaviside (1850-1925) [182]. De acordo com Bockris [183], a impedância (Z) é uma espécie de resistência generalizada, que se aplica tanto para diferenças de potencial e correntes contínuas (d.c.) quanto alternadas (a.c.). De fato, do mesmo modo que a resistência é dada pela razão entre potencial (E) e corrente (I) pela lei de Ohm, a impedância é descrita de maneira similar, porém potencial e corrente são funções periódicas descritas no domínio de Fourier:

$$Z(i\omega) = \frac{E(i\omega)}{I(i\omega)} \quad \text{Eq. 15}$$

Em que $i = (-1)^{1/2}$ e ω é a frequência angular do sinal alternado. Tanto potencial quanto corrente podem ser controlados em um experimento, embora o modo potenciostático seja mais empregado [184]. Neste caso aplica-se um potencial contínuo E_{DC} ao qual se adiciona um sinal alternado (geralmente senoidal) de baixa amplitude, E_{AC} . Observa-se a corrente de resposta do sistema e a medida é convertida em impedância pelo equipamento (de acordo com a Eq. 15). Como pode-se medir a impedância para um potencial alternado à diferentes frequências, o resultado de uma varredura em certa faixa de frequências é o que caracteriza a EIS como uma espectroscopia.

Como a impedância é um número complexo ela pode ser apresentada de diferentes maneiras. Na forma retangular ela é um ponto no espaço em que as abscissas representam a parte real (Z') e as ordenadas representam a parte imaginária (Z''), de modo que $Z = Z' + iZ''$. Na forma polar o módulo da impedância $|Z|$ faz um ângulo de fase ϕ com as abscissas. A Figura 8 mostra esquematicamente estas descrições:

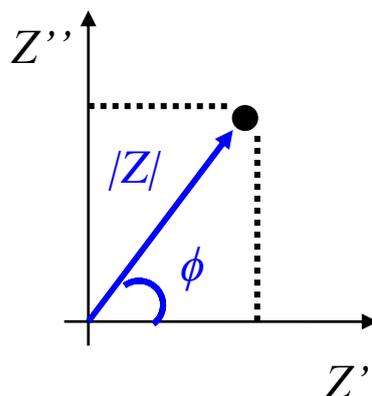


Figura 8: Representação da impedância no plano complexo pela forma retangular (cor preta) e modular (cor azul).

Pelo esquema da Figura 8 é possível obter o ângulo de fase e o módulo da impedância pelas relações $\phi = \text{tg}^{-1} [Z''/Z']$ e $|Z| = [(Z')^2 + (Z'')^2]^{1/2}$, respectivamente. Também é possível deduzir a Eq. 16:

$$Z = |Z|(\cos \phi + i \text{sen} \phi) \quad \text{Eq. 16}$$

de modo que empregando as representações em séries das funções $\text{sen} \phi$ e $\cos \phi$ obtemos a forma polar (ou modular) da impedância: $Z = |Z| \cdot e^{i\phi}$.

Há diversas formas de se construir gráficos em EIS. Um gráfico de $|Z''|$ vs. Z' é chamado de Nyquist, e é particularmente útil na análise de mecanismos de reação, mas não evidencia a frequência f no espectro ($f = \omega/2\pi$). No plano (ou gráfico) de Bode, por outro lado, a frequência figura no eixo das abscissas (em escala logarítmica), enquanto que $|\phi|$ ou $\log |Z|$ são apresentados no eixo das ordenadas. O gráfico de $|\phi|$ vs. $\log f$, por exemplo, é interessante para verificação visual da eficiência de ajustes não-lineares nos dados experimentais [179]. Outra disposição dos dados pode ser obtida plotando-se Z' ou Z'' (em escala logarítmica ou não) em função de $\log f$ (ou $\log \omega$). Este tipo de gráfico foi bastante explorado por Orazem et al. [185].

Em se tratando de sistemas eletroquímicos, a interpretação dos fenômenos que ocorrem na interface frequentemente é realizada por meio de circuitos equivalentes, que são circuitos elétricos cujo comportamento impedimétrico é análogo ao de interfaces eletroquímicas. Neste caso os parâmetros do circuito são ajustados para reproduzir de maneira mais fidedigna os dados experimentais, geralmente através de regressão não-linear [186]. Por exemplo: o circuito composto por um capacitor com capacitância C em série com um resistor de resistência R , chamado circuito RC, pode ser comparado a uma interface eletroquímica que possui uma capacitância de dupla-camada elétrica C_d e uma resistência da solução R_Ω . Este tipo de circuito é chamado de *bloqueante* ou idealmente polarizável, e é representado na Figura 9(a).

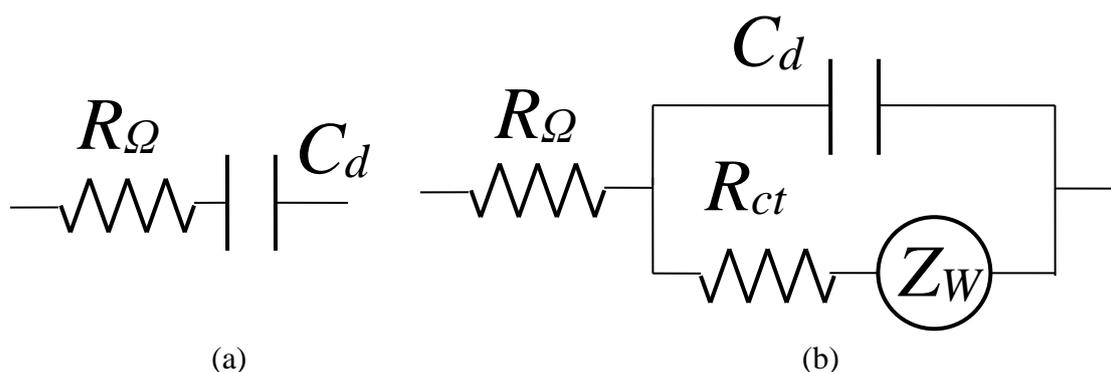


Figura 9: Circuito (a) RC, bloqueante; (b) de Randles, reativo.

A impedância no circuito RC é descrita pela Eq. 17 [182]:

$$Z(i\omega) = R + \frac{1}{i\omega C} = R - \frac{i}{\omega C} \quad \text{Eq. 17}$$

Um sistema eletroquímico que se comporta de maneira análoga a este circuito RC é caracterizado por um gráfico de Nyquist no qual os valores de impedância para todo o intervalo de frequência apresentam $Z' = R$, e a parte imaginária é inversamente proporcional à frequência segundo a relação:

$$Z'' = -\frac{1}{\omega C} \quad \text{Eq. 18}$$

Quando há transferência de carga na interface designa-se o eletrodo de *reativo* ou idealmente não-polarizável. O circuito mais simples que agrega esta característica é o de um capacitor em paralelo com uma resistência de transferência de carga R_{ct} , resultando num arco semicircular no gráfico de Nyquist. Esta resistência é tão maior quanto menor a constante de velocidade da reação redox (k^0) que o elemento de circuito representa. Em condições de baixo sobrepotencial ela pode ser obtida aplicando a Eq. 19:

$$R_{ct} = \frac{RT}{F^2 A k^0 C^*} \quad \text{Eq. 19}$$

em que C^* é a concentração dos íons envolvidos no processo de transferência de elétrons na interface e F equivale à constante de Faraday. A razão F/RT permite associação entre concentrações de íons e voltagens. Para uma temperatura de 25 °C seu valor é $96485,4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}/(8,3145 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1} \times 298,16 \text{ K}) = 38,920 \text{ C}\cdot\text{J}^{-1}$. Como k^0 é uma constante de velocidade, é proporcional $\exp[-E_a/RT]$ (sendo E_a a energia de ativação), de modo que R_{ct} é diretamente proporcional à $\exp[E_a/RT]$.

É possível demonstrar que o transporte de massa das espécies eletroativas pode levar a um tipo de impedância particular, que para superfícies planas e difusão semi-infinita é chamada de impedância de Warburg (Z_W). Ela é um dos componentes do conhecido circuito de Randles [187], representado na Figura 9(b), que é usado para descrever reações eletroquímicas elementares de primeira ordem com E_{AC} em torno do potencial de Nernst [188].

Na maioria dos casos a capacitância de interfaces eletroquímicas não se comporta como a de um capacitor elétrico ideal, apresentando o que ficou conhecido como “dispersão na capacitância”. Para descrever este comportamento o capacitor do circuito da Figura 9(a), por

exemplo, é substituído por um Elemento de Fase Constante (cuja sigla em inglês é CPE, mas também pode ser abreviado por Q), cuja impedância é descrita pela Eq. 20:

$$Z(i\omega) = R + \frac{1}{(i\omega)^\alpha Q} \quad \text{Eq. 20}$$

em que α e Q (em $F \cdot s^{-(1-\alpha)}$) são constantes. Para $\alpha = 1$, Q equivale à capacitância, uma vez que a Eq. 20 é convertida na Eq. 17. Nos gráficos de Nyquist para circuitos RC as medidas de impedância possuem o formato de uma reta paralela a $|Z''|$, cruzando as abscissas em $Z' = R$. Na presença de uma dispersão na capacitância esta reta apresenta uma inclinação tão maior quanto menor é o valor de α , formando um ângulo menor que 90° com o eixo x . Este comportamento pode ser observado na Figura 10:

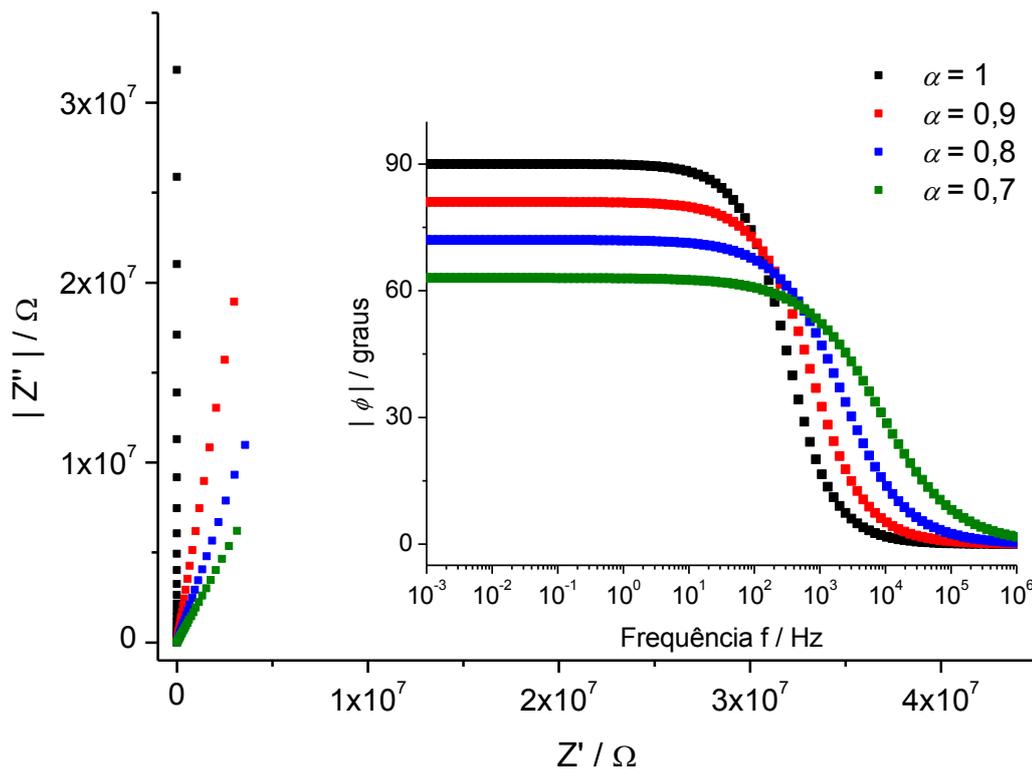


Figura 10: Gráficos de Nyquist e Bode (figura menor) com dados simulados para circuito RQ onde $R_\Omega = 100 \Omega$, $Q = 5 \times 10^{-6} F \cdot s^{-(1-\alpha)}$ e $\alpha = 1; 0,9; 0,8$ e $0,7$.

O ângulo formado com as abscissas equivale a $90^\circ\alpha$, que é o valor para qual tende o ângulo de fase em frequências baixas no gráfico de Bode (onde a impedância do CPE

domina). O gráfico de Bode em detalhe na Figura 10 mostra esta tendência para diferentes valores de α . Na prática $0,7 \leq \alpha \leq 0,9$ [189].

Em se tratando do circuito de Randles, a dispersão da capacitância resulta num abaixamento do arco referente à resistência de transferência de carga no gráfico de Nyquist, como pode ser observado na Figura 11.

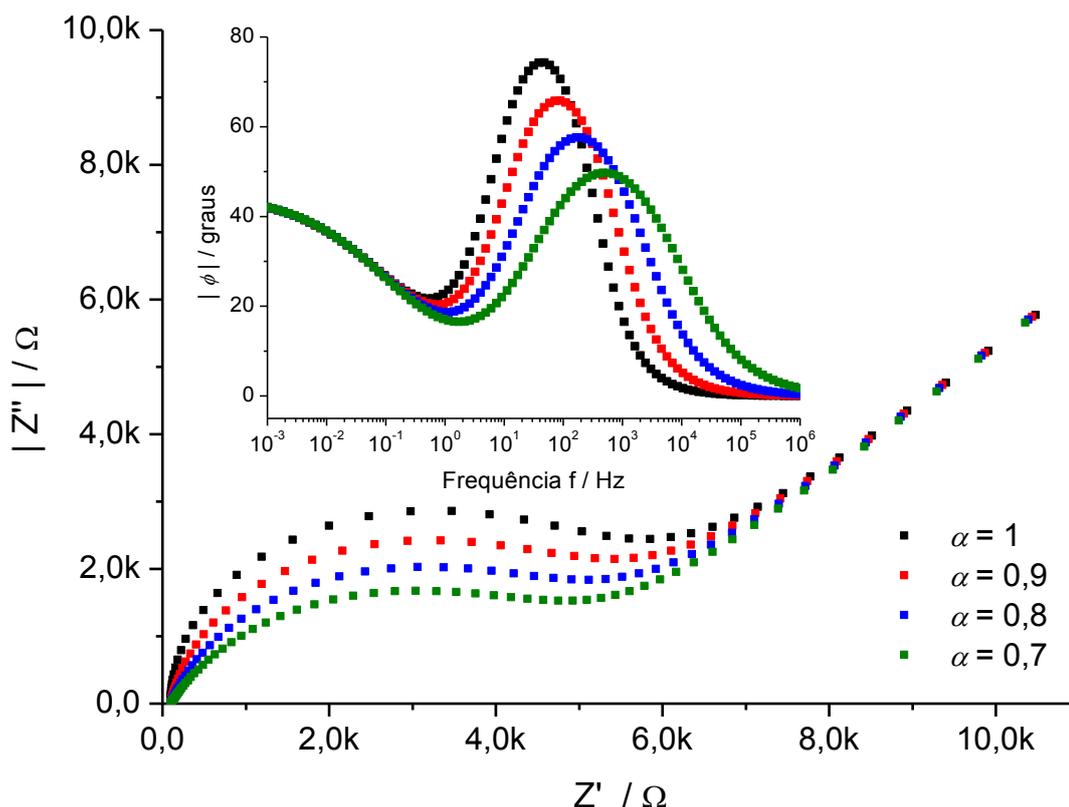


Figura 11: Gráficos de Nyquist e Bode (figura menor) com dados simulados para circuito de Randles, com $R_{\Omega} = 100 \Omega$, $R_{ct} = 5 \text{ k}\Omega$, $Q = 5 \times 10^{-6} \text{ F}\cdot\text{s}^{-(1-\alpha)}$, $\sigma = 2 \cdot 10^{-4} \text{ F}\cdot\text{s}^{-1/2}$ e $\alpha = 1; 0,9; 0,8$ e $0,7$.

Neste caso, em baixas frequências a impedância de Warburg domina a impedância resultante, levando a uma tendência única para diferentes valores de α . No gráfico de Nyquist a presença do elemento de Warburg se reflete no comportamento linear em baixas frequências, formando um ângulo de 45° com as abscissas. Este comportamento é devido ao fato da impedância de Warburg possuir parte real e imaginária equivalentes:

$$Z_w = \sigma\omega^{-1/2} - i\sigma\omega^{-1/2}$$

Eq. 21

Em que σ é o coeficiente de transferência de massa, em $F \cdot s^{-1/2}$.

Em resumo, caso haja dispersão na capacitância, o ajuste não-linear dos dados experimentais para obtenção dos parâmetros precisa ser feito considerando os circuitos representados na Figura 12, e não os circuitos da Figura 9:

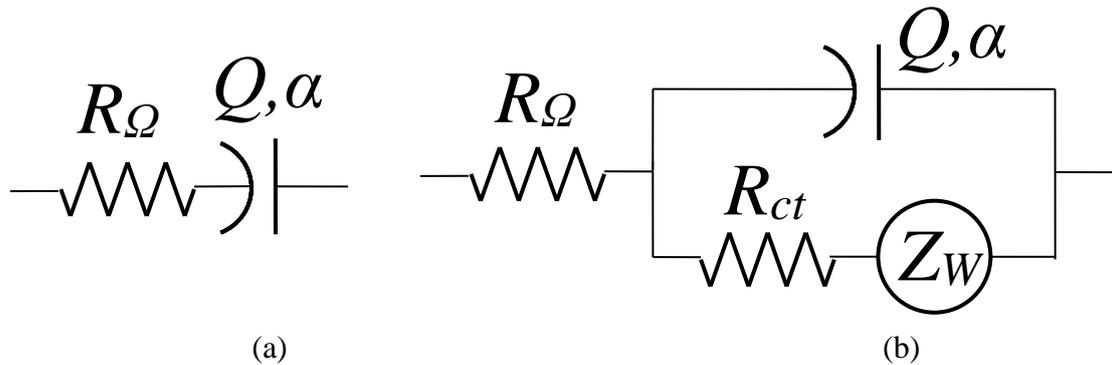


Figura 12: Circuito (a) RQ e (b) de Randles com dispersão na capacitância.

Uma alternativa ao ajuste não-linear para a obtenção de parâmetros de elementos do circuito é a análise gráfica. Neste caso os dados originais são plotados de maneira a gerar os parâmetros de elementos individuais do circuito em determinadas faixas de frequência. Orazem et al. [185] desenvolveram métodos gráficos para determinação de α e Q em eletrodos bloqueantes e reativos. O valor de Q , por exemplo, pode ser adquirido empregando-se a Eq. 22, deduzida da Eq. 16 e sabendo-se que $|Z| = [Q(\omega)^\alpha]^{-1}$ e $\phi = \pi\alpha/2$:

$$Q = \frac{-1}{Z'' \omega^\alpha} \operatorname{sen} \left(\frac{\pi\alpha}{2} \right) \quad \text{Eq. 22}$$

De modo que quando $\alpha = 1$, a Eq. 22 se converte na Eq. 18. Para obter o valor de α basta extrair o logaritmo dos dois lados da Eq. 22, verificando-se que $-\alpha = d \log |Z''| / d \log \omega$. Ou seja, extrai-se a constante do coeficiente angular de um modelo linear ajustado num gráfico de $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$.

O significado físico-químico do α tem sido muito discutido ao longo dos anos. Uma das abordagens mais conhecidas é a de Brug et al. [190], que sugere que a dispersão na capacitância pode ser interpretada em termos de uma distribuição de tempos de relaxação $\tau = RC$ de circuitos RC em paralelo. Considerando-se que a distribuição era devida a dispersão na capacitância foi possível deduzir equações para a capacitância “esperada” C_0 em eletrodos bloqueantes:

$$C_0 = [Q(R_\Omega)^{1-\alpha}]^{1/\alpha} \quad \text{Eq. 23}$$

e reativos:

$$C_0 = [Q(R_\Omega^{-1} + R_{ct}^{-1})^{\alpha-1}]^{1/\alpha} \quad \text{Eq. 24}$$

A validade do modelo tem sido verificada em diversos sistemas, sobretudo por ser suportada em argumentos abrangentes [191–193]. Similarmente ao desvio padrão de uma distribuição normal, a distribuição log-normal dos tempos de relaxação usada pelos pesquisadores é mais dispersa para menores valores de α , em torno de um valor relacionado às capacitâncias calculadas pelas equações 23 e 24.

Posteriormente L. Nyikos e T. Pajkossy [194], em grande discordância com Brug et al. [190], desenvolveram um modelo no qual a dispersão é causada assumidamente por um acoplamento entre a resistência da solução e da capacitância de dupla camada provocada pela rugosidade, esta podendo ser modelada por geometria fractal segundo conhecidas leis de escala, independentemente do formato da irregularidade. Os autores deduziram uma fórmula que relaciona α com a dimensão fractal da superfície, parâmetro que aumenta de 2 (superfícies planas) para um máximo de 3 quando a rugosidade é muito grande. Eles admitiram, porém, que outros fatores poderiam influenciar na dispersão.

L. Nyikos e T. Pajkossy tentaram provar sua equação através de eletrodos montados em forma de arranjos fractais (curvas de von Koch) de diferentes dimensões [195], e compararam os valores de α esperados para estas dimensões com os obtidos via impedância. Os resultados segundo os autores demonstraram a eficácia de seu modelo, mas não sem discordâncias da comunidade científica [196–198]. Alguns experimentos em diversas superfícies sólidas cujas medidas de dimensão fractal foram realizadas independentemente das medidas de impedância mostraram não haver aparente correlação entre dimensão fractal e o valor de α [199]. Críticas a respeito deste último experimento também foram feitas por Levie [200], um dos primeiros a desenvolver modelos que associam a rugosidade com o valor de α [201]. No entanto simulações mostram que efeitos de fractalidade só poderiam ser visualizados em elevadas frequências [202, 203].

Tamás Pajkossy [204], em uma ampla discussão, mostra que apesar da rugosidade e a dispersão da capacitância estarem relacionadas, isso não ocorre como se ambos fossem

diretamente proporcionais em quaisquer ocasiões. Realizando alguns experimentos ele preparou eletrodos de platina rugosos com baixa dispersão. Ele também ressalta o papel da adsorção no aumento da dispersão, a partir de uma revisão de trabalhos anteriores e medidas próprias com adsorção de íons cloreto e sulfato, e formula a hipótese de que este efeito é maior em superfícies menos homogêneas. Em um trabalho mais recente ele reúne alguns dos resultados que obteve até o momento e conclui que a dispersão é causada pela inhomogeneidade energética da superfície, que pode ser provocada pela rugosidade, e não pela dimensionalidade em si [205].

1.6.1 - Aplicações em adsorção de proteínas

De uma maneira geral dois parâmetros eletroquímicos têm sido empregados para medir, direta ou indiretamente, o recobrimento de proteínas em eletrodos sólidos: *capacitância* e *resistência*, sendo o primeiro mais tradicional, uma vez que a obtenção da capacitância foi uma das primeiras aplicações da EIS [206, 207]. Em estudos de adsorção de proteínas ela geralmente é obtida de maneira aproximada a partir da parte imaginária da impedância, segundo a Eq. 18 [136, 138, 170, 171, 174–176, 208] usualmente em estudos de cinética de adsorção.

No estudo da adsorção de moléculas orgânicas neutras, Frumkin propôs, em 1926 [117], um modelo baseado em capacitores em paralelo. Deste modelo a seguinte relação pode ser deduzida [209, 210]:

$$q_{\theta} = q_{\theta=0}(1-\theta) + q_{\theta=1}\theta = q_{\theta=0} + \theta(q_{\theta=1} - q_{\theta=0}) \quad \text{Eq. 25}$$

em que q_{θ} é a carga do eletrodo para um dado recobrimento, sendo $q_{\theta=0}$ e $q_{\theta=1}$ as cargas do eletrodo para $\theta = 0$ e 1, respectivamente. Derivando a Eq. 25 com relação ao potencial e sabendo que a capacitância $C_i = dq_i/dE$, obtemos a Eq. 26:

$$\theta = \frac{C_{\theta=0} - C_{\theta} - (q_{\theta=1} - q_{\theta=0}) \frac{d\theta}{dE}}{C_{\theta=0} - C_{\theta=1}} \quad \text{Eq. 26}$$

Que para $d\theta/dE \sim 0$ resulta na Eq. 27:

$$\theta = \frac{C_{\theta=0} - C_{\theta}}{C_{\theta=0} - C_{\theta=1}} \quad \text{Eq. 27}$$

Esta condição é válida se a janela de potencial observada não promove desorção, como em torno do PZC [211, 212]. A Eq. 27 foi largamente empregada no estudo da adsorção de proteínas [136, 138, 171, 172, 208, 213], e uma outra maneira de deduzi-la é apresentada no ANEXO A.

Alguns trabalhos acompanham a adsorção de proteínas a partir da variação da capacitância (ΔC) relativa ao valor apresentado pela superfície isenta de adsorbato [50, 171, 214, 215], ou seja, através da Eq. 28:

$$\Delta C = \frac{|C_{\theta=0} - C_{\theta}| \cdot 100\%}{C_{\theta=0}} \quad \text{Eq. 28}$$

É argumentado na literatura que ΔC é na verdade uma medida aproximada do recobrimento no caso em que $C_{\theta=0} \gg C_{\theta=1}$ [172, 174, 175], embora alguns pesquisadores mostrem-se contrários a este argumento [216], ressaltando que a variação percentual da capacitância está relacionada com θ , mas não é uma medida do mesmo.

A capacitância após a formação de uma monocamada pode ser grosseiramente estimada através do modelo de Helmholtz, segundo a Eq. 29 [170, 174]:

$$C_{\theta=1} = \frac{A \varepsilon_p \varepsilon_0}{d} \quad \text{Eq. 29}$$

Em que ε_p e ε_0 são a constante dielétrica da proteína e a permissividade no vácuo ($8,85 \times 10^{-12}$ F·m⁻¹), respectivamente, e d é a espessura da camada de proteína.

O recobrimento pode ser obtido também a partir das resistências de transferência de carga para um par redox usado como sonda antes e depois da adsorção, $R_{\theta=0}$ e R_{θ} , segundo a Eq. 30:

$$\theta = 1 - \frac{R_{\theta=0}}{R_{\theta}} \quad \text{Eq. 30}$$

Esta equação foi obtida no estudo da formação de monocamadas automontadas [217–219], e posteriormente empregada em adsorção de proteínas [24]. A demonstração que apresentamos no ANEXO B mostra que de fato ela pode ser empregada de maneira geral para adsorção, considerando algumas aproximações. Maneiras alternativas de se estudar a adsorção de proteínas pela resistência de transferência de carga foram empregadas, como pela variação relativa à $R_{\theta=0}$ [220–222] ou através da interferência da adsorção em reações paralelas (levando a uma diminuição da resistência com o aumento da concentração de proteína adsorvida) [136, 223, 224].

1.7 - Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo principal o estudo da adsorção da apocanavalina A em eletrodo de carbono vítreo através da espectroscopia de impedância eletroquímica. Pela quantificação indireta do adsorbato por medidas de capacitância e resistência de transferência de carga, pretende-se estudar os aspectos cinéticos da adsorção. Tem-se como objetivo também estudar os efeitos de pré-tratamentos (sobretudo oxidativos) na superfície e na adsorção, bem como o efeito do potencial elétrico (vs. Ag/AgCl) aplicado durante e depois da adsorção.

2 - Procedimento experimental

2.1 – Soluções

Todas as soluções foram preparadas usando água Milli-Q (resistividade 18,2 M Ω ·cm), também empregada nos procedimentos de limpeza. Soluções de NaCl (Vetec) foram empregadas como eletrólito de suporte. Concanavalina A (Sigma-Aldrich, Tipo IV) foi utilizada sem purificação prévia no preparo de soluções em eletrólito. K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆].3H₂O (Vetec) foram empregados no preparo de soluções em KNO₃ (Nuclear) (seção 3.2) ou NaCl (seção 3.3), sendo utilizados na verificação da eficácia dos procedimentos de limpeza e na detecção indireta de concanavalina A adsorvida (seção 3.3). Utilizou-se H₂SO₄ 98% (F. Maia) no preparo de soluções empregadas no procedimento de limpeza e ativação eletroquímica. Para o teste de atividade da concanavalina A (seção 3.1) soluções foram preparadas a partir de CaCl₂.2H₂O (Merck) e MnCl₂.4H₂O (Carlo Erba). Neste experimento também foi empregada solução de glicogênio (Sigma-Aldrich, Tipo II).

2.2 – Aparelhagem

Para o preparo das soluções empregou-se uma balança analítica Sartorius BL210S (precisão $\pm 0,1$ mg), e a água Milli-Q foi obtida por meio de um sistema de purificação da Millipore, modelo Milli-Q Plus. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas com o potenciostato Gamry (potenciostato/galvanostato/ZRA referência 600TM) com as células mantidas numa gaiola de Faraday (Gamry Vista Shield). No tratamento do eletrodo valeu-se de um ultra-som Unique Ultrasonic Clean, modelo USC-800. Para estudar atividade da concanavalina A o ensaio turbidimétrico com glicogênio e proteína ativada, descrito na seção 2.4.1 e discutido na seção 3.1, foi realizado num espectrofotômetro FEMTO 700 Plus. O pH foi medido empregando um pHmetro Quimis, modelo Q-400MT.

2.3 – Células e eletrodos

Três tipos de celas foram utilizados para diferentes finalidades nos experimentos descritos adiante. Para limpeza e ativação do eletrodo empregou-se uma cela de vidro de um compartimento com tampa de teflon, onde foram realizadas medidas de voltametria cíclica e cronoamperometria. As medidas de impedância foram realizadas em uma célula eletroquímica

de vidro com dois compartimentos cilíndricos, um com menor raio para o eletrodo de referência (RE) e o com maior raio para os eletrodos de trabalho (WE) e auxiliar (CE). As células são armazenadas em H_2SO_4 quando não empregadas nos experimentos, o que é especialmente importante para eliminar traços de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ou $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ verificáveis nas medidas de impedância. Nestes dois tipos de célula foi usado um eletrodo de carbono vítreo (BAS, 3 mm de diâmetro) como WE, um fio de ouro como CE e Ag/AgCl em KCl saturado como RE, para o qual todos os potenciais medidos são referidos.

Para executar a adsorção de conA conduzida a um potencial aplicado fixo executamos uma cronoamperometria em eppendorf, empregando o mesmo WE, mas um fio de ouro espiralado como CE e um RE de Ag/AgCl em KCl saturado fora do eppendorf, mas conectado a ele por um capilar ligado a uma seringa preenchida com NaCl 0,15 M (no qual o RE é mantido submerso em sistema fechado por diafragma). Uma representação esquemática deste sistema é apresentada na Figura 13:

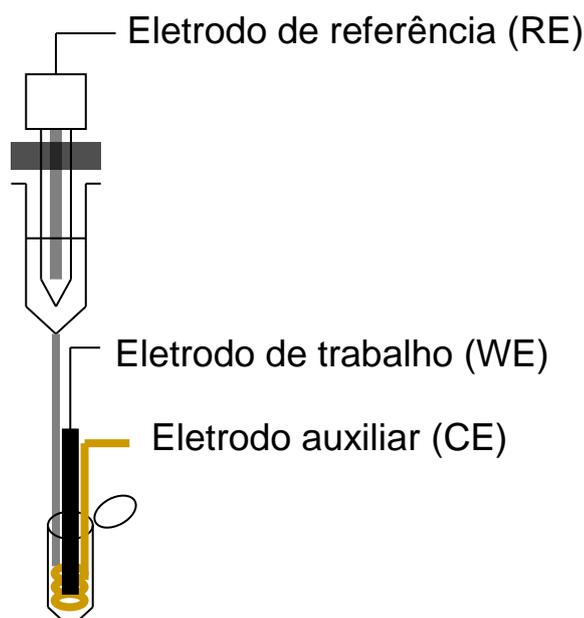


Figura 13: Esquema representando a célula na qual a adsorção de conA foi conduzida ao mesmo tempo em que um determinado potencial constante é aplicado via cronoamperometria.

2.4 - Experimentos

2.4.1 – Atividade da Concanavalina A

Para verificar a atividade da concanavalina A preparou-se uma solução $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ da proteína em $\text{Ca}^{2+}(\text{aq})$ e $\text{Mn}^{2+}(\text{aq})$ a 3 mM e $\text{NaCl } 0,15 \text{ M}$. A 1 mL desta solução adicionou-se 1 mL de glicogênio $0,12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ numa cubeta de caminho ótico de 1 cm , e a reação entre a concanavalina A e polissacarídeo foi monitorada pela observação da absorbância em 460 nm num espectrofotômetro. Acompanhou-se o processo em intervalos de 30 segundos por 1 hora , e após o mesmo período mediu-se novamente a absorbância 1 vez para verificar a diferença entre esta e a última medida (para garantir a proximidade do equilíbrio).

2.4.2 – Experimentos para medida de capacitância

O procedimento de limpeza do eletrodo de trabalho consiste nas seguintes etapas:

1) Lava-se o WE com água Milli-Q por 10 segundos , seguido de polimento em pano com alumina $1 \mu\text{m}$ por 3 minutos , e posteriormente lava-se por 10 segundos ;

2) O eletrodo é submergido em 50 mL de água Milli-Q em béquer de 100 mL , submetendo-se o sistema à ultra-som por 7 minutos , ao fim do qual se lava o eletrodo por 10 segundos ;

3) Suspende-se o eletrodo em H_2SO_4 98% (concentrado) por 5 minutos , lavando-se intensamente o eletrodo por 10 segundos ao fim deste período;

4) Antes de finalizar a etapa 3) uma célula de um compartimento é montada com H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$ e os eletrodos auxiliar e de referência são submersos após lavados intensamente por 10 e 20 segundos , respectivamente;

5) O sistema com os três eletrodos é montado na célula de um compartimento, que é fechada com tampa de teflon para as medidas posteriores;

6) Uma voltametria cíclica numa janela de $0,9$ à $-0,2 \text{ V}$ é realizada por 50 ciclos à $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e tamanho do passo de $0,5 \text{ mV}$. Este tipo de varredura para uma dada janela de potencial será descrito de maneira simplificada como $0,9 \rightarrow -0,2 \rightarrow 0,9 \text{ V}$;

7) Os eletrodos são retirados do sistema e lavados por 10 - 20 segundos , com especial cuidado com o eletrodo de referência, que pode reter ácido no Vycor. Numa cela de dois compartimentos uma voltametria cíclica de $0,8 \rightarrow -0,12 \rightarrow 0,8 \text{ V}$ em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 4 mM / KNO_3 $0,5 \text{ M}$ é realizada com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ por 2 ciclos. Caso a

diferença de potenciais de pico seja menor que 65 mV dá-se continuidade aos procedimentos, caso contrário o procedimento de limpeza é repetido;

8) Os eletrodos e célula de dois compartimentos são lavados, esta última com ácido sulfúrico e água, e medidas de EIS são realizadas em NaCl 0,15 M com frequências entre 10^{-1} e 10^5 Hz, num potencial E_{AC} de amplitude 5 mV à diferentes potenciais E_{DC} , entre 200 e 800 mV. Os ensaios a diferentes potenciais são realizados aleatoriamente;

9) Após adquirir-se os espectros de impedância à diferentes E_{DC} , os eletrodos são retirados da célula (e lavados), o de trabalho sendo lavado por 10 segundos e submerso em 750 μ L de conA 0,8 mg·mL⁻¹ por 40 minutos, ao fim do qual é lavado por 5 segundos e inserido na célula de dois compartimentos para medidas de impedância em diferentes E_{DC} , da mesma maneira que em 8).

2.4.3 – Experimentos para medida de R_{ct}

O procedimento de limpeza dos eletrodos é o mesmo descrito na seção 2.4.2 entre 1) e 6). Nos primeiros experimentos descritos na seção 3.3.1 não houve oxidação intensa do eletrodo, procedendo-se da seguinte maneira:

7A) Obtêm-se uma voltametria cíclica em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em NaCl 0,15 M numa cela de dois compartimentos, com os mesmos RE e CE (lavados com Milli-Q), no sentido 0,8 \rightarrow -0,12 \rightarrow 0,8 V (velocidade de 50 mV·s⁻¹, dois ciclos). Esta não é mais só para verificar a eficácia da limpeza do eletrodo, mas também fornece parâmetros que serão utilizados posteriormente;

8A) Sob as mesmas condições é realizada uma medida de impedância na mesma solução, com frequências entre 10^{-1} a 10^5 Hz com E_{AC} de amplitude 5 mV e $E_{DC} = E_{OCP}$ (potencial de circuito aberto);

9A) Os eletrodos são retirados e lavados com água Milli-Q, e o WE é imerso em 750 μ L de uma solução de proteína (entre 0,01 e 0,5 mg·mL⁻¹ em NaCl 0,15 M) por 5 minutos, depois retirado e lavado com água Milli-Q por 5 segundos;

10A) Medidas de impedância segundo 8A) e de voltametria cíclica segundo 7A) são realizadas.

Na mesma seção 3.3.1 são apresentados resultados para adsorção em uma concentração fixa de conA, mas variando-se o tratamento do eletrodo. Este tratamento envolve oxidação da superfície, e neste caso repetiu-se os procedimentos de 1) a 5) descritos na seção 2.4.2, prosseguindo-se então da seguinte maneira:

6B) Uma ciclagem do eletrodo em cela de um compartimento em H_2SO_4 0,5 M (200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 50 ciclos) numa dada janela de potencial, dependendo do tratamento testado. Em seguida uma cronoamperometria num potencial fixo por um determinado tempo é executada. Os parâmetros para estes ensaios são especificados para as Condições 1 a 4, descritas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Tratamentos prévios do GCE anteriores à adsorção em conA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 5 minutos

Tratamento	Ciclagem	Pós-condicionamento (cronoamperometria)
Condição 1 (C1)	$0,9 \rightarrow -0,2 \rightarrow 0,9 \text{ V}$	Sem
Condição 2 (C2)	$1,5 \rightarrow -0,2 \rightarrow 1,5 \text{ V}$	Sem
Condição 3 (C3)	$1,5 \rightarrow -0,2 \rightarrow 1,5 \text{ V}$	5 minutos em 1,1 V
Condição 4 (C4)	$1,5 \rightarrow -0,2 \rightarrow 1,5 \text{ V}$	10 minutos em 1,1 V

7B) Obtêm-se uma voltametria cíclica em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1 mM em NaCl 0,15 M numa cela de dois compartimentos, com os mesmos RE e CE (lavados com Milli-Q por 20 e 10 s, respectivamente), num único ciclo $0,5 \text{ V} \rightarrow -0,12 \rightarrow 0,5 \text{ V}$ ($50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$);

8B) Na mesma célula é realizada uma medida de impedância de 10^{-1} a 10^5 Hz com E_{AC} de amplitude 5 mV e $E_{DC} = 270 \text{ mV} \sim E_{OCP}$, com um pré-condicionamento em 270 mV;

9B) Os eletrodos são retirados e lavados com água Milli-Q, e o WE é imerso em 1 mL de solução de conA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (em NaCl 0,15 M) por 5 minutos, depois retirado e lavado por 5 segundos;

10B) Medidas de impedância segundo 8B) e de voltametria cíclica segundo 7B) são realizadas nesta ordem.

Um dos procedimentos, C3, foi escolhido para dar continuidade aos estudos da adsorção da conA em GCE, pelas razões descritas na seção 3.3.1. Os diferentes experimentos realizados posteriormente envolveram variações deste procedimento, e são resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Tratamentos do GCE antes da adsorção em conA

Experimento	Seção	Modificação em C3
Verificar desorção	3.3.1	Após deixar eletrodo em solução de conA 0,1 mg·mL ⁻¹ (ou em NaCl 0,15 M) por 5 minutos, medidas seqüenciais de impedância e voltametria são feitas, uma após a outra
Pseudo-isoterma	3.3.2	Adsorção por 10 minutos em conA em diferentes concentrações: 0 (branco); 0,01; 0,03; 0,05; 0,1 e 0,2 mg·mL ⁻¹
Medidas de cinética	3.3.3	Adsorção é feita submergindo o eletrodo por diferentes intervalos de tempo em conA 0,01 mg·mL ⁻¹ (em NaCl 0,15 M): 10; 30; 60; 300 e 600 segundos
Variando potencial após adsorção	3.3.4	Após 6B), medidas de impedância para diferentes E_{DC} , entre 200 e 800 mV, são realizadas em NaCl 0,15 M (não há etapa de adsorção)
Variando potencial no decorrer da adsorção	3.3.5	O GCE é submerso em conA 0,1 mg·mL ⁻¹ / NaCl 0,15 M ou em NaCl 0,15 M (branco) por 10 minutos, simultaneamente com a aplicação de algum potencial constante via cronoamperometria: 0; 200; 500; 800 e 1100 mV

2.5 – Cálculos eletrostáticos e modelagens

Para o cálculo da carga da conA em diferentes pH's empregamos o programa PROPKA [225], que a partir das interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos e vizinhos permite o cálculo do pKa dos resíduos ionizáveis e, portanto, o estado de protonação em diferentes pH's. As coordenadas atômicas para a conA desmetalizada “unlocked” obtidas por Boukaert et al. [2], cujo conteúdo pode ser acessado no servidor do PDB [35], não apresenta hidrogênios precisamente localizados na sua estrutura. A adição destes hidrogênios, carga, raio de van der Waals a partir do arquivo .pdb foi realizada empregando o servidor do PDB2PQR [226]. Deste procedimento um arquivo .pqr é gerado, e ele foi utilizado para calcular a distribuição de potencial eletrostático na proteína por meio do APBS [49], que

resolve numericamente a equação linearizada de Poisson-Boltzmann [48]. A visualização do perfil de potencial eletrostático da proteína, bem como das coordenadas atômicas da mesma, foi possível por meio do software VMD [3].

Os ajustes de modelos lineares e não-lineares aos dados obtidos foram realizados empregando o programa OriginPro 8 SR0 (v8.0724). Para o primeiro caso, o ajuste ótimo é obtido pela minimização dos quadrados dos resíduos (solução exata), e no segundo o melhor ajuste é estimado iterativamente pelo algoritmo Levenberg-Marquardt.

3 - Resultados e discussões

3.1 – Atividade da concanavalina A

Antes de verificarmos as propriedades adsorptivas da concanavalina A, é necessário atestar sua integridade estrutural. Esta característica pode ser associada com sua atividade no tocante à interação com carboidratos pois, como é bem sabido, estrutura e atividade em enzimas e outras proteínas estão intimamente associados, inclusive no caso da estrutura quaternária do tetrâmero da conA [14]. Realizamos o experimento com a proteína ativada (complexada com Ca^{2+} e Mn^{2+}) em solução de glicogênio, como descrito na seção 2.4.1, e acompanhamos por turbidimetria a formação da malha de complexos glicogênio-conA [227], insolúvel em excesso de conA (excesso de glicogênio solubiliza o complexo) [67]. O gráfico da absorbância em função do tempo é apresentado na Figura 14:

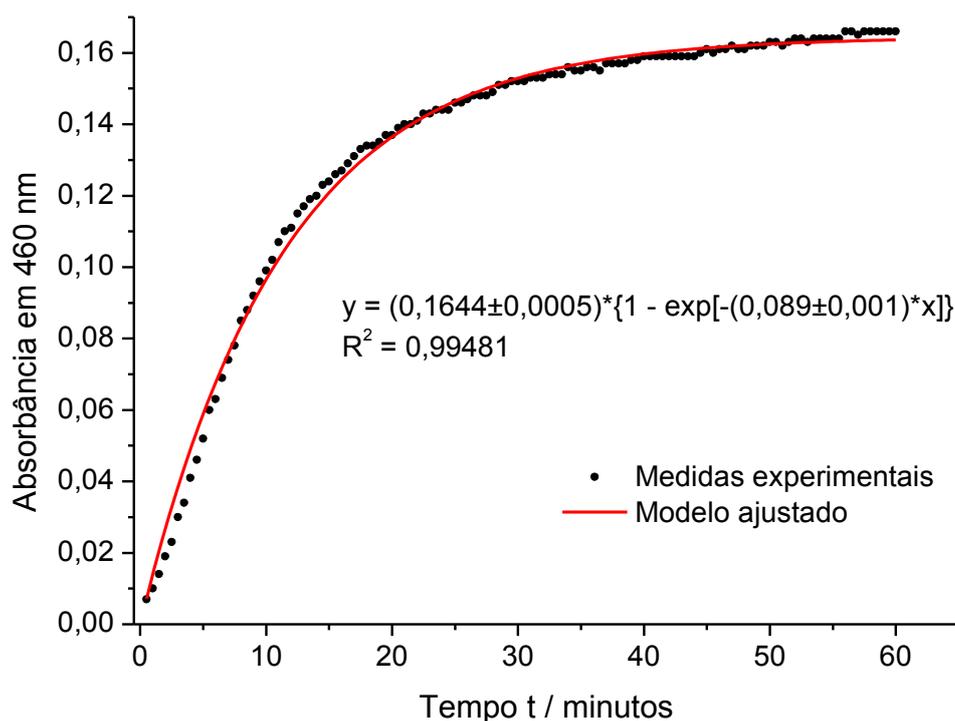


Figura 14: Gráfico de absorbância em 460 nm vs. tempo da mistura de uma solução de conA ativada com glicogênio dissolvido.

Após uma hora a absorbância em 460 nm medida foi de 0,166, e uma hora depois (duas horas de reação) praticamente manteu-se inalterada (0,167), indicando que após 1 hora o sistema está, para fins práticos, próximo o suficiente do equilíbrio. Observa-se que a dependência da absorbância com o tempo é similar aos gráficos observados por Poretz e

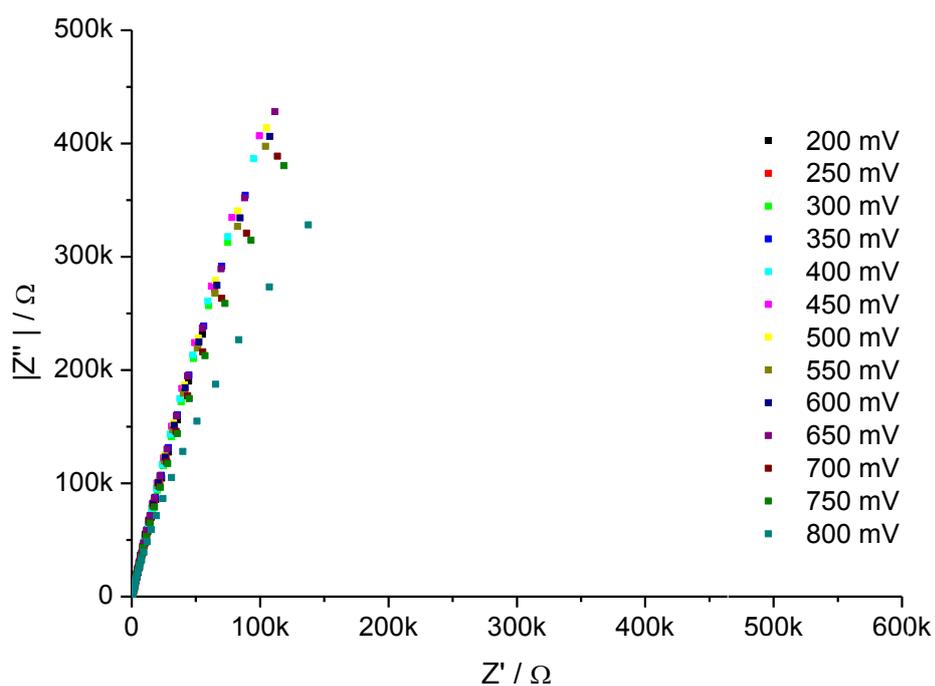
Goldstein [228], refletindo uma cinética de primeira ordem, como relatado anteriormente para esta reação [229, 230]. A constante de velocidade pelo ajuste não-linear dos dados mostrados na Figura 14 é de $0,089 \text{ min}^{-1}$, cujo logaritmo neperiano é $-2,4$, valor próximo aos obtidos por Waseen e Salahudin [229]. Deste modo concluímos que a conA empregada tem a estabilidade estrutural necessária para dar início aos experimentos de adsorção.

3.2 – Estudos com capacitância

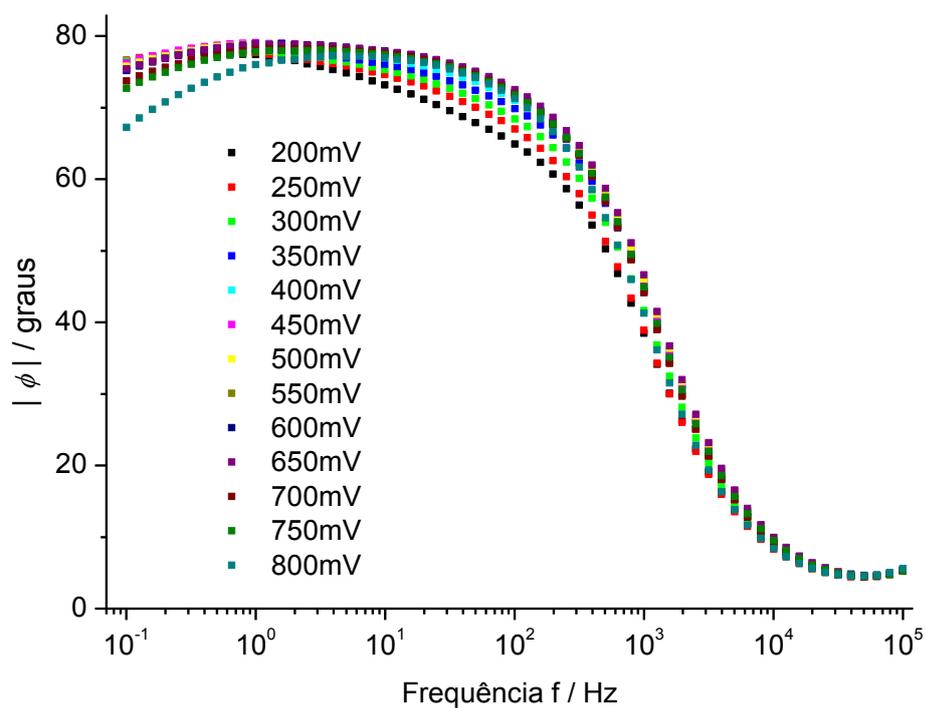
3.2.1 – Avaliação metodológica: obtenção de Q e α

Dentre os modelos para obtenção de capacitância a partir de dados de EIS, a aproximação de que a interface se comporta como um capacitor ideal é comum em estudos da adsorção de proteínas em eletrodos. Esta aproximação é justificada quando a dispersão da capacitância é pequena ($\alpha \sim 1$). Para verificar se o presente sistema – GCE em NaCl 0,15 M – obedece este critério, testamos diferentes métodos para obtenção de α e Q . Os dados de impedância foram obtidos após o procedimento de limpeza química e eletroquímica descrita na seção 2.4.2. Paralelamente a este estudo metodológico, as medidas foram feitas em diferentes potenciais E_{DC} , para verificar a possibilidade de localizar o PZC do GC nestas condições e nesta janela de potencial, além de sua possível influência na adsorção da conA.

Os gráficos de Nyquist e Bode para o GCE em NaCl 0,15 M para diferentes potenciais, de 0,2 a 0,8 V, são mostrados nas Figuras 15(a) e 15(b), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 15: Gráficos de (a) Nyquist e (b) Bode para GCE em NaCl 0,15 M em potenciais E_{DC} de 200 à 800 mV.

Pelo gráfico de Nyquist fica clara a presença de uma elevada dispersão na capacitância, refletida uma inclinação menor que 90° no ângulo formado entre os segmentos gerados pelos

pontos experimentais e o eixo Z' . Pelo gráfico de Bode verifica-se que o valor de α deve ficar em torno de $78^\circ/90^\circ = 0,87$. Deste modo, aparentemente assumir $\alpha = 1$ pode levar a valores equivocados de capacitância. Observa-se também uma certa curvatura nos gráficos de Nyquist para potenciais em torno de 200 e especialmente 800 mV. Atribuímos este efeito a reações paralelas, o que será discutido adiante.

Dois métodos para obtenção de Q e α foram comparados. O primeiro deles consiste no ajuste não-linear de um modelo de circuito equivalente, neste caso o circuito RQ da Figura 12(a). Esta abordagem fornece os valores de R_Ω , Q e α que melhor se ajustam aos dados segundo a minimização dos quadrados dos resíduos. A outra abordagem consiste na obtenção gráfica de α a partir do coeficiente angular da curva $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$, e depois da aplicação da Eq. 22 para obtenção de Q . Os resultados obtidos em frequências superiores a 10^4 Hz não foram empregados nestes cálculos, pois revelam sinais de um artefato de alta frequência.

Para ilustrar os diferentes procedimentos de obtenção mostramos os resultados do ajuste não-linear para $E_{DC} = 500$ mV na Figura 16, enquanto que o gráfico de $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$ com o ajuste linear na Figura 17.

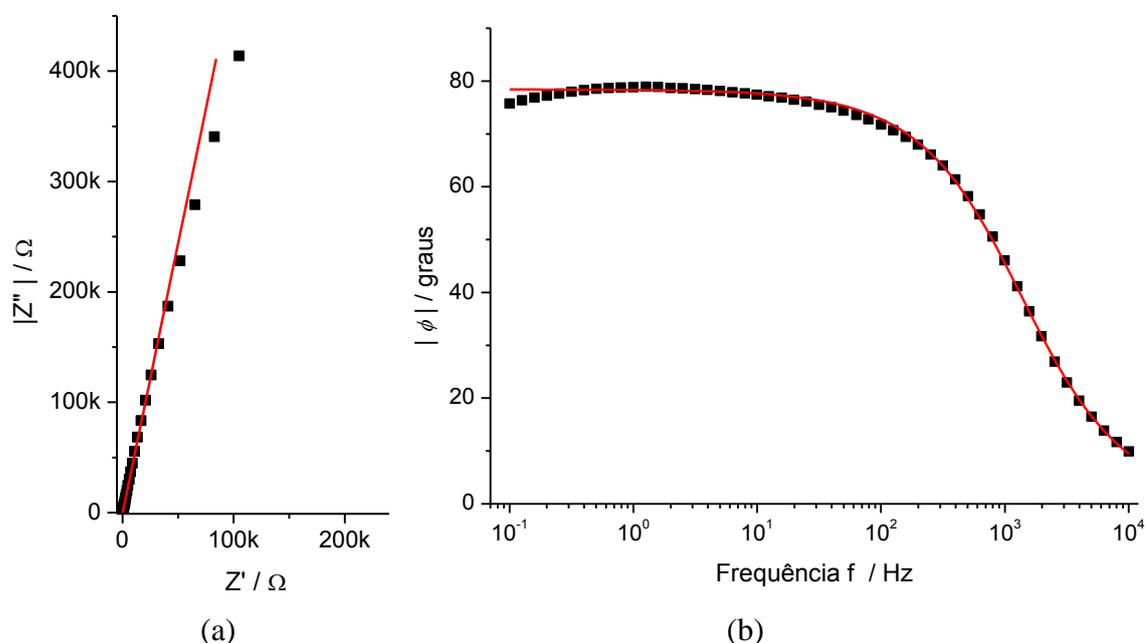


Figura 16: Gráficos de (a) Nyquist e (b) Bode para GCE em NaCl 0,15 M e $E_{DC} = 500$ mV, em que (■) representam os valores experimentais e o ajuste não-linear é mostrado em linha vermelha.

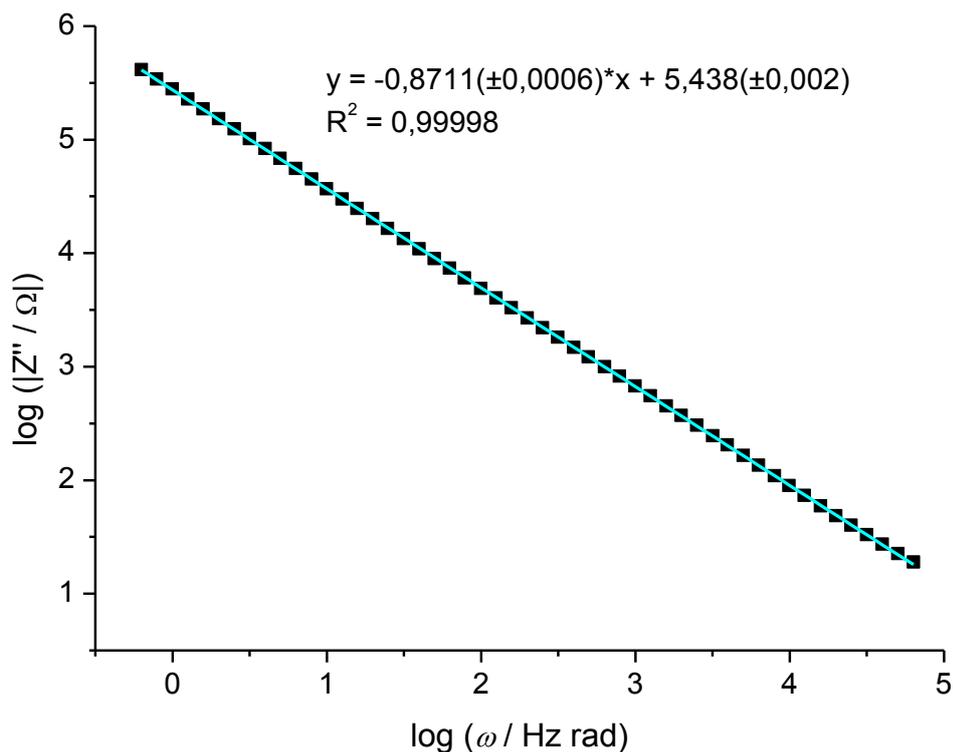


Figura 17: Gráfico de $\log |Z''|$ vs $\log \omega$ para GCE em NaCl 0,15 M e $E_{DC} = 500$ mV.

O ajuste exibido na Figura 17 forneceu $\alpha = 0,871$ e $Q = 3,57 \mu\text{F}\cdot\text{s}^{(0,129)}$. Considerando os ajustes para os outros potenciais aplicados, obtivemos $6 \times 10^{-4} < \chi^2 < 6 \times 10^{-3}$, uma faixa razoável para um modelo simples como um RQ. Espera-se que o gráfico de $\log |Z''|$ vs $\log \omega$ apresente um comportamento linear, pois extraindo o logaritmo em ambos os lados da Eq. 22 obtêm-se:

$$\log[Z''] = -\alpha \log \omega + \log \left[\text{sen} \left(\frac{\alpha \pi}{2} \right) \frac{1}{Q} \right] = a \log \omega + b \quad \text{Eq. 31}$$

Em que a e b são os coeficientes angular e linear do modelo. O valor de α equivale, portanto, à $-a$, de modo que $\alpha = 0,8711$ para $E_{DC} = 500$ mV (ver ajuste na Figura 17). Uma vez adquiridos os valores de α a partir de duas metodologias, os resultados são comparados na Figura 18 para a faixa de potenciais estudada.

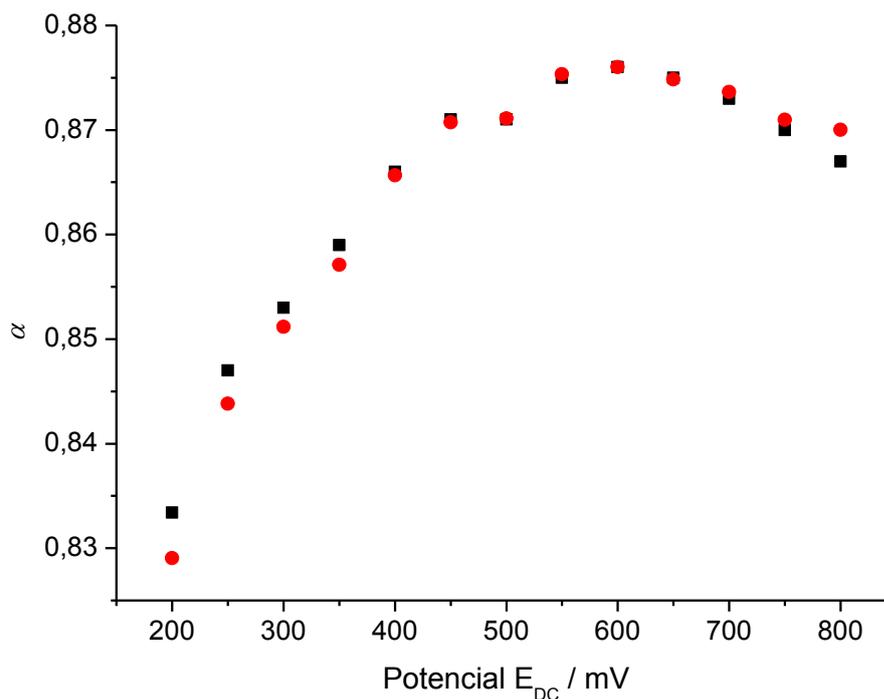


Figura 18: Comparação dos valores de α obtidos a partir de diferentes métodos: (■) pelo ajuste não-linear de um circuito RQ e (●) pelo coeficiente angular de um modelo linear ajustado nos gráficos de $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$.

Os valores de α variam de 0,83 a 0,88, passando por um máximo em 600 mV, referente a um mínimo de dispersão dos tempos de relaxação na superfície. Essa dispersão aumenta para potenciais mais catódicos, onde observa-se uma queda de α . Acreditamos que a reação de redução do oxigênio dissolvido é responsável por este comportamento ($O_2(aq) + 2H_2O(l) + 4e^- \rightleftharpoons 4OH^-(aq)$, $E^0 \sim 180$ mV vs. Ag/AgCl). Evidências desta reação podem ser observadas a partir de algumas medidas de impedância para potenciais catódicos abaixo de 200 mV, devido à formação de um arco no gráfico de Nyquist, e de um sinal alargado no de Bode, que podem ser observados nas Figuras 19(a) e 19(b), respectivamente.

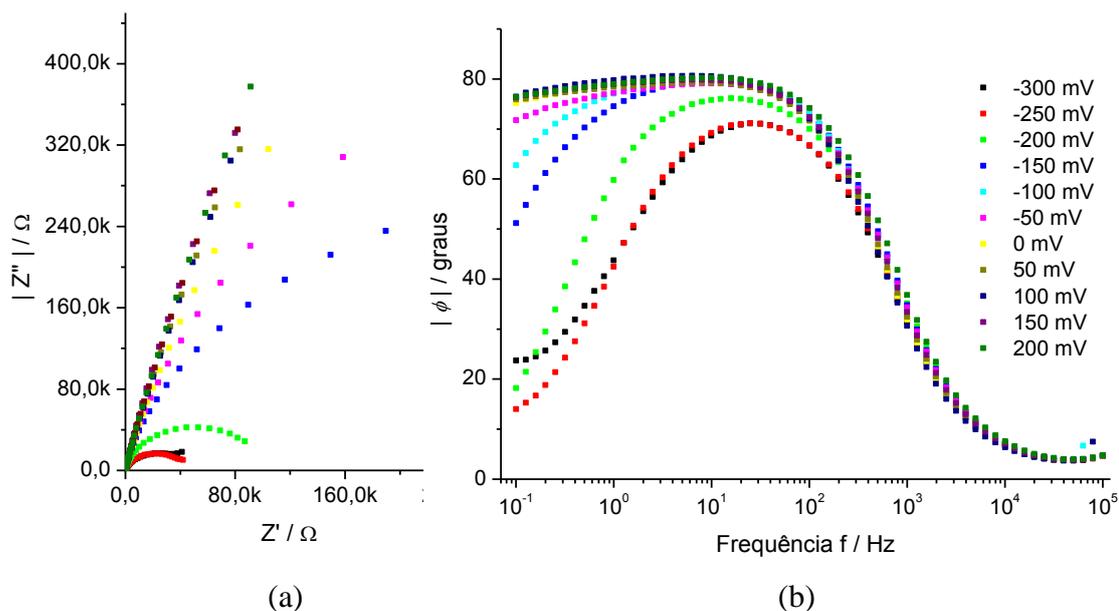


Figura 19: Gráficos de (a) Nyquist e (b) Bode para GCE em NaCl 0,15 M para potenciais abaixo de 200 mV.

Foi possível verificar através de uma voltametria cíclica em NaCl 0,15 M, após o mesmo procedimento de limpeza do eletrodo, que a reação interfere já em potenciais superiores à 0 mV, como pode-se constatar através do gráfico da Figura 20.

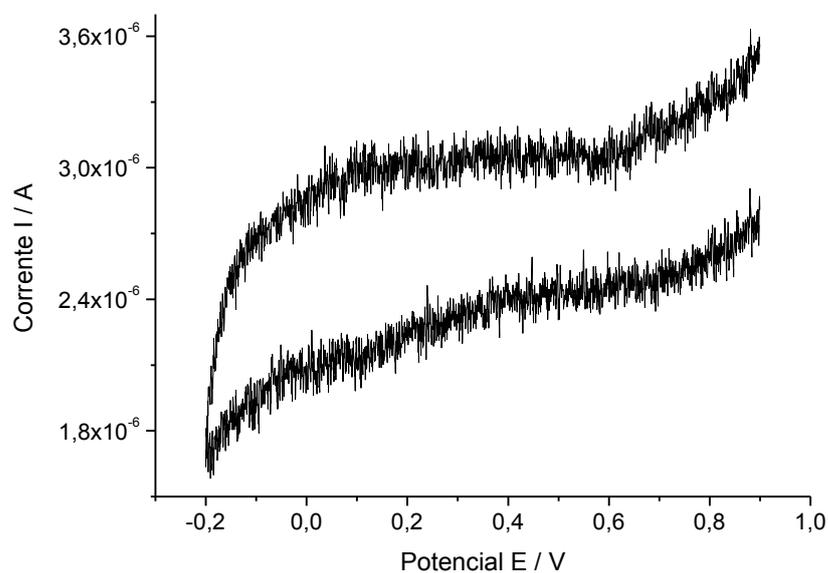


Figura 20: Voltametria cíclica em GCE e NaCl 0,15 M, com velocidade de varredura de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $0,9 \rightarrow -0,2 \rightarrow 0,9 \text{ V}$ (1 ciclo).

Acreditamos, portanto, que reações de transferência de elétrons influenciam no valor de α , tendendo a reduzi-lo, deste modo aumentando a dispersão na capacitância, efeito que pode ser constatado em diferentes trabalhos na literatura [231–236].

A medida gráfica de Q , segundo Orazem et al. [185], consiste no emprego da Eq. 22, o que geraria em princípio um valor constante de Q para todo o intervalo de frequência. Eles mostraram experimentalmente que a abordagem é válida para circuitos que apresentam R_{ct} , como o da Figura 12(b), usando a média de Q obtido em frequências altas (entre 10^3 e 10^4 Hz). Apesar de terem verificado por simulação que toda a faixa de frequência poderia ser usada para estimar Q em eletrodos bloqueantes, os autores não apresentaram resultados experimentais que corroborassem a previsão. Em busca desta confirmação, obtivemos Q a partir dos valores de α obtidos graficamente para diferentes frequências, e os dispomos no gráfico 3D da Figura 21, em função do potencial E_{DC} e da frequência f .

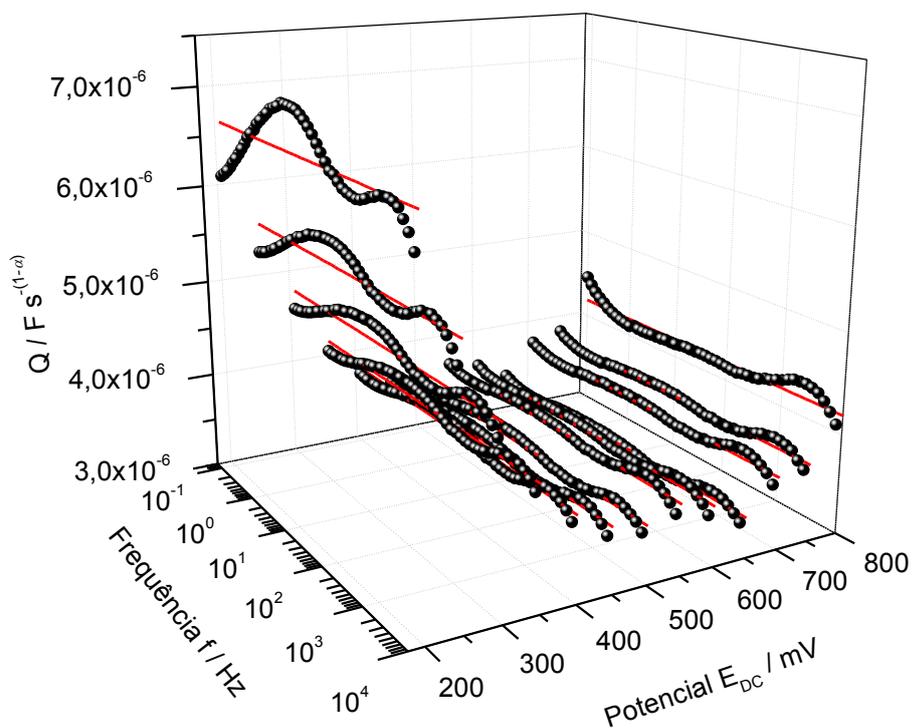


Figura 21: Gráfico 3D dos valores de Q obtidos a partir da Eq. 22, em função de E_{DC} e de f . As linhas em vermelho foram obtidas empregando a Eq. 32.

Observa-se na Figura 21 que, em geral, os valores de Q são maiores para potenciais próximos de 200 mV, e apresentam um mínimo em 600 mV, começando a aumentar em potenciais maiores. Em potenciais acima de 350 mV os valores de Q são constantes ao longo de uma ampla faixa de frequência, mas mostram oscilações pronunciadas em potenciais inferiores.

Para extrair um único valor de Q considerando todo intervalo de frequências, uma faixa de frequência em que Q é aproximadamente constante pode ser escolhida, segundo o procedimento de Orazem et al. [185], em seguida extraindo-se a média nesta faixa. Aplicamos este método para os valores de Q entre 10^{-1} e 10^4 Hz. Devido às oscilações observadas na Figura 21, especialmente em baixos potenciais, propomos um método alternativo para cálculo de Q . Ele consiste no rearranjo da Eq. 31 para expressar Q em função dos parâmetros a e b :

$$Q = \frac{1}{10^b} \operatorname{sen}\left(\frac{-a\pi}{2}\right) \quad \text{Eq. 32}$$

Os valores de Q segundo este método são independentes da frequência, e são mostrados como linhas horizontais na Figura 21, aparentemente representando o valor esperado de Q caso os dados experimentais levassem a um gráfico $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$ perfeitamente linear. A Figura 22 compara os valores de Q obtidos através dos três procedimentos descritos acima.

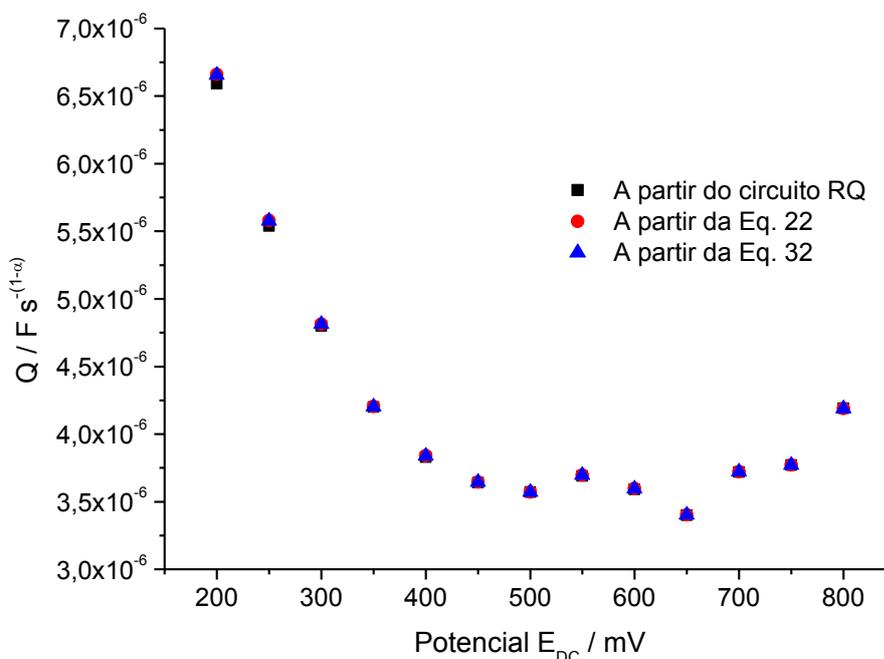


Figura 22: Comparação dos valores de Q estimados pelo ajuste não-linear de um circuito RQ, pela média dos valores para diferentes frequências segundo a Eq. 22 e através da Eq. 32.

Como pode-se observar, os valores de Q para diferentes potenciais na Figura 22 mostraram-se bastante próximos, o que pode indicar a consistência dos procedimentos empregados. Constata-se também, pela comparação da Figura 22 com a Figura 18, uma aparente relação inversa entre Q e α . De fato pode-se verificar que, de acordo com a Eq. 23, um aumento de Q para um dado valor de C_0 corresponde a um decréscimo de α [191]. Isto implica que a dispersão da capacitância não pode ser atribuída unicamente ao α , mas ao Q também.

Na discussão subsequente (seção 3.2.2) os valores de α apresentados são calculados de acordo com o procedimento de Orazem et al., e o valor de Q foi estimado pela extração dos parâmetros do ajuste linear (Eq. 32). Diferentemente do ajuste não-linear de um circuito RQ, as estimativas gráficas não forçam um circuito para descrever os dados, mas permitem a observação de elementos de circuito em diferentes faixas de frequência dos dados de impedância. A preferência pelo procedimento linear para o cálculo de Q , comparado à média aritmética proposta por Orazem et al., se deve ao fato de que a extração deste tipo de média assumiria que as oscilações se distribuíssem normalmente, o que não é necessariamente verdadeiro (sobretudo no caso em que as medidas a cada frequência não são independentes).

É importante ressaltar neste ponto que o uso de Q para descrever a capacitância de dupla-camada pode levar a interpretações errôneas [190, 194], exceto para altos valores de α , como mostram os resultados obtidos por Neves et al. [232]. O sistema em questão – GCE em NaCl(aq) – mostra alta dispersão na capacitância, de modo que esta aproximação não pode ser usada. Para estimar a capacitância da interface nos valem, portanto, do emprego da Eq. 23. A resistência da solução, neste caso, foi obtida através de um ajuste linear dos dados num gráfico de Z' vs. Z'' , entre 10^3 a 10^4 Hz. Um exemplo deste ajuste é apresentado na Figura 23, para $E_{DC} = 500$ mV. Esta abordagem gráfica leva a valores de R_Ω que são comparáveis aos valores obtidos por ajuste não-linear, como pode-se observar no gráfico da Figura 24, onde obteve-se um coeficiente angular próximo de 1 entre os valores obtidos por diferentes abordagens para os diferentes potenciais medidos.

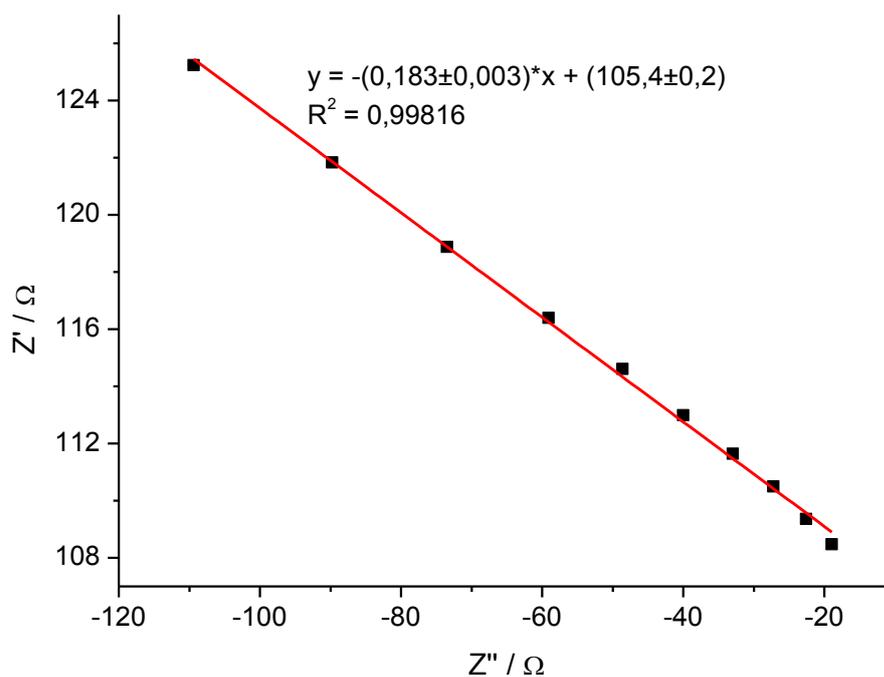


Figura 23: Gráfico de Z' vs. Z'' para GCE em NaCl 0,15 M para obtenção de R_{Ω} pelo coeficiente linear da curva para $E_{DC} = 500$ mV.

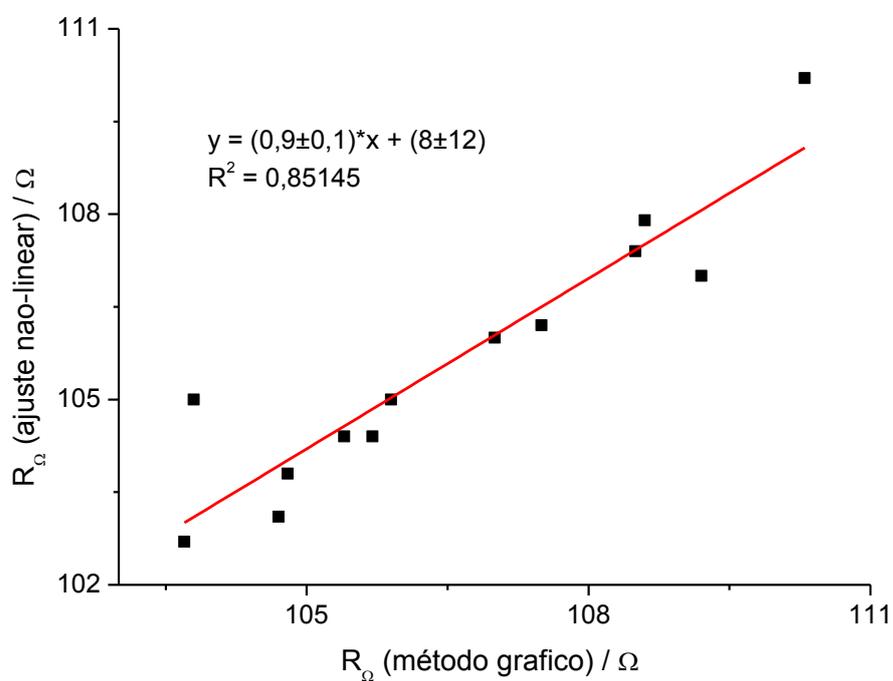


Figura 24: Comparação dos valores de R_{Ω} obtidos a partir do coeficiente linear dos dados de Z' vs. Z'' e a partir do ajuste não-linear do circuito RQ em diferentes potenciais.

3.2.2 – Adsorção de concanavalina A

Após a obtenção dos dados de impedância que permitiram a obtenção de R_Ω , Q e α segundo a discussão precedente, o eletrodo foi submergido em solução $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de conA por 40 minutos, como descrito na etapa 9) da seção 2.4.2. Os valores de C_0 (normalizados pela área do eletrodo A) antes e depois da adsorção da proteína e a diferença percentual ΔC (segundo a Eq. 28) são mostrados nas Figuras 25(a) e 25(b), respectivamente.

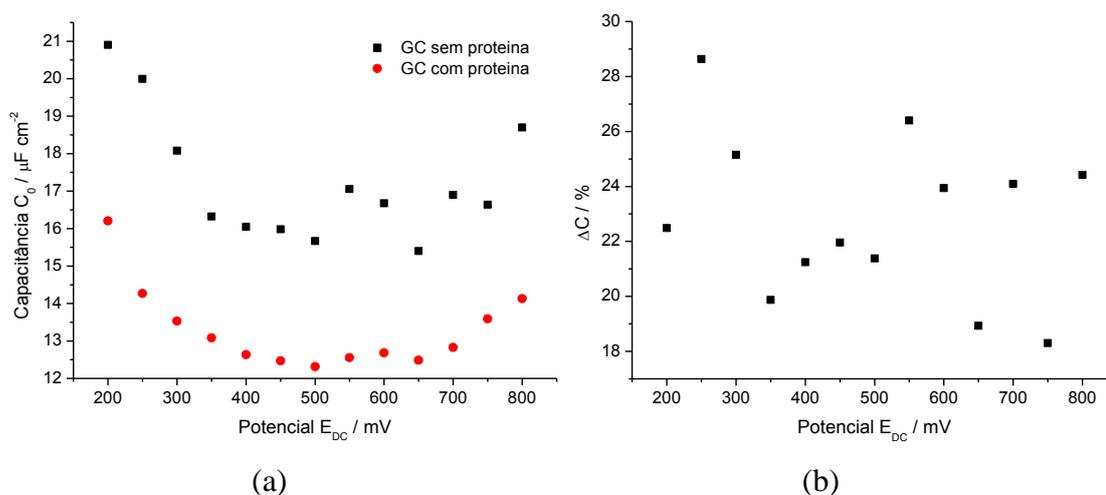


Figura 25: Valores de (a) C_0 para o GCE em NaCl 0,15 M com e sem proteína e (b) ΔC para E_{DC} entre 200 e 800 mV.

Ambas as curvas da Figura 25(a) apresentam um mínimo em aproximadamente 600 mV, exibindo uma capacitância em torno de $16 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para o eletrodo sem proteína e de $12,5 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para o eletrodo com proteína neste potencial. Este mínimo provavelmente não se deve ao PZC pelos seguintes motivos:

- 1) A solução eletrolítica não é diluída (NaCl 0,15 M);
- 2) O PZC do GC em NaF(aq) é 70 mV [237], e adsorção aniônica (esperada neste caso pela presença de Cl^-), leva a um deslocamento do PZC para potenciais *mais negativos* [238], de modo que provavelmente o PZC em NaCl seria inferior a 70 mV;
- 3) Se o Cl^- adsorve em GC, a reação de troca dos íons Cl^- pela proteína adsorvida causaria um deslocamento do PZC (no caso de uma proteína neutra, para potenciais mais positivos), e o mínimo da Figura 25(a) não apresenta este deslocamento.

Deste modo, particularmente de acordo com o argumento 2), assume-se que a superfície do eletrodo esteja positivamente carregada. Adicionalmente, pode-se observar na Figura 25(a)

que a adsorção da conA promove uma queda da capacitância, mas o perfil da curva em função do potencial permanece o mesmo. Este comportamento é confirmado pelo gráfico da Figura 25(b), em que é possível observar que a queda de capacitância causada pela proteína adsorvida é aproximadamente constante para toda a faixa de potencial. Para estudar a dependência do recobrimento em função do potencial através da Eq. 27, é necessário estimar primeiro o valor de $C_{\theta=1}$ através da Eq. 29, por exemplo. Nas condições empregadas (pH 6), é esperado encontrar uma maior quantidade de dímeros em solução [80]. Para orientações “side-on” e “end-on” os valores de d são de aproximadamente 30 e 75 Å, respectivamente (ver Figura 4(b)) [40]. A constante dielétrica dentro de proteínas geralmente é obtida partir de cálculos computacionais, e o tema é rapidamente debatido por Löffler et al. [239]. Empregando a estimativa dos autores de 15 para a constante, obtemos $C_{\theta=1} = 0,3 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para orientação “side-on” e $0,1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para a “end-on” (empregando $A = \pi\cdot[(3/2)\cdot 10^{-1}\text{cm}]^2 = 0,071 \text{cm}^2$). Estes valores diferem em 3 vezes, mas como em ambos os casos $C_{\theta=1} \ll C_{\theta=0}$ (entre 21 e 16 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$), o recobrimento obtido pela Eq. 27 não permite distinguir (numericamente) qual das orientações é a mais provável, isto sem considerar que a Eq. 29 é uma aproximação grosseira. O recobrimento em função do potencial segundo a Eq. 27 (e usando $C_{\theta=1} = 0,3 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$) é exibido na Figura 26.

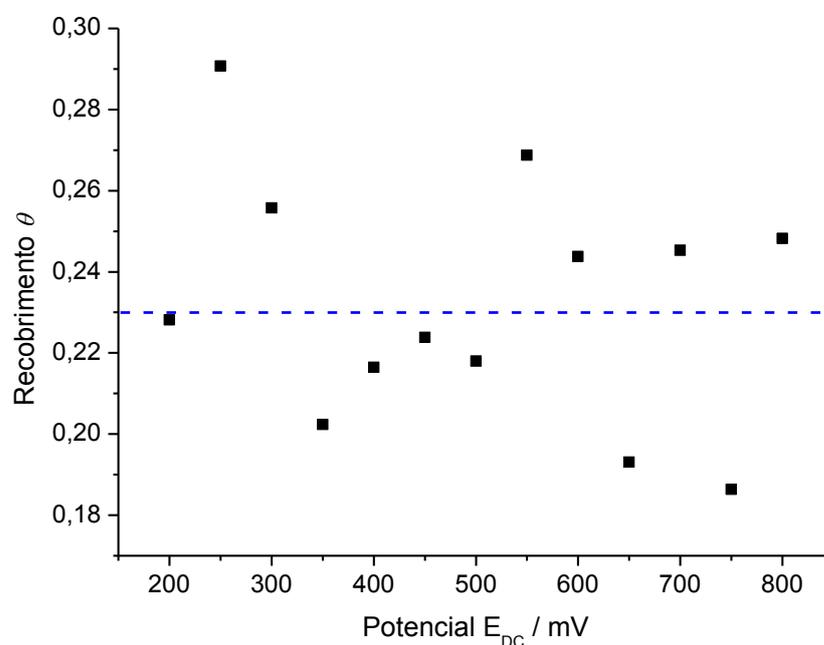


Figura 26: Recobrimento de conA em GCE calculado segundo a Eq. 27 em função do potencial E_{DC} .

Observa-se que o gráfico da Figura 26 assemelha-se ao da Figura 25(b), pois $\theta \cdot 100\% \approx \Delta C$ devido ao fato de que $C_{\theta=0} \gg C_{\theta=1}$, como discutido anteriormente. Observa-se que aparentemente não há influência do potencial na camada adsorvida, como uma desorção induzida pela variação de potencial. Isso é confirmado pelo coeficiente de correlação de Spearman (APÊNDICE B.1) para os dados da Figura 26, não significativo num nível de confiança de 95%, de modo que não há indícios detectáveis da influência de E_{DC} em θ . O valor médio de θ calculado é de $0,23 \pm 0,02$, e com este baixo recobrimento, espera-se que a orientação da proteína seja “side-on”, para maximizar as interações com o adsorvente, orientação favorável do dímero da conA em outras superfícies [40, 98, 106, 108].

Além da capacitância, verificamos que o valor de α apresenta uma influência não convencional das moléculas adsorvidas. Em função disto são mostrados os valores de α antes e depois da adsorção e o de $\Delta\alpha$ (calculado de maneira análoga à ΔC) vs. o potencial nas Figuras 27(a) e 27(b), respectivamente:

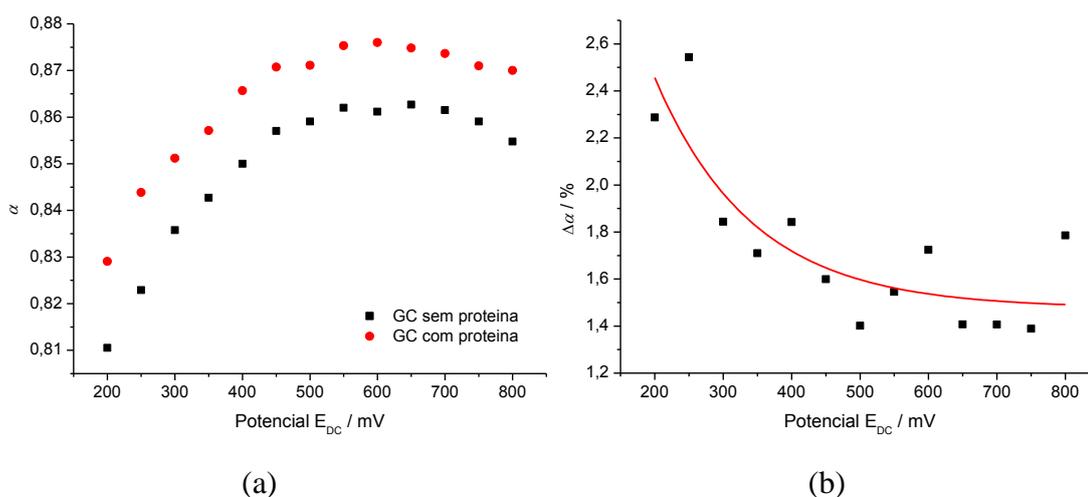


Figura 27: Gráfico dos valores de (a) α antes e depois da adsorção de conA e de (b) $\Delta\alpha$ em função do potencial E_{DC} .

A adsorção de conA aparentemente tem o efeito de aumentar os valores de α para toda a faixa de potencial, diminuindo a dispersão na capacitância. No entanto, diferentemente do efeito da adsorção em C_0 , a diminuição desta dispersão aparentemente sofre influência do potencial, como pode ser observado na Figura 27(b), de maneira que quanto maior o potencial menor o efeito da proteína na diminuição da dispersão. Em outras palavras, *para maiores potenciais a dispersão na capacitância resultante da proteína é maior*. Esta aparente tendência foi avaliada pela extração do coeficiente de correlação de Spearman, que neste caso

é de -0,67, sendo significativo num nível de confiança de 95%. O valor é negativo porque a contribuição da camada adsorvida na diminuição da dispersão é maior em potenciais próximos a 200 mV, mas ela cai com o aumento de E_{DC} , chegando a um mínimo em torno de 500 mV e então mantendo-se constante. A tendência monotônica assemelha-se a uma função exponencial, que para comparação visual é ajustada na Figura 27(b). Como a variação percentual da capacitância não se mostrou dependente do potencial, acredita-se que algum processo verificável pelas mudanças em $\Delta\alpha$ não interfere na espessura da camada adsorvida (pelo menos de maneira não detectável nos dados obtidos). Deste modo, mudanças de orientação, como de “side-on” para “end-on”, não poderiam ser responsáveis pelo efeito em $\Delta\alpha$, pois promoveriam variações na capacitância ao mudar a espessura da camada devido à variação de E_{DC} . Considerando que o momento de dipolo (p) de proteínas pode influenciar na orientação de equilíbrio das moléculas adsorvidas [45], formulou-se a hipótese de que a reorientação dos dipolos da proteína em função da variação do campo elétrico na interface (X) resultasse no comportamento observado na Figura 27(b). Neste ponto uma análise mais focada nas propriedades eletrostáticas da proteína foi realizada.

Os dímeros da conA possuem um pI de aproximadamente 6,5 [97], o que implica que as moléculas em solução de NaCl 0,15 M (pH 6,0) devam estar positivamente carregadas, mas quase neutras. Baseado nas coordenadas atômicas fornecidas por Bouckaert et al. [2] no PDB, estimamos a carga líquida do dímero demetalizado em função do pH empregando o software PROPKA [225]. Os resultados são mostrados na Figura 28, incluindo os mesmos cálculos para o tetrâmero.

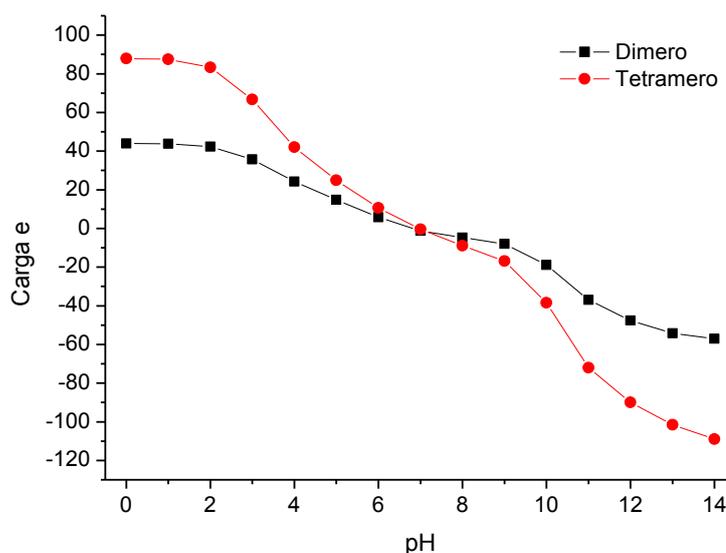


Figura 28: Carga (em unidades da carga elementar) em função do pH para dímero e tetrâmero demetalizados.

Observa-se que a estimativa do $pI = 7$ para dímero e tetrâmero da conA não difere muito do observado experimentalmente. A próxima etapa é descrever o perfil eletrostático superficial da proteína, o que pôde ser feito empregando o software APBS [49]. A visualiza o do mapa de potencial eletrostático para o dímero através do software VMD [3] é mostrada na Figura 29.

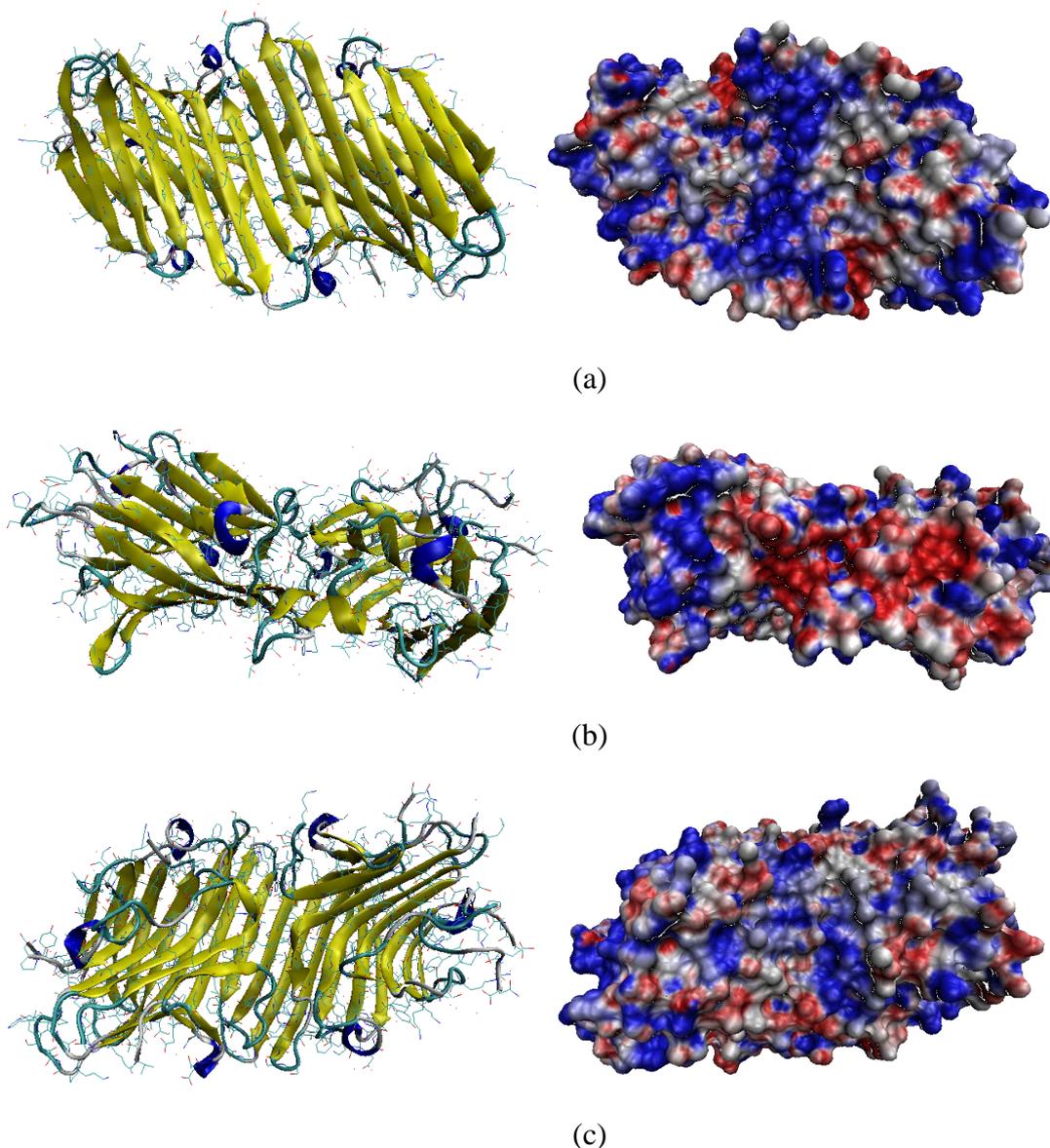


Figura 29: (a)-(c) Mapa de potencial eletrostático para o dímero da conA em pH 6, com regiões positivamente carregadas em azul e negativamente carregadas em vermelho.

Observa-se nas representa es da Figura 29 que a proteína possui boa parte das faces “side-on” positivamente carregadas (Figura 29 (a) e (c)), mas na região que une os dímeros no sentido perpendicular ao eixo de maior extensão podemos verificar uma área negativamente

carregada (Figura 29 (b)). Ela cruza o dímero, formando linhas de campo elétrico que delineiam o dipolo elétrico da proteína, como pode ser observado na Figura 30.

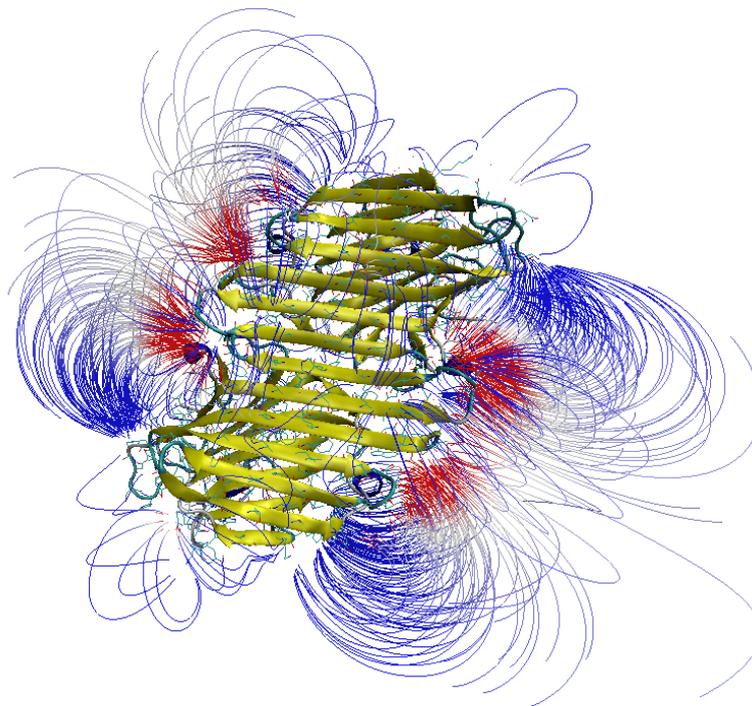


Figura 30: Linhas de campo elétrico do dímero da conA em pH 6.

Em função do posicionamento do dipolo da proteína (perpendicular ao eixo de maior extensão), é possível ver que mudanças de orientação do dipolo elétrico em relação ao campo elétrico na interface podem ocorrer de maneira a não serem detectadas pelas mudanças na capacitância. Para um aumento de potencial, espera-se que um maior número de moléculas tenha seu dipolo alinhado paralelamente ao campo elétrico da superfície, de modo a influenciar a dispersão da capacitância na interface, como sumarizado no esquema da Figura 31.

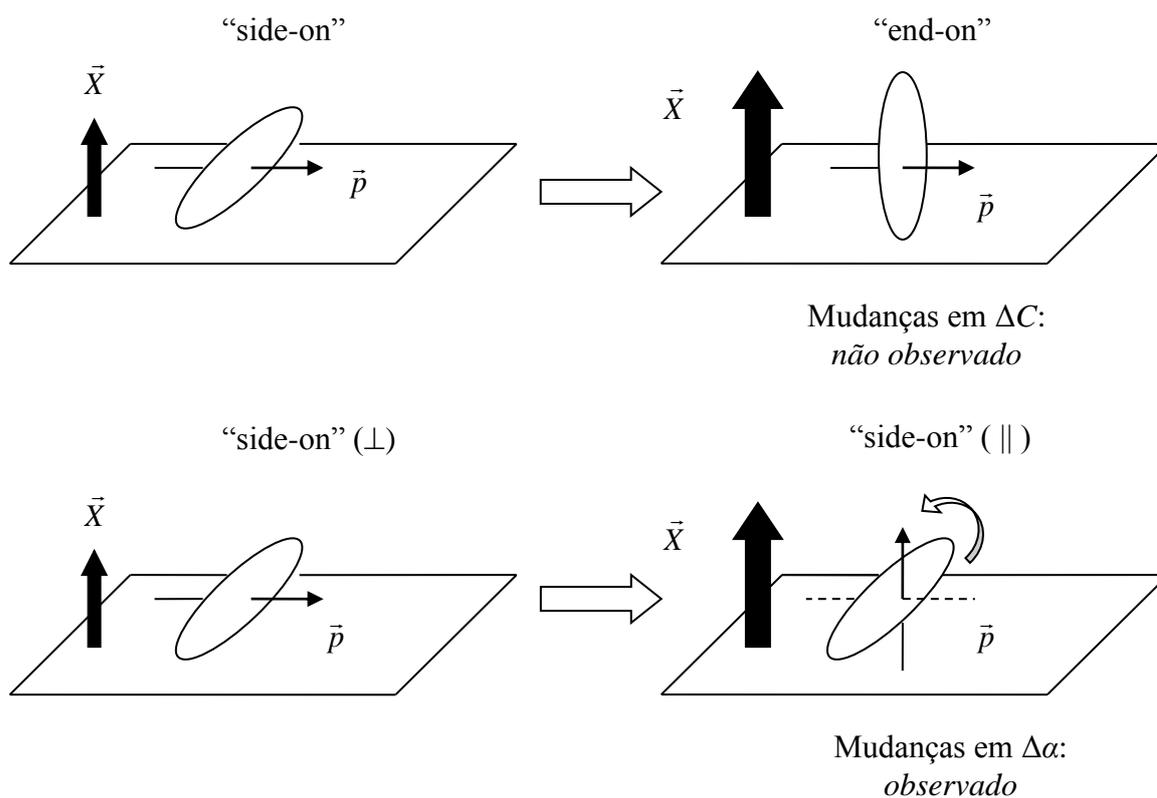


Figura 31: Esquema representando interpretações acerca da influência do potencial na capacitância e no valor de α .

Esta reorientação promovida por mudanças no potencial não é nova na eletroquímica, sendo observada, por exemplo, em moléculas de água nestas condições [240]. Na tentativa de propor um modelo para explicar a influência das moléculas adsorvidas e possivelmente seus dipolos em α , é preciso considerar primeiramente o controverso significado de α . Já foi demonstrado experimentalmente que um aumento na heterogeneidade da distribuição de energia na superfície leva a um aumento na dispersão da capacitância [189, 205]. Empregando esta interpretação, e a suposição de as mudanças de orientação da conA levam a uma dependência de $\Delta\alpha$ com o potencial, é razoável supor que proporção de moléculas em uma dada orientação em relação às outras influencia na dispersão da energia na superfície. Propomos, portanto, que a população de proteína na orientação (\perp) (ver Figura 31) é majoritária em baixos potenciais, mas com o aumento do potencial as moléculas são polarizadas e mudam para a orientação (\parallel), que passa a ser dominante em potenciais altos ($E_{DC} > 500$ mV). De acordo com esta interpretação, a orientação (\perp) é menos energética eletrostaticamente, permitindo minimização através de interações eletrostáticas entre as moléculas, o que não ocorre na orientação (\parallel). Com o aumento de X , a distribuição

homogênea de proteínas na orientação de equilíbrio (\perp) é distorcida, pois algumas moléculas começam a se polarizar, o que resulta no aumento da dispersão resultante da proteína, de modo que em elevados potenciais o valor de α aumenta menos que em baixos potenciais após a adsorção. Para explicar o perfil aparentemente exponencial observado na Figura 27 (b) consideramos que há uma relação entre a reorientação dos dipolos induzida pela mudança do potencial e a distribuição de Boltzmann. Os pormenores deste modelo são descritos no ANEXO C.

3.3 – Estudos com resistência

3.3.1 – Primeiros ensaios

Como um dos objetivos do presente trabalho envolve a quantificação das proteínas adsorvidas, o procedimento de determinação via capacitância, apesar de bastante usado, tem limitações inerentes a pouca variação deste parâmetro em relação a $C_{\theta=0}$ com a adsorção. Em experimentos no qual adiciona-se um par redox ao eletrólito, por outro lado, as variações na resistência de transferência de elétrons podem chegar a 4 ordens de grandeza. Em função disto modificamos o procedimento, de maneira que as medidas de impedância fossem feitas em uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM na mesma solução eletrolítica. Nesta abordagem a verificação da adsorção da proteína se dá pela interferência do adsorbato na reação de transferência de elétrons entre as espécies redox. Nos primeiros testes a adsorção foi realizada submergindo o eletrodo por 5 minutos em soluções de diferentes concentrações de conA, c_p^0 , de 0,01 a 0,5 mg·mL⁻¹. Considerando que a voltametria altera a superfície de maneira mais agressiva que a EIS [241], a ordem escolhida das medidas antes da adsorção foi primeiro a voltametria e posteriormente a análise de impedância, e após a adsorção a ordem das medidas é invertida, realizando-se primeiramente a impedância (uma técnica mais sensível que a voltametria e nosso foco no estudo da adsorção) e depois uma nova voltametria. As voltametrias cíclicas antes e depois da adsorção das soluções a diferentes concentrações da concanavalina A são apresentadas na Figura 32:

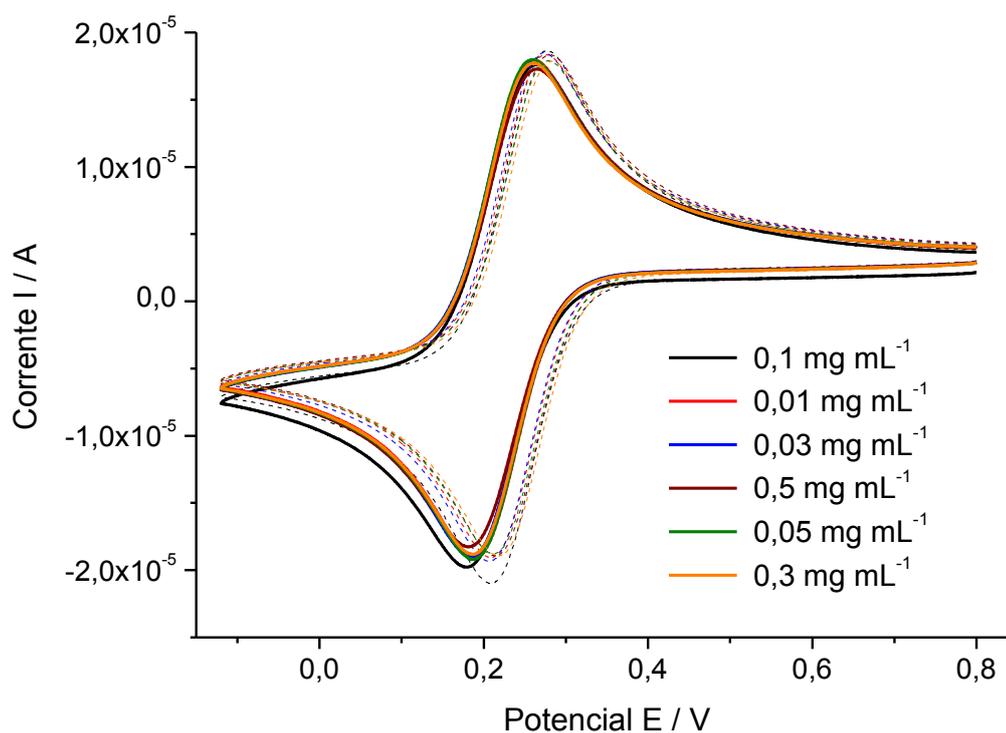


Figura 32: Voltametrias cíclicas do GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M antes (linhas tracejadas) e depois (linhas sólidas) da submersão do eletrodo em soluções de conA em diferentes concentrações (diferentes cores).

Observando-se as voltametrias cíclicas da Figura 32 pode-se constatar uma baixa adsorção da conA nestas condições pela comparação com a literatura [51, 106, 242], como verificado anteriormente nos estudos de capacitância (seção anterior). Isso se reflete na semelhança entre as voltametrias antes e depois da adsorção.

A quantidade de proteína adsorvida pode ser associada com variações na separação dos potenciais de pico anódico (E_{PA}) e catódico (E_{CP}), dada pela diferença entre os potenciais onde um máximo e um mínimo de corrente ocorrem, respectivamente: $\Delta E = E_{PA} - E_{CP}$. As medidas deste parâmetro para diferentes concentrações de proteína são mostradas no gráfico da Figura 33.

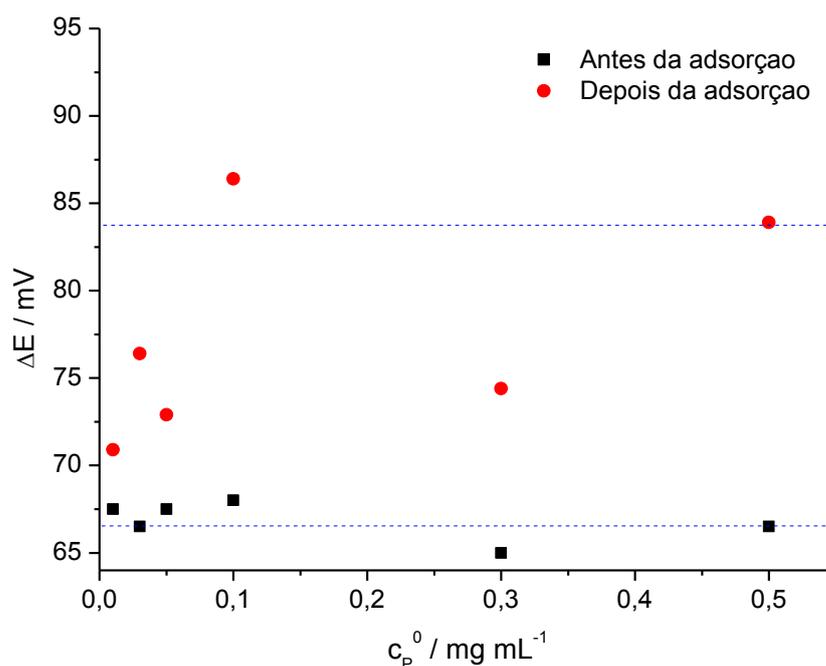


Figura 33: Diferenças de potenciais de pico para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M antes e depois da adsorção de conA.

Em regimes quasi-reversíveis o valor de ΔE está relacionado com a constante de velocidade padrão, k^0 , que indica a relativa “facilidade” na transferência de elétrons, ou o quão rápido o sistema atinge o equilíbrio [243]. Observando, como exemplo, o caso da adsorção em $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína, o valor de $\Delta E \sim 66 \text{ mV}$ é modificado para $\Delta E \sim 84 \text{ mV}$, com a proteína aumentando a irreversibilidade da reação de transferência de elétrons, tornando-a mais “difícil” ou ativada. Este fenômeno se reflete na resistência de transferência de carga obtida a partir de dados de impedância, como veremos logo mais. Estimativas de k^0 para sistemas quasi-reversíveis podem ser feitas empregando a Eq. 33 [244]:

$$\psi = \frac{(D_O / D_R)^{(1-\beta)/2} k^0}{[\pi D_O \nu (F / RT)]^{1/2}} \quad \text{Eq. 33}$$

sendo ψ um parâmetro obtido numericamente para diferentes ΔE , D_O e D_R são os coeficientes de difusão das espécies oxidada e reduzida no par redox, respectivamente, β é o coeficiente de transferência complementar e ν é a velocidade de varredura na voltametria cíclica. No presente caso a espécie oxidada é $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e a reduzida é $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, cujos coeficientes de difusão são $D_O = 8,96 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ e $D_R = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ [245], respectivamente. O valores de ψ (com $\beta = 0,5$) para $\Delta E = 66 \text{ mV}$ e $\Delta E = 84 \text{ mV}$ são 4 e 1 [244], respectivamente.

A partir da Eq. 33 pode-se calcular os valores de k^0 para o eletrodo antes (k_0^0) e depois (k_p^0) da adsorção de conA. Porém não é necessário calcular as duas constantes independentemente, pois a relação entre elas é facilmente deduzida sabendo os respectivos valores de ψ , ψ_0 e ψ_P :

$$\frac{\psi_0}{\psi_P} = \frac{k_0^0}{k_p^0}$$

No presente caso $\psi_0/\psi_P = 4$, de modo que k^0 para o eletrodo sem proteína é 4 vezes superior ao obtido após adsorção de conA $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 5 minutos. Deste modo a camada adsorvida diminui em 4 vezes a velocidade do processo de transferência de elétrons neste caso. Esta variação no k^0 é relativamente pequena considerando que diferentes tratamentos do eletrodo promovem variações em ordens de grandeza. Calculando o valor de k^0 para o eletrodo sem proteína:

$$k_0^0 = \frac{\psi(\pi D_o f \nu)^{1/2}}{(D_o/D_R)^{(1-\beta)/2}} = \frac{4 \cdot (3,1416 \times 8,96 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \times 38,920 \text{ V}^{-1} \times 0,050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1})^{1/2}}{(8,96/7,35)^{1/4}}$$

$$k_0^0 = 2,8 \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

Considerando as outras medidas de voltametria antes da adsorção obtêm-se aproximadamente $2 \times 10^{-2} \leq k^0 \leq 3 \times 10^{-2} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, dentro da faixa observada para eletrodo submetido unicamente a um polimento com a alumina (10^{-2} à $10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) [246].

Os gráficos de Nyquist e Bode obtidos para diferentes concentrações de proteína empregadas podem ser observados nas Figuras 34(a) e 34(b). As curvas obtidas antes da adsorção são mostradas como uma média de cinco medidas, e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

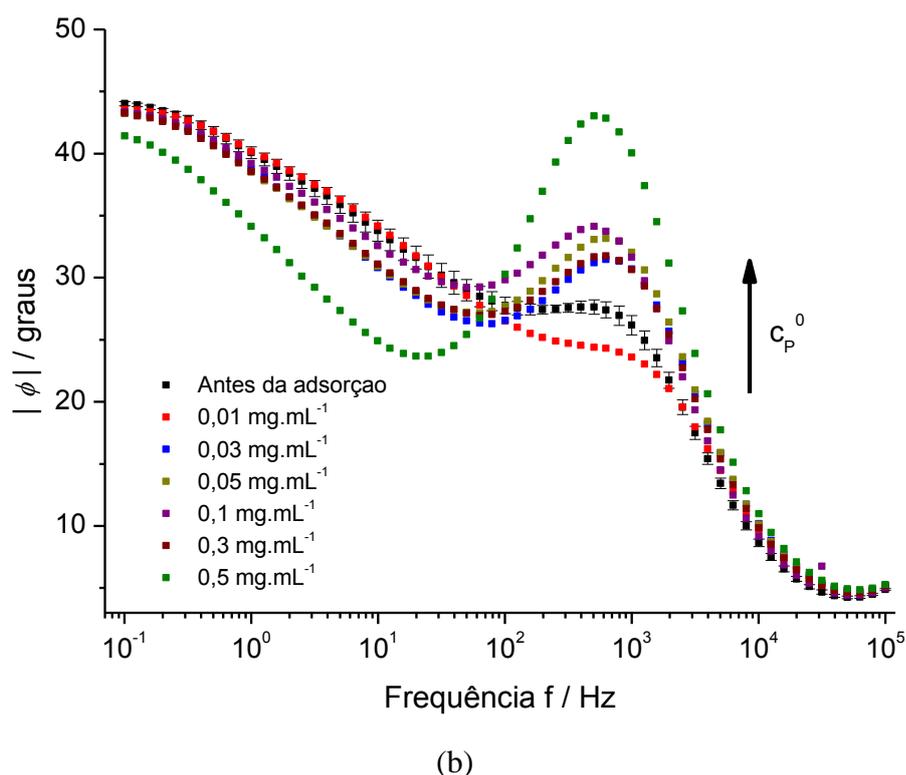
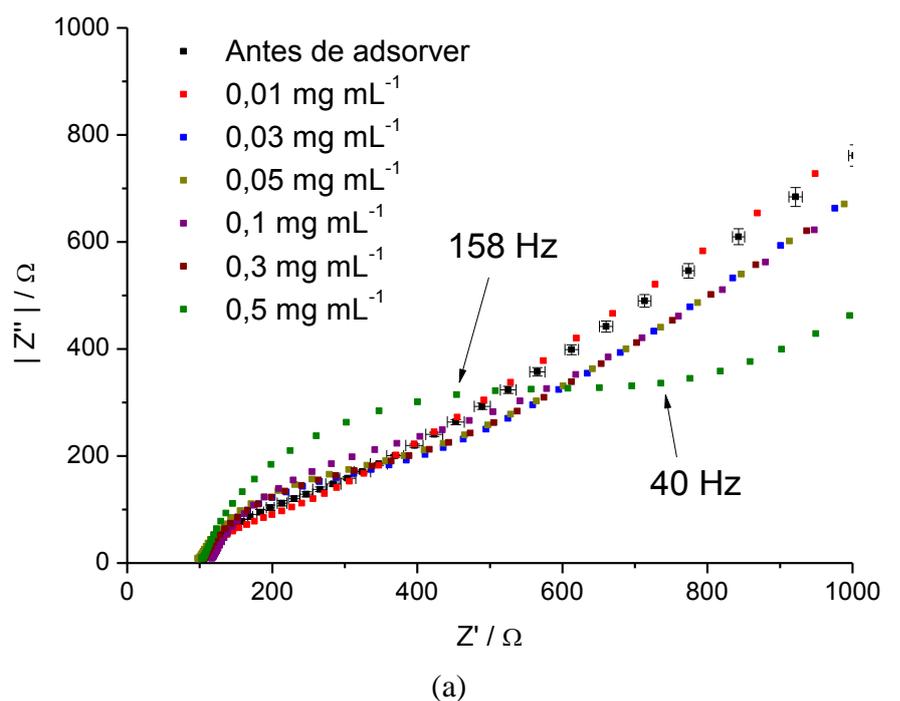


Figura 34: Gráficos de (a) Nyquist e (b) Bode para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M antes e depois da adsorção de conA em diferentes concentrações.

No gráfico de Nyquist da Figura 34(a) observa-se um progressivo aumento do arco em altas frequências associado a processos redox em função da adsorção da proteína. Um maior arco corresponde a uma maior resistência de transferência de carga, resultado da diminuição

da velocidade de transferência de elétrons na interface pois a proteína adsorvida dificulta o processo, aumentando sua energia de ativação. De maneira análoga, a área disponível/efetiva para a reação redox ocorrer diminui pela obstrução da proteína, e um decréscimo em A na Eq. 19 implica um aumento em R_{ct} . No gráfico de Bode da Figura 34(b) observa-se que o máximo entre 10^2 e 10^3 Hz é maior para concentrações superiores de proteína, e a frequência onde há um máximo é deslocada para valores menores como resultado do aumento da resistência de transferência de carga. Os resultados obtidos após a adsorção em $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ não correspondem ao esperado, exibindo uma R_{ct} inferior a do branco mesmo sem adsorção de proteína. Atribuímos este fato a não ocorrência da adsorção neste ensaio, de modo que este dado não é analisado junto com os outros segundo procedimento descrito mais adiante.

Observa-se nos gráficos de Nyquist e Bode acima que para baixas frequências a impedância exibe comportamento característico de processos difusionais, como um segmento linear com 45° de inclinação no gráfico de Nyquist, não coincidentemente o ângulo para o qual os dados no gráfico de Bode tendem para $f \rightarrow 0$. Este e outros comportamentos típicos de diferentes elementos de circuito são evidenciados no gráfico de Nyquist da Figura 35, correspondente aos dados médios para medidas antes da adsorção apresentados previamente na Figura 34(a).

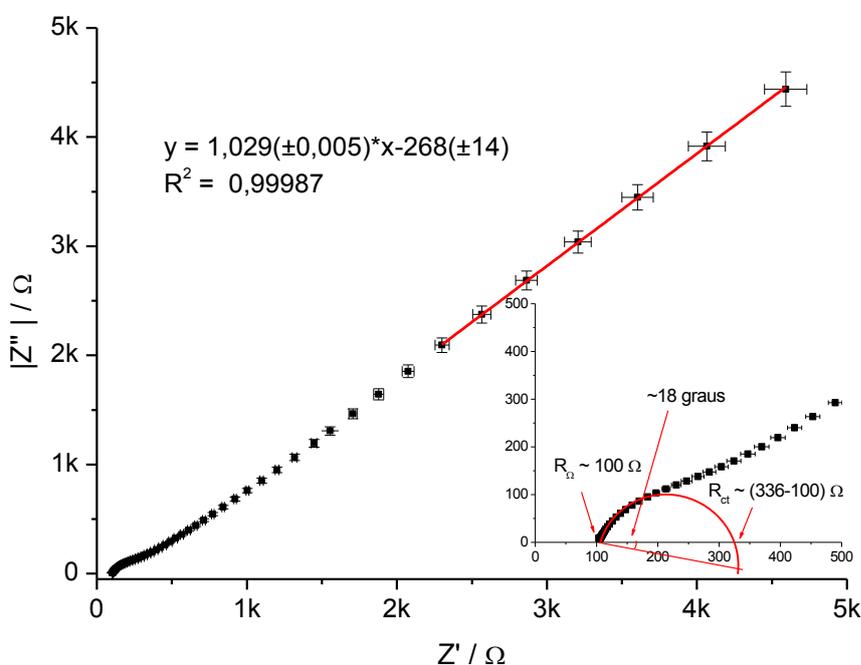


Figura 35: Gráfico de Nyquist para média de cinco medidas feitas com GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M antes da adsorção em conA.

Visivelmente no gráfico de Nyquist o comportamento linear para baixas frequências representa o elemento de Warburg para impedância difusional semi-infinita, caracterizado pela relação $Z' = |Z''|$, resultando em uma reta de coeficiente angular próximo a 1 para baixas frequências. Uma resistência da solução em torno de 100Ω domina a parte real da impedância a altas frequências, e a suave curvatura no gráfico de Nyquist pode ser interpretada como resultado de um processo redox que possui uma barreira de ativação proporcional à $R_{ct} \sim 236 \Omega$. A inclinação deste arco de aproximadamente 18° revela que usar um capacitor como elemento de circuito levaria a ajustes inadequados. Neste caso um elemento de fase constante seria necessário para considerar este comportamento, que resulta do fato de que $\alpha \neq 1$. Como a análise gráfica empregada na seção anterior não permite a extração dos parâmetros referentes a uma interface reativa, decidimos estudar o presente sistema implementando um ajuste não-linear dos dados para um circuito equivalente apropriado. Um circuito que emprega todos os elementos acima descritos é o apresentado na Figura 12(b) (Randles com CPE ao invés de um capacitor ideal). Os dados foram ajustados através do software Zview, e a comparação entre os dados experimentais e os previstos pelo modelo pode ser feita pela observação do gráfico de Bode na Figura 36.

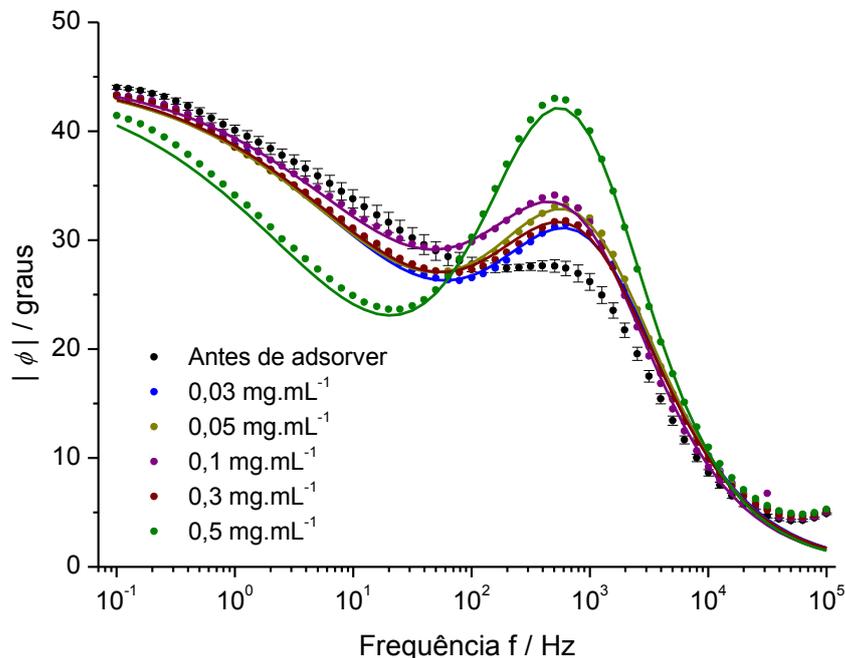


Figura 36: Gráfico de Bode para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M em que os dados experimentais (pontos) são comparados com resultado de ajuste não-linear (linhas) para o modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 12(b). Os dados antes da adsorção são apresentados como uma média de cinco medidas e os respectivos intervalos de confiança.

Os ajustes para as medidas de impedância antes da adsorção foram feitos independentemente, e posteriormente as médias dos valores dos parâmetros obtidos foram calculadas. A avaliação dos ajustes é feita por meio do gráfico de Bode porque os pontos obtidos para diferentes frequências são igualmente espaçados, permitindo ver com mais clareza a qualidade do ajuste do que pela observação de gráficos de Nyquist, por exemplo. Os ajustes apresentaram $5 \times 10^{-4} < \chi^2 < 7 \times 10^{-4}$ mesmo considerando o fato de que o ajuste inclui um artefato de alta frequência acima de 10^4 Hz, o que indica que o modelo escolhido descreve bem o comportamento geral dos dados.

Os parâmetros médios para os ajustes dos dados de antes da adsorção foram $R_{\Omega} = 103 \pm 3 \Omega$, $R_{ct} = 237 \pm 17 \Omega$, $\sigma = (2,03 \pm 0,09) \times 10^{-4} \text{ s}^{1/2} \cdot \Omega^{-1}$, $\alpha = 0,78 \pm 0,01$ e $Q = (1,0 \pm 0,3) \times 10^{-5} \text{ s}^{0,78} \cdot \Omega^{-1}$. A média de 237Ω para a resistência de transferência de carga pode ser usada para estimar a área do eletrodo antes da adsorção, usando $k^0 \sim 2 \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (estimada na página 62) na Eq. 19:

$$A = [(F / RT) F R_{ct} k^0 C^*]^{-1}$$

$$A = [38,920 \text{ C} \cdot \text{J}^{-1} \times 96485,4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1} \times 237 \text{ V} \cdot \text{J} \cdot \text{s} \cdot \text{C}^{-2} \times 2 \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \times (1 \text{ L} / 10^3 \text{ cm}^3)]^{-1}$$

$$A = 0,06 \pm 0,02 \text{ cm}^2$$

Uma área dentro da esperada de $0,071 \text{ cm}^2$, considerando os erros, que foram calculados pela equação de propagação de erros para multiplicação/divisão.

No gráfico de R_{ct} vs. c_p^0 podemos observar um aumento da variável dependente com a quantidade de conA adsorvida no gráfico da Figura 37.

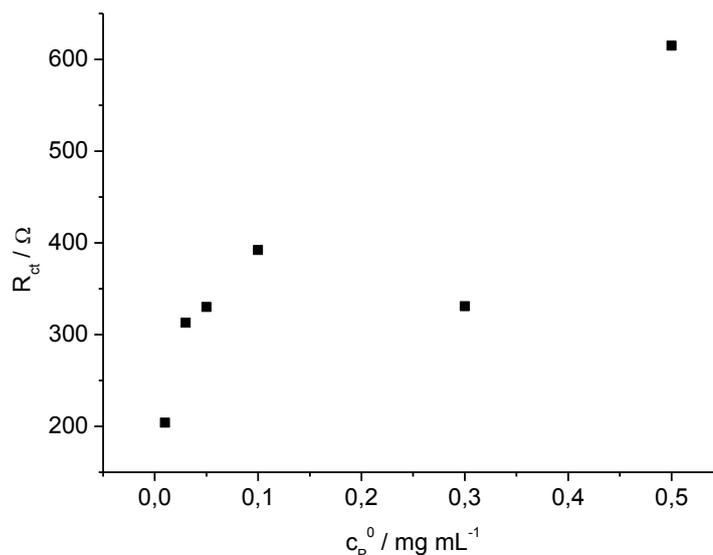


Figura 37: Resistência de transferência de carga obtida por ajuste não-linear do circuito equivalente da Figura 12(b) nos dados obtidos para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M em função da concentração de conA em solução usada na adsorção.

O gráfico da Figura 37 assemelha-se qualitativamente ao de ΔE vs. c_p^0 apresentado na Figura 33. Isso possivelmente indica uma coerência nos experimentos executados, uma vez que as medidas de voltametria e de impedância são técnicas independentes. Adicionalmente, tanto ΔE quanto R_{ct} aumentam quando k^0 decresce em função da adsorção. Os valores de R_{ct} no gráfico acima aumentam para maiores valores de c_p^0 , como discutido anteriormente pela observação dos arcos em alta frequência do gráfico de Nyquist da Figura 34(a). No entanto, aparentemente a faixa de concentração não é alta o bastante para que um patamar em R_{ct} seja alcançado. O máximo valor de R_{ct} , em torno de 600Ω para $c_p^0 = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, é relativamente baixo quando comparado com valores encontrados na literatura, como por exemplo para adsorção de conA em platina, de $\sim 6 \text{ k}\Omega$ [107]. Este fato se deve a uma baixa adsorção da proteína nas condições empregadas, como observado previamente por meio das medidas de capacitância e das voltametrias cíclicas na presença de sonda redox. Tendo em vista que este fator dificulta a obtenção de medidas consistentes de quantidade de proteína adsorvida, pois apresentam comportamento muito próximo da adsorção de impurezas e do comportamento em NaCl 0,15 M sem proteína (branco), objetivou-se aumentar a eficiência da adsorção modificando o preparo da superfície do eletrodo.

Testamos diferentes condições do preparo do eletrodo, referidas como C1 (limpeza idêntica à usada até o momento), C2, C3 e C4, descritas na Tabela 1. Diferente de C1, as metodologias C2, C3 e C4 empregam algum procedimento oxidativo, ampliando a janela de potencial para valores mais positivos na voltametria cíclica em H_2SO_4 0,5 M, e acrescentando ou não um pós-condicionamento do eletrodo na mesma solução, aplicando um potencial constante de 1,1 V por 5 ou 10 minutos. A adsorção de conA foi realizada da mesma maneira que antes, pela submersão do eletrodo por 5 minutos em uma solução $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, realizando-se medidas de impedância e voltametria cíclica (na mesma ordem relatada anteriormente) antes e depois da adsorção.

As voltametrias cíclicas para diferentes tratamentos do eletrodo são apresentadas na Figura 38.

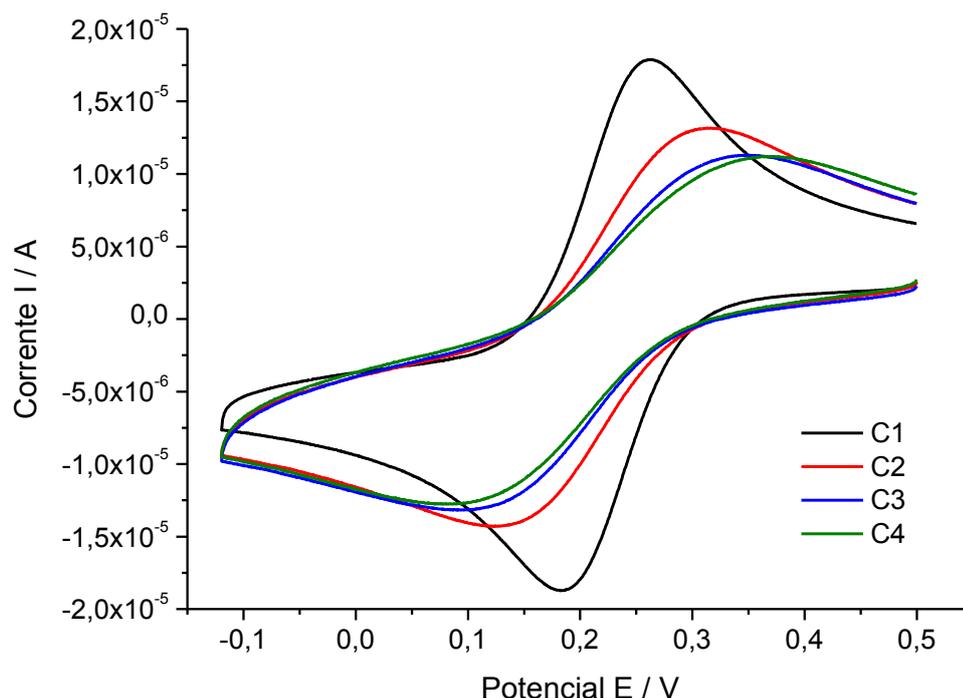


Figura 38: Voltamogramas cíclicos em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e NaCl 0,15 M para diferentes condições de preparo do GCE, observações feitas depois da adsorção de conA em solução $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Fica claro pelos gráficos acima que os tratamentos a altos potenciais, especialmente com pós-condicionamento, aumentam consideravelmente ΔE para reação do par redox após a adsorção da proteína. Esta diminuição da reversibilidade na transferência de elétrons pode ser atribuída ao aumento na quantidade de proteína adsorvida. Enquanto que a quantidade de proteína adsorvida após C1 diminui k^0 em 4 vezes, os tratamentos anódicos promovem um aumento no recobrimento o suficiente para que k^0 diminua em aproximadamente 40 vezes. Observa-se também uma queda das correntes de pico catódico e anódico, devido à obstrução causada pela proteína na interface.

Dentre os tratamentos oxidativos, os que empregaram uma cronoamperometria em 1,1 V levaram a uma adsorção mais eficiente em comparação aos outros. Para estudos posteriores nós escolhemos o tratamento C3, que consiste numa voltametria cíclica entre -0,2 e 1,5 V, seguida de cronoamperometria por 5 minutos. Uma das primeiras observações que fizemos a respeito desta metodologia é que os resultados de voltametria e de impedância para medidas repetidas apresentavam um grande dispersão antes e depois da adsorção da proteína. Isso pode ser constatado pelos gráficos de Bode da Figura 39, medidos nas mesmas condições:

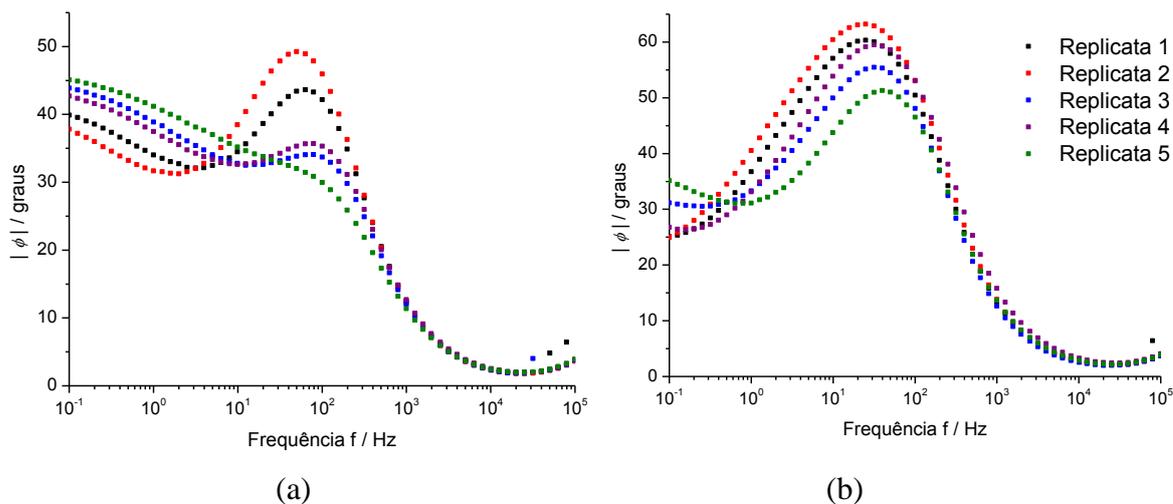


Figura 39: Gráficos de Bode para medidas repetidas em GCE e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M obtidas (a) antes e (b) depois da adsorção de conA em solução 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos primeiros testes com tratamento C3.

A princípio cogitou-se que a dispersão dos resultados *antes da adsorção* influenciava na falta de repetitividade dos dados obtidos *após a adsorção*. Porém o acréscimo de cuidado no tratamento do eletrodo frente à adsorção de impurezas permitiu uma grande diminuição na dispersão dos gráficos de impedância (e voltametria) antes da adsorção, enquanto que a dificuldade em controlar a repetitividade após a adsorção permaneceu, e nós atribuímos isso a desnaturação da proteína. Isso porque, como mostraremos posteriormente, essa dispersão é maior para maiores valores de c_p^0 .

Realizamos ensaios usando a mesma concentração de proteína (0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), porém fazendo medidas sequenciais de voltametria e impedância para observarmos se ocorreria uma diminuição em R_{ct} ou em ΔE após um certo número de medidas, sinalizando uma desorção da proteína. Três destas medidas consecutivas são apresentadas na Figura 40, em comparação com um experimento no qual a solução de proteína é substituída por água Milli-Q, como um branco.

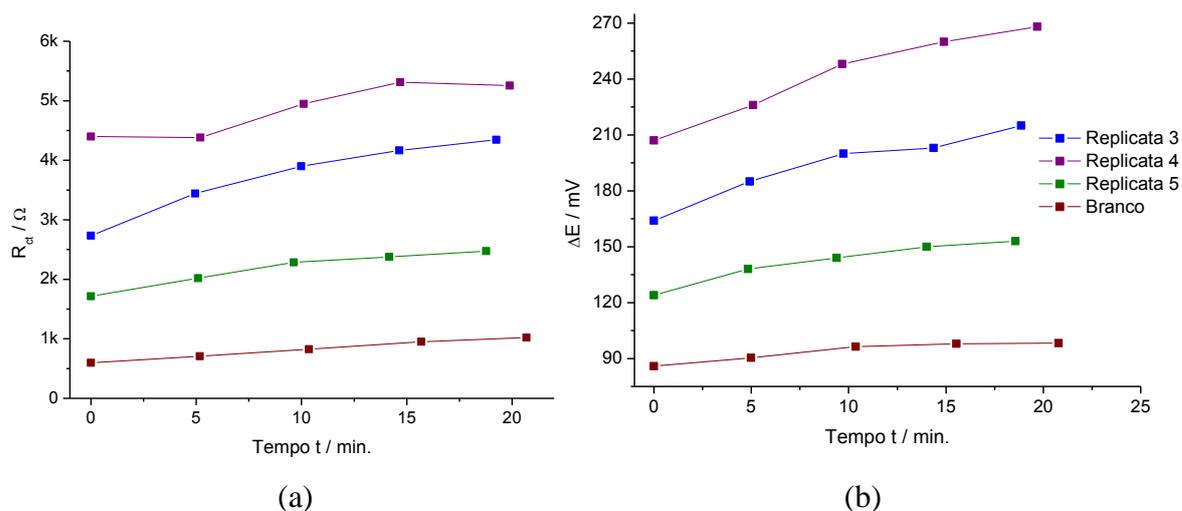


Figura 40: Medidas seqüenciais de impedância e voltametria após submersão do GCE em conA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Replicatas 3-5) ou água Milli-Q (Branco), acompanhadas por mudanças em (a) R_{ct} e (b) ΔE segundo análise de dados obtidos em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl $0,15 \text{ M}$.

Observa-se que ΔE e R_{ct} aumentam mesmo sem proteína. Isso provavelmente ocorre devido à adsorção de impurezas no decorrer da aquisição dos dados [192]. Para o eletrodo com proteína adsorvida observa-se que na terceira medida sequencial (após algo em torno de 15 minutos) R_{ct} parece alcançar um patamar. Isso pode ser um indício de a proteína chega a um limite em que a desnaturação já não influencia mais tanto na área disponível para transferência de elétrons no eletrodo. As variações em ΔE também exibem esse comportamento, porém com um patamar menos pronunciado. Como não se verificou diminuição de R_{ct} ou de ΔE nesta faixa temporal acreditamos que a quantidade de proteína desorvida é mínima até então. Cogitou-se que mesmo com R_{ct} aumentando a desorção poderia ocorrer de modo que a desnaturação cobrisse a área rapidamente de modo a “mascarar” o efeito das moléculas que desorvem. No entanto a velocidade de desorção de proteínas é usualmente muito menor do que a de desnaturação [247].

3.3.2 - Pseudo-isoterma

Com a constatação de que a quantidade de proteína desorvida é mínima, continuamos com análises *ex-situ* da camada adsorvida em soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O modelo apresentado no ANEXO D permite estabelecer uma relação entre R_{ct} e o recobrimento (θ), de acordo com a seguinte equação:

$$\theta = \left(\frac{R_{\theta=1}}{R_{\theta}} \right) \left(\frac{R_{\theta} - R_{\theta=0}}{R_{\theta=1} - R_{\theta=0}} \right) \quad \text{Eq. 34}$$

em que R_{θ} , $R_{\theta=1}$ e $R_{\theta=0}$ são as resistências de transferência de carga à um dado recobrimento, com o eletrodo saturado de proteína e após o eletrodo ter sido submetido a uma solução salina isenta de proteína pelo mesmo tempo em que R_{θ} é obtido (branco), respectivamente. Fazendo a aproximação de que $R_{\theta=1} \gg R_{\theta=0}$, a Eq. 34 converte-se na Eq. 30. Ou seja, a Eq. 30 pode ser usada como uma aproximação caso não se tenha acesso a $R_{\theta=1}$, embora se suponha que seja suficientemente grande em relação à $R_{\theta=0}$.

Aplicando a condição oxidativa escolhida anteriormente (C3), realizamos a adsorção da conA a partir de soluções com diferentes concentrações da proteína (entre 0,01 e 0,2 mg·mL⁻¹, além do branco, empregando NaCl 0,15 M) por um tempo de 10 minutos. Ajustes não-lineares baseados no modelo de circuito equivalente da Figura 12(b) foram feitos e, dentre outros parâmetros, extraiu-se a resistência de transferência de carga. Os ajustes levaram a valores de χ^2 em torno 6×10^{-4} , e alguns deles são comparados com os valores experimentais na Figura 41. O gráfico das resistências obtida dos ajustes em função da concentração de conA é mostrado na Figura 42, com todas as replicatas.

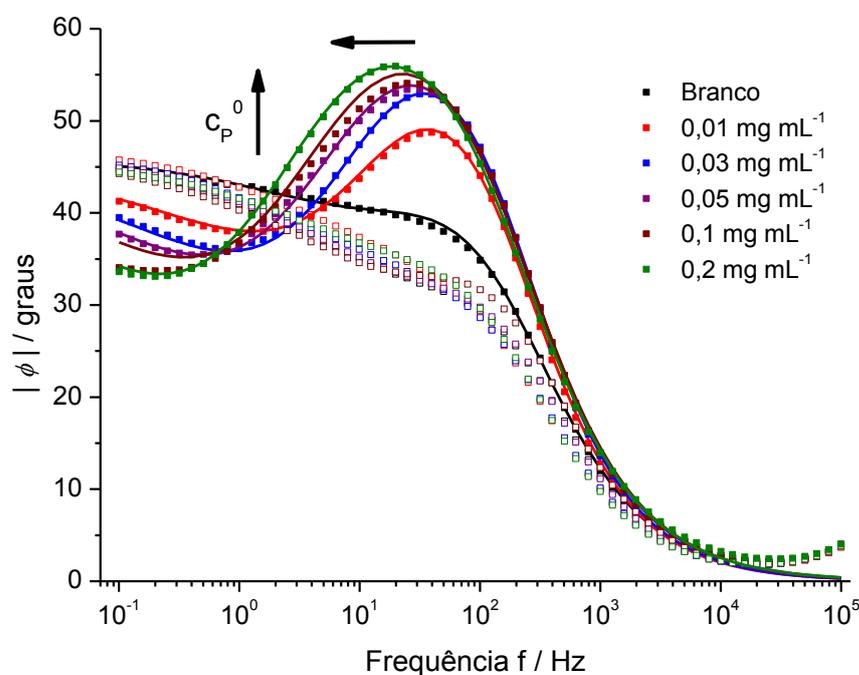


Figura 41: Gráficos de Bode para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M antes (\square) e depois (\blacksquare) da adsorção em soluções de conA em diferentes concentrações (diferente cores).

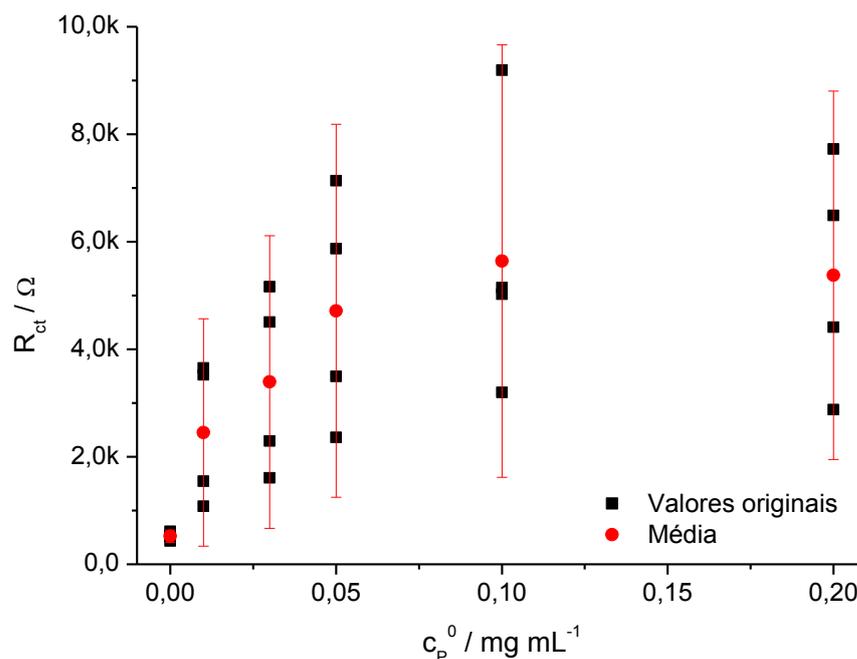


Figura 42: Resistências de transferência de carga em função da concentração de conA, calculadas pelo ajuste do modelo representado na Figura 12(b), a partir de dados de GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M.

O gráfico de Bode da Figura 41 apresenta uma tendência do ângulo de fase no ponto de máximo aumentar com a concentração de proteína, bem como de se deslocar para frequências menores. Este comportamento, observado anteriormente em eletrodo não-oxidado, foi atribuído ao aumento de R_{ct} promovido pela interferência da adsorção na reação entre $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Para justificar porque é razoável afirmar que a mudança na capacitância tem efeito secundário neste deslocamento, consideramos que a frequência onde o máximo ângulo de fase é observado, chamada frequência característica (f_0), é inversamente proporcional ao tempo de relaxação, τ_0 . Como a impedância de Warburg influencia a impedância em baixas frequências, o tempo de relaxação do processo faradáico é descrito pela equação $\tau_0 = R_{ct} \cdot C_d$ (consideramos $C_d = C_0$) [248]. A capacitância da interface tipicamente decresce com a adsorção de proteínas. Um decréscimo na capacitância da interface decorrente de uma maior quantidade de moléculas adsorvidas promoveria um deslocamento de f_0 para valores maiores, não menores, pois $f_0 \propto 1/\tau_0 \propto 1/C_0$. Como este fato não é observado, acredita-se que a influência da variação na resistência de transferência de carga é superior.

Observa-se na Figura 42 que a medida em que se emprega uma concentração inicial de conA cada vez maior, há um aumento da resistência de transferência de carga. Este efeito, como discutido anteriormente, possivelmente se deve ao aumento da energia de ativação no

processo redox pela obstrução que a proteína causa ao aderir à superfície. Nota-se que após 10 minutos em NaCl 0,15 M a resistência $R_{\theta=0}$ fica em torno de $0,5 \pm 0,1 \text{ k}\Omega$ (95% de confiança). Se assumirmos que o patamar referente à saturação do eletrodo para uma dada concentração é alcançado em $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, o valor de $R_{\theta=1}$ seria de $5 \pm 3 \text{ k}\Omega$. Os grandes intervalos de confiança são reflexo do pequeno número de medidas e da grande variação nos valores de resistência aludidos anteriormente. Verifica-se na Figura 42 uma tendência de que maiores valores de c_p^0 (e R_{θ}) impliquem uma maior variação dos resultados. A isso creditamos o efeito da desnaturação irregular das moléculas de proteína, que tem um efeito tão maior quanto mais moléculas dificultam a reação do par redox de sonda. Independente disso, aparentemente $R_{\theta=0}$ fica em torno de 10% do valor de $R_{\theta=1}$, o que talvez justificasse o uso da Eq. 30 (válida para $R_{\theta=1} \gg R_{\theta=0}$). No entanto, devido ao fato de uma equação de descrição mais ampla (Eq. 34) ter seus parâmetros acessíveis, a empregamos para obter o recobrimento em função da concentração de proteína, resultando no gráfico da Figura 43.

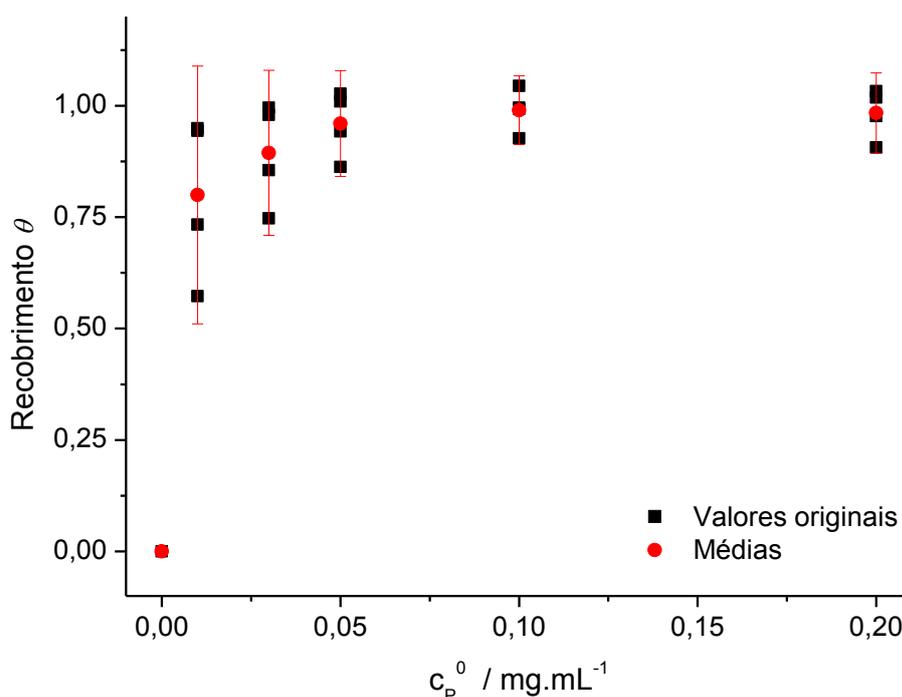


Figura 43: Recobrimento segundo Eq. 34 em função da concentração de conA na solução em que o GCE foi submerso por 10 minutos.

Como o tempo de 10 minutos de adsorção é relativamente pouco quando comparado com as abordagens encontradas na literatura, em que geralmente a adsorção se estende por horas, consideramos a princípio este tipo de gráfico como uma pseudo-isoterma. De qualquer modo é notável que mesmo a baixas concentrações de proteína o recobrimento é próximo do

máximo, caracterizando uma adsorção de alta-afinidade. Pode-se verificar que, em oposição às medidas de resistência de transferência de carga, a dispersão aumenta para *menores* concentrações de proteína. Isso ocorre porque no modelo (Eq. 34) o valor do recobrimento é inversamente proporcional a R_θ , o mesmo ocorrendo na Eq. 30 (não usada até o momento). Se assumirmos que o ponto de saturação na adsorção da proteína leva a um revestimento completo do eletrodo, o valor de para $\theta = 1$ implica, segundo a Eq. 3, que $\Gamma(\theta = 1) = \Gamma_S = (a \cdot N_A)^{-1}$ no máximo de adsorção para monocamada. Usando a estimativa de $a = 33,75 \text{ nm}^2$ (“side-on”) obtemos uma densidade superficial em torno de $5 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ou $1,3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ (usando $M = 25622,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [2]). Este valor está dentro do esperado para a adsorção de uma proteína globular [38], mas é uma estimativa baseada na premissa de que há um recobrimento completo da superfície no ponto de saturação.

Para uma avaliação mais mecanística dos dados referentes à pseudo-isoterma, consideramos que a dependência de θ com c_p^0 pode refletir um comportamento cinético específico para o tempo de adsorção fixo $t_0 = 10$ minutos. Após este intervalo de tempo é razoável afirmar que a limitação da adsorção não é mais controlada difusionalmente, inclusive evidências serão posteriormente apresentadas confirmando esta premissa. Segue-se, portanto, que processos como adsorção e desorção dominam a velocidade da reação. Porém o processo desortivo não foi detectado nesta escala de tempo nos experimentos previamente discutidos (Figura 40), de modo que a adsorção deve dominar o processo. O modelo mais simples que considera a adsorção como limitante da reação é o de uma transformação irreversível (com constante de velocidade k_1) da molécula de proteína trazida por difusão, P , em uma espécie caracteristicamente adsorvida na superfície S , $(P-S)$. De acordo com a Eq. 11, que expressa o comportamento cinético segundo este mecanismo, espera-se que o $\theta = 1 - \exp\{-(t_0 \cdot k_1) c_p^0\}$, com c_p^0 proporcional a $[P]_0$, e o ajuste do modelo aos dados é apresentado na Figura 44, com o modelo em vermelho e as bandas de predição (onde se esperaria encontrar futuros valores com 95% de confiança) em azul.

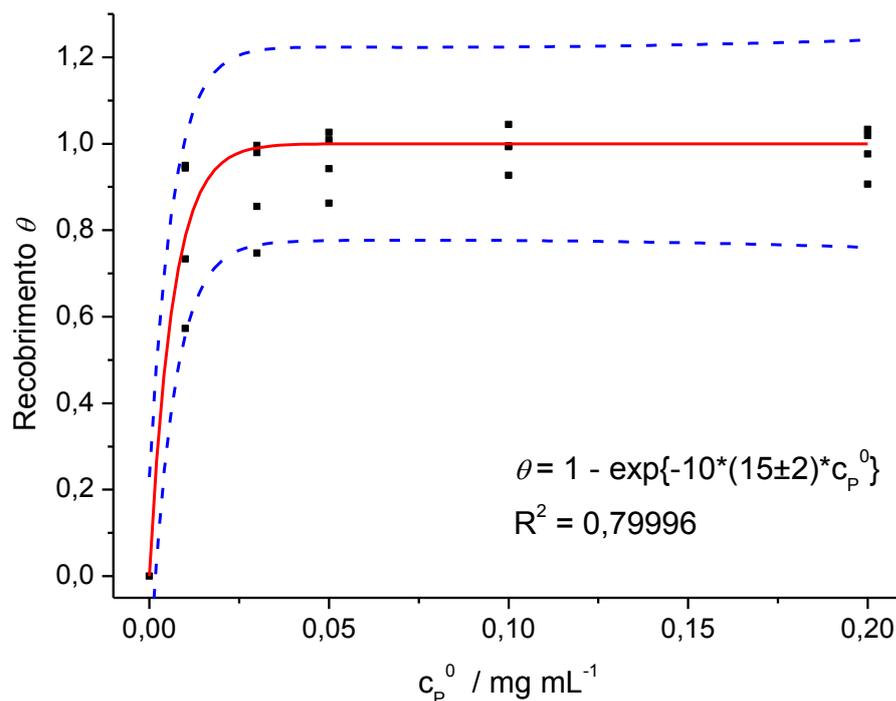


Figura 44: Modelo cinético segundo mecanismo $P+S \xrightarrow{k_1} P-S$ ajustado nos dados obtidos em condições pseudo-isotérmicas, em que a adsorção ocorre por um tempo fixo de 10 minutos.

Observa-se pela Figura 44 que o modelo aparentemente parece satisfatório, embora muitos outros possam o ser. Com o intuito não de provar estatisticamente sua validade (para este conjunto de dados), mas de possivelmente descartá-lo como possibilidade de mecanismo plausível, realizou-se o teste da falta de ajuste, cuja descrição mais detalhada é apresentada no APÊNDICE B.2. Em poucas palavras, ele permite verificar se a variância (informação) não explicada difere (num certo nível de significância) da dispersão natural do sistema. Caso as variâncias sejam consideradas significativamente distintas, algum comportamento sistemático não explicado pelo modelo precisa ser considerado na equação de ajuste, caso contrário o modelo é considerado não ajustado. No presente caso, $F = 0,784$, que é menor que o tabelado 2,901 (95% de confiança), de modo que as variâncias da falta de ajuste e do erro puro não são distinguíveis neste nível de confiança, e o modelo está ajustado. Não podemos descartá-lo, portanto, empregando esta ferramenta. Rigorosamente outras avaliações estatísticas do modelo devem ser feitas, mas para o presente fim nos deteremos a esta, considerando-a suficiente para permitir uma interpretação físico-química dos resultados.

O ajuste da Eq. 12 (cinética de Langmuir) aos dados acima resultou em valores de $k_1 \gg k_{-1}$, como esperado para uma adsorção praticamente irreversível. Na verdade, para $k_1 \gg k_{-1}$, a

Eq. 12 se converte na Eq. 11. A Eq. 14 é indistinguível da Eq. 11 pela variação de c_p^0 , e alguns comentários sobre o modelo sequencial de duas etapas devem ser feitos. Apesar de seu extensivo uso na literatura através de uma equação com duas funções exponenciais, recomenda-se cuidado em sua aplicação. Isto porque supõe-se que $\theta = \theta_1 + \theta_2$, sendo θ_1 e θ_2 os recobrimentos referentes às formas P_1 e P_2 , respectivamente. As equações diferenciais que descrevem este sistema geralmente são expressas como se segue:

$$\frac{d\theta_1}{dt} = k_1(1-\theta) - k_2\theta_1$$

$$\frac{d\theta_2}{dt} = k_2\theta_1$$

A primeira falha nesta descrição está na independência da primeira etapa ($P \xrightarrow{k_1} P_1$) com a concentração de proteína na solução, $[P]_0$. Modificando a primeira equação diferencial para incluir esta dependência:

$$\frac{d\theta_1}{dt} = k_1[P]_0(1-\theta) - k_2\theta_1$$

$$\frac{d\theta_2}{dt} = k_2\theta_1$$

Observe que, se $\theta = \theta_1 + \theta_2$, as equações acima se reduzem à mesma que governa o processo de primeira ordem previamente ajustado aos dados (Eq. 11):

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{d\theta_1}{dt} + \frac{d\theta_2}{dt} = k_1[P]_0(1-\theta) - k_2\theta_1 + k_2\theta_1 = k_1[P]_0(1-\theta)$$

Deste modo a aplicação deste modelo sequencial de duas etapas levaria ao sequencial de uma etapa se a soma dos recobrimentos é tomada como medida do recobrimento total. Obviamente que a resolução da equação acima fornece uma dependência de θ com t envolvendo uma função exponencial, não a soma de duas. Em função destas considerações, os parâmetros do ajuste da Eq. 11 nos dados de cinética são os únicos discutidos a seguir.

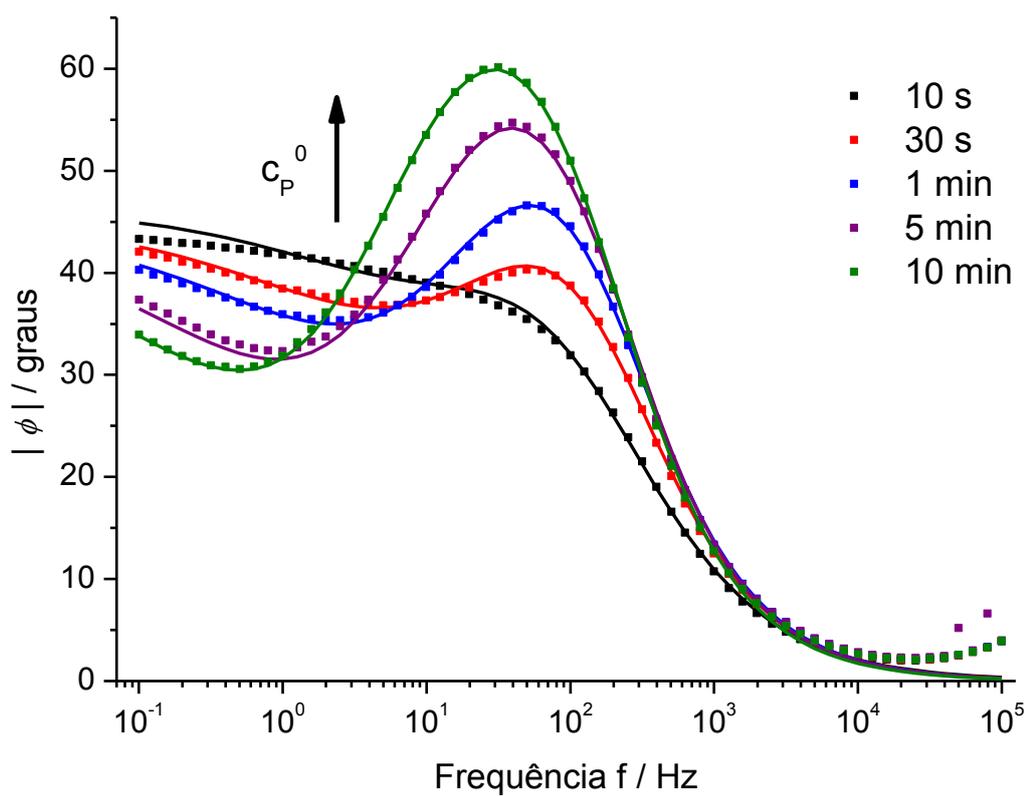
Uma constante de velocidade de $15 \pm 2 \text{ (mg}\cdot\text{mL}^{-1})^{-1} \text{ min}^{-1}$ implica um tempo de meio recobrimento de 28 segundos para adsorção realizada em uma solução $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de conA, ou de 4,6 minutos para adsorção em $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando que uma escolha $t_0 = 10$

minutos leva a condições aproximadamente isotérmicas de adsorção da conA em GC, pois a adsorção é muito rápida. Este fato foi observado de outra maneira pelo nosso grupo, pois na tentativa de fazer medidas de adsorção em diferentes intervalos de tempo, a imersão do eletrodo em uma solução $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de conA por 1 minuto já levou a um perfil de impedância muito próximo ao dos gráficos para tempos um pouco mais longos, como 5 minutos. Uma alternativa cogitada no intuito de verificar a cinética de adsorção propriamente dita foi a redução de c_p^0 . Empregamos, portanto, soluções $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, e os resultados que obtivemos neste tipo de experimento são apresentados na seção seguinte.

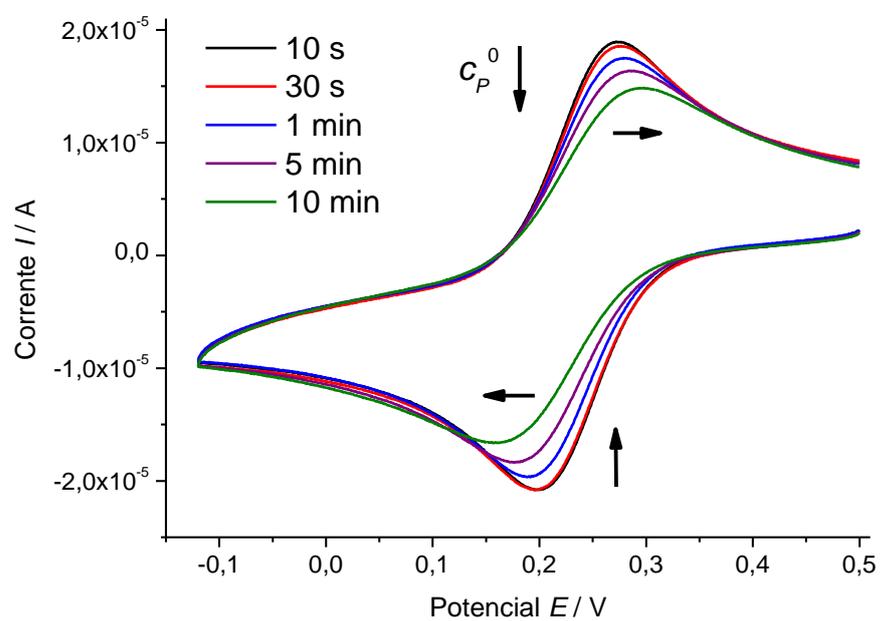
As estimativas do modelo ajustado para a pseudo-isoterma mostram que, no tocante a adsorção da conA desmetalizada, a adsorção em carbono vítreo é eficiente no eletrodo oxidado. Segundo este modelo, não são necessários longos intervalos de tempo para alcançar as proximidades da saturação do eletrodo, tornando mais práticos estudos em condições de equilíbrio, ou para aplicações de filmes protéicos, especialmente porque a adsorção é rápida e a desorção é mínima.

3.3.3 – Cinética de adsorção

Realizamos a adsorção de conA no GCE submergindo-o em uma solução de concentração $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por diferentes intervalos de tempo, e depois fazendo as medidas em uma solução com o par redox, como descrito mais detalhadamente na seção 2.4.3 (Tabela 2). Os primeiros resultados de impedância e voltametria (realizadas nesta ordem após a adsorção) são apresentados na Figura 45(a) e 45(b), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 45: (a) Gráficos de Bode (com ajustes) e (b) voltametrias cíclicas obtidas para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl 0,15 M depois da adsorção de conA 0,01 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por diferentes intervalos de tempo.

No gráfico de Bode pode-se observar um aumento gradativo no sinal referente à transferência de elétrons do par redox, em função da diminuição da velocidade da reação pela obstrução causada pelas moléculas de proteína, o que também se reflete no aumento de ΔE para maiores concentrações de proteína adsorvida. A corrente trocada na interface diminui, o que leva ao abaixamento das correntes de pico catódico e anódico, como se observa na Figura 45(b).

Através do ajuste não-linear dos dados apresentados na Figura 45(a) (mais algumas outras medidas) para o circuito de Randles com CPE foi possível estimar os valores de R_{ct} referentes a cada um dos ensaios. Pode-se, portanto, obter θ de acordo com a Eq. 34, usando o mesmo $R_{\theta=1}$ na análise da pseudo-isoterma (seção 3.3.2) e tomando como $R_{\theta=0}$ a resistência do menor valor medido, após 10 s de adsorção. O gráfico de θ em função de t é apresentado na Figura 46.

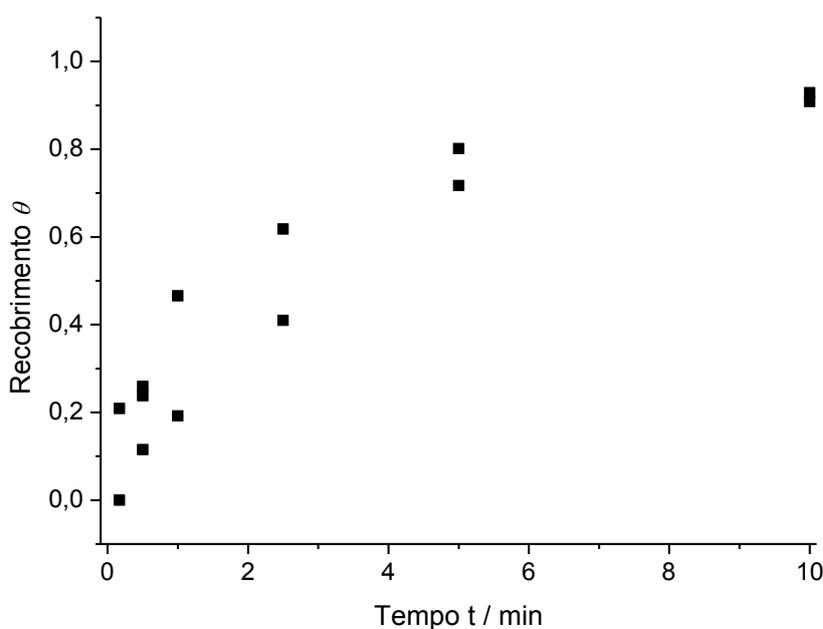


Figura 46: Recobrimento segundo Eq. 34 para diferentes tempos de imersão do GCE em conA 0,01 mg·mL⁻¹.

O gráfico de θ em função de t mostra o crescimento do recobrimento na medida em que o eletrodo passa mais tempo em contato com a solução, mas a partir de 5 minutos aparentemente há o começo de uma limitação na quantidade de proteína adsorvida, caracterizada por um patamar para tempos mais elevados. Para verificar influências do transporte difusional na adsorção, observamos um gráfico de θ vs. $t^{1/2}$ e constatamos um comportamento linear até 5 minutos. Isso implica que o transporte difusional limita a velocidade da reação até este intervalo de tempo, que é relativamente longo considerando os

dados de Dulm e Norde ($\sim 0,5$ min) [157], mas equivalente ao encontrado por Young et al. na adsorção de fibrogênio [140]. O gráfico de θ vs. $t^{1/2}$ neste intervalo de tempo é apresentado na Figura 47, juntamente com um modelo linear que mostrou-se ajustado para este conjunto de dados ($F = 0,014 < 4,757 = F_0$).

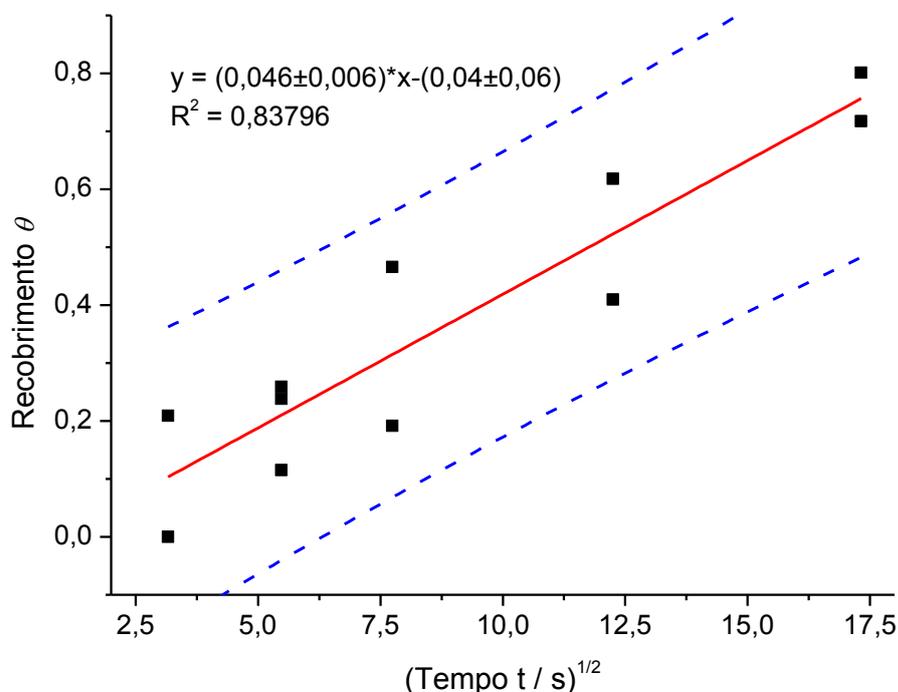


Figura 47: Gráfico de θ , obtido a partir da Eq. 34, em função de $t^{1/2}$ para os dados obtidos até 5 minutos de adsorção, com linha vermelha indicando o ajuste linear e linha tracejada evidenciando os intervalos de predição do modelo.

A presença do transporte difusional permite a aplicação da Eq. 7 para a obtenção do coeficiente de difusão da proteína a partir do coeficiente angular do modelo linear ajustado acima. Porém vamos usá-la em conjunção com a Eq. 3 para obter a área de contato da proteína. Espera-se que para o dímero seja em torno de $33,75 \text{ nm}^2$ [40] (maior área representada na Figura 4(b)) e para o tetrâmero podemos considerá-lo inferior ao dobro disso, ou seja, entre $33,75$ e $67,5 \text{ nm}^2$. Considerando o coeficiente de difusão do tetrâmero igual a $5,20 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e o previamente citado de $6,20 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para o dímero [249], o coeficiente angular de $0,046$ obtido implica que $a = 44 \text{ nm}^2$ para a adsorção de dímeros e $a = 96 \text{ nm}^2$ para de tetrâmeros. Enquanto que a área de contato estimada para o dímero é próxima do esperado, a do tetrâmero excede em muito, de modo que se ele se dividisse em dímeros ($a \sim 67,5 \text{ nm}^2$) chegaria próximo de $2/3$ da área obtida no cálculo. Este fato é uma evidência do previamente presumido pelas condições da solução: que dímeros (ao menos majoritariamente) são responsáveis pela adsorção observada. Esta área de contato que obtivemos também pode

ser usada para uma medida mais apurada da densidade superficial no patamar estimada em torno de $1,3 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ para aproximadamente $1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ (substituindo $a = 33,75 \text{ nm}^2$ por 44 nm^2).

Na tentativa de modelar toda a curva da Figura 46 testamos o modelo da Eq. 14, porém o ajuste não mostrou-se satisfatório. Isso implica que em baixas concentrações o acoplamento entre transporte difusional com um processo de primeira ordem não descreve a adsorção da conA em carbono vítreo. Em altas concentrações e tempos de adsorção, entretanto, verificou-se pelos dados da pseudo-isoterma que o processo irreversível descreve bem o recobrimento em função da concentração de conA. Ou seja, para diferentes concentrações de proteína os mecanismos parecem ser distintos, ilustrando a complexidade envolvida no estudo da adsorção destes polímeros.

3.3.4 – Investigando o efeito da oxidação

Comparando os resultados da adsorção de conA em GC a partir de uma solução $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pôde-se constatar que ocorre um aumento considerável da interação da proteína com o eletrodo após o procedimento oxidativo. Esta comparação é feita nos gráficos de Bode da Figura 48, após adsorção 10 minutos (com duplicatas).

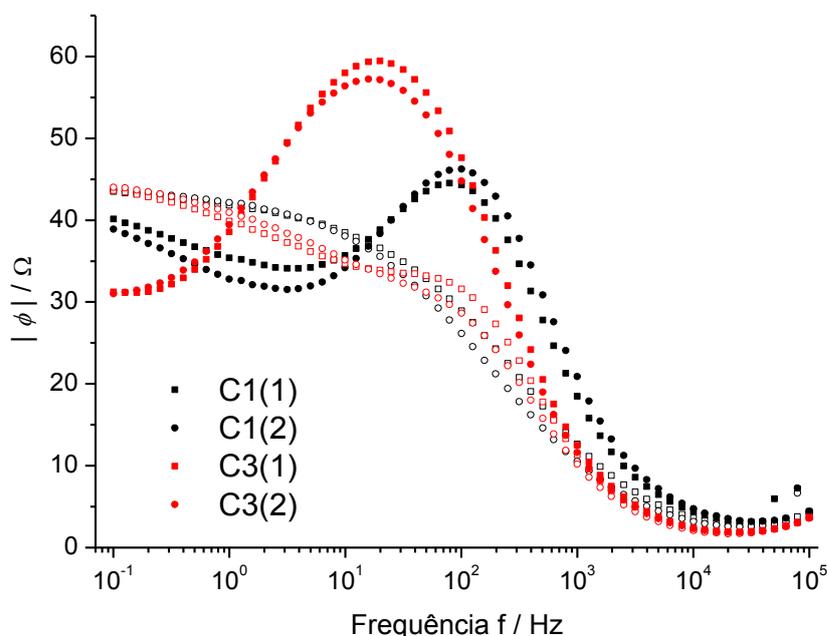
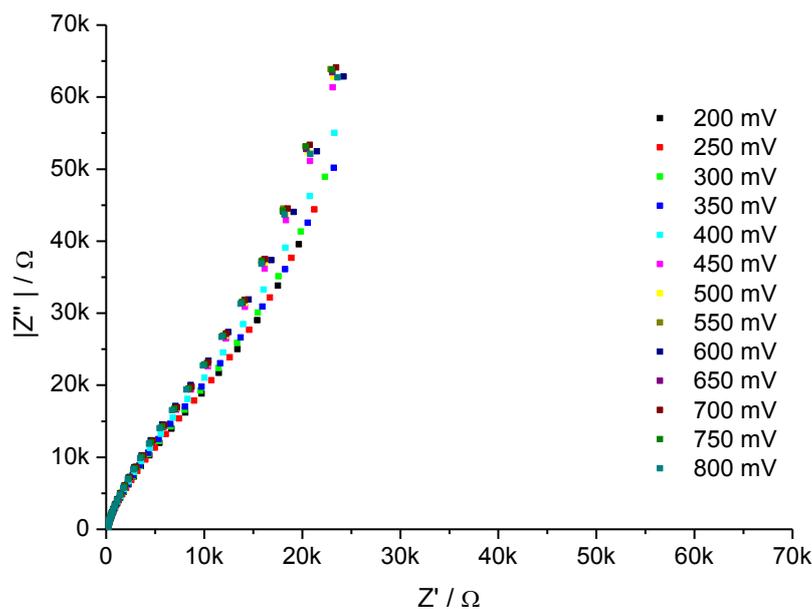


Figura 48: Gráficos de Bode para GCE em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM e NaCl $0,15 \text{ M}$ após procedimentos C1 ou C3, antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da adsorção em conA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 10 minutos.

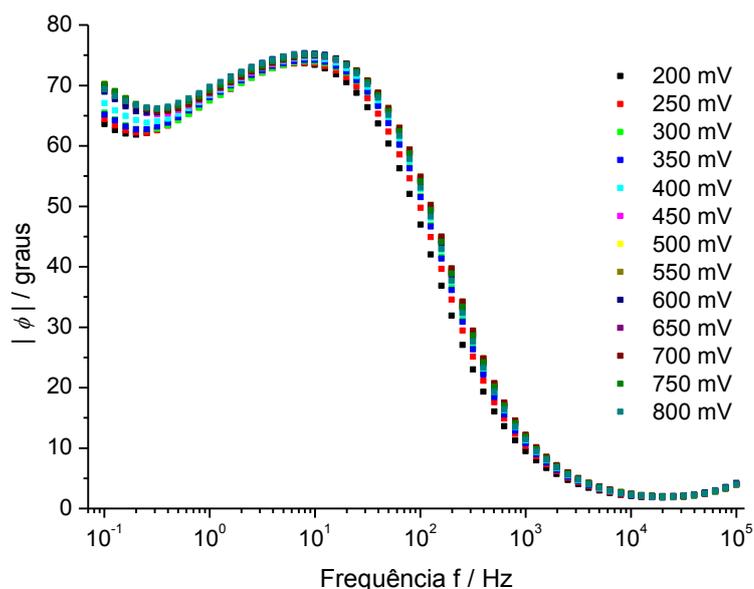
Os gráficos de Bode mostram uma grande diferença na quantidade de proteína adsorvida em função do procedimento adotado. Por haver mais proteína no eletrodo previamente oxidado, a resistência de transferência de carga estimada após a adsorção é muito superior à verificada após o procedimento C1. Outra consequência é um deslocamento na frequência característica (f_0) para valores menores. No entanto este deslocamento é superior ao observado nos experimentos anteriores, variando-se c_p^0 . Como o tempo de relaxação $\tau_0 \propto 1/f_0$, mas é diretamente proporcional à capacitância C_0 , uma diminuição em f_0 pode ser resultante da elevação da capacitância, além da resistência. Esta hipótese parece consistente, considerando que a capacitância aumenta muito após o procedimento oxidativo, como será mostrado mais adiante.

Como citado anteriormente na seção 1.2, a oxidação do GCE aumenta a sua hidrofilicidade pela formação de grupos funcionais oxigenados como carbonilas e carboxilas. Deste modo o aumento na quantidade de conA adsorvida pode ser resultante do aumento da *hidrofilicidade da superfície* devido à oxidação. Por outro lado deve-se considerar que o aumento do número de grupos funcionais poderia implicar um *maior número de ligações químicas*, supondo que estas fossem formadas, entre grupos na superfície e as moléculas de proteína. Ou ainda um resultado dos dois efeitos, hidrofilicidade e ligação química. Uma maneira de testar estas possibilidades seria tentando-se remover a proteína com uma solução de surfactante, como Dong et al. [98] procederam em superfícies de germânio, de modo que a desorção da conA indicaria uma adsorção física.

Considerando a formação de espécies redox na interface, realizamos o procedimento de oxidação C3 e logo após executamos medidas de impedância em NaCl 0,15 M (sem par redox como sonda) em diferentes E_{DC} . Os gráficos de Nyquist e Bode são apresentados nas Figuras 49(a) e 49(b), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 49: Gráficos de (a) Nyquist e (b) Bode para GCE em NaCl 0,15 M após oxidação do eletrodo através do tratamento C3.

Pode-se observar claramente que existe uma distinção entre os gráficos da Figura 15, obtidos a partir do eletrodo não-oxidado, e os da Figura 49. Os gráficos de Nyquist da Figura 49(a) apresentam uma curvatura semelhante à observada na presença de processos redox, e o comportamento a baixas frequências se assemelha ao observado em interfaces bloqueantes. Isto não é observado em eletrodos não-oxidados, cujo comportamento linear no gráfico de Nyquist revela a não existência de grupos eletroativos na interface (Figura 15(b)). Os gráficos

de Bode na Figura 49(b) também apresentam bandas similares às observadas na presença de reações na interface, porém num ângulo de fase elevado a baixas frequências. Interpreta-se que grupos funcionais formados na interface sejam responsáveis por este comportamento.

A abordagem gráfica para obtenção da capacitância empregada na seção 3.2.1 pode ser usada para interfaces reativas e bloqueantes, portanto extraímos as capacitâncias após a oxidação do eletrodo a partir dos gráficos de $\log |Z''|$ vs. $\log \omega$, escolhendo uma faixa de alta frequência (fora do artefato), exemplificados pelo ajuste para $E_{DC} = 500$ mV apresentado na Figura 50.

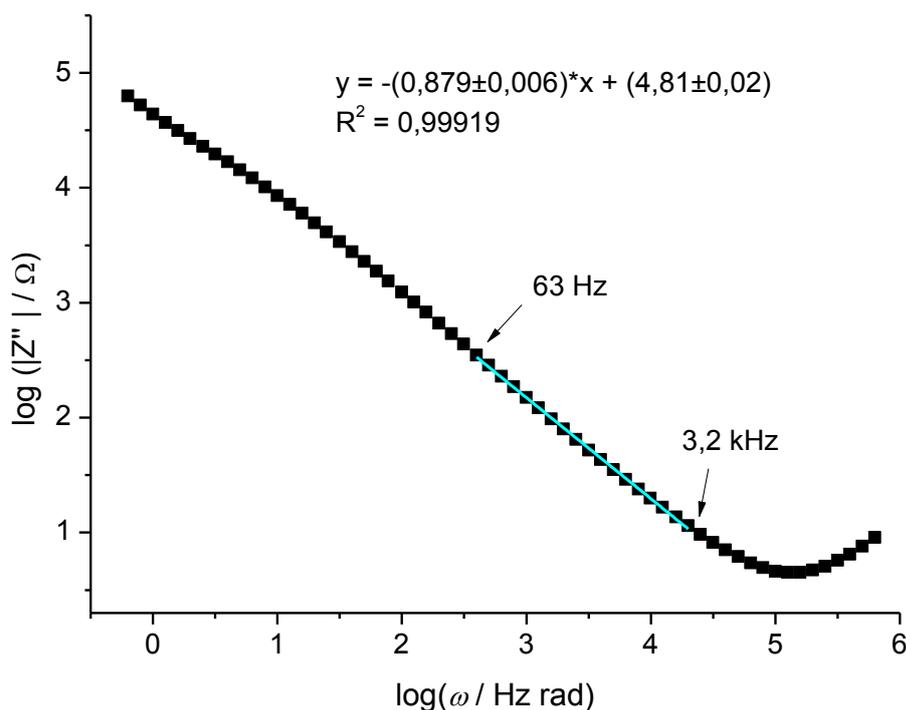


Figura 50: Gráfico de $\log |Z''|$ vs $\log \omega$ para GCE em NaCl 0,15 M e $E_{DC} = 500$ mV após procedimento oxidativo C3.

Empregando a abordagem anteriormente utilizada para o caso de interface bloqueante (pelo uso da Eq. 32), calculamos os valores de Q e de α para a faixa de potenciais estudada. A faixa de frequência usada foi de ~60 à 3 kHz. Os gráficos de Q e de α em função do potencial antes da adsorção de conA são apresentados e comparados com os dados sem oxidação (mostrados anteriormente na seção 3.2.1) nas Figuras 51(a) e 51(b), respectivamente.

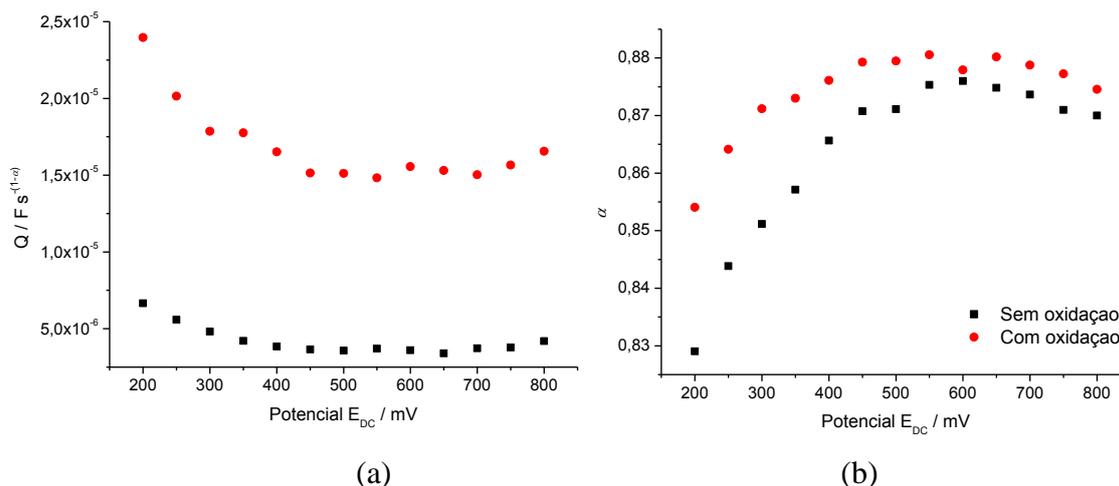


Figura 51: Gráficos de (a) Q e (b) α obtidos para o GCE em NaCl 0,15 M, com eletrodo submetido ou não previamente à oxidação.

Observa-se que os valores de Q para o eletrodo oxidado seguem um perfil próximo ao do eletrodo não-oxidado, mas com valores superiores. Os valores de α para o eletrodo oxidado são ligeiramente superiores aos do eletrodo não-oxidado, indicando que a dispersão da capacitância no primeiro é menor, representando uma superfície energeticamente mais uniforme. Por outro lado a influência dos tratamentos na dispersão se aproxima em potenciais em torno do máximo em 600 mV (potencial de mínima capacitância entre 200 e 800 mV para eletrodo não-oxidado).

Os valores de capacitância calculados segundo a Eq. 23 para o eletrodo submetido ao tratamento C3 são comparados com os obtidos para o eletrodo não-oxidado na Figura 52.

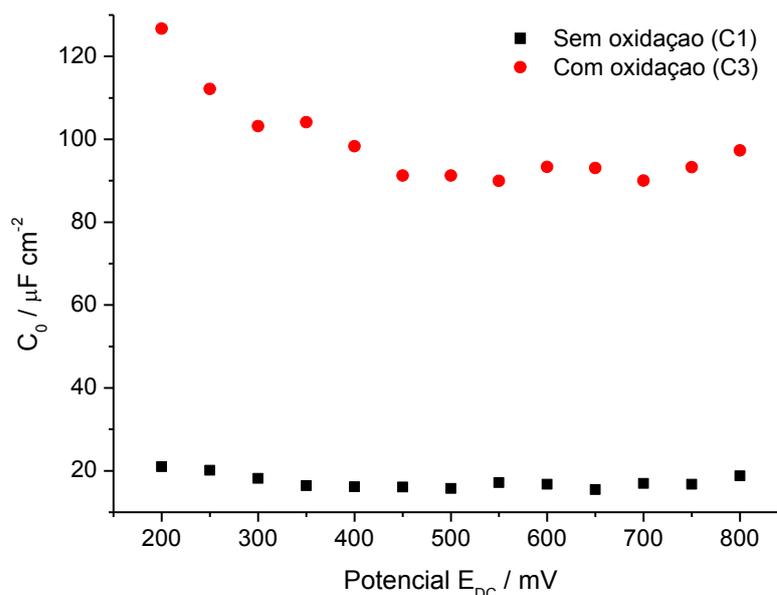


Figura 52: Capacitância para GCE em NaCl 0,15 M para eletrodo submetido ou não ao procedimento oxidativo C3.

Confirma-se pelos resultados apresentados na Figura 52 que a capacitância após a oxidação aumenta muito. Podemos considerar que há um aumento da carga armazenada no eletrodo na forma de grupos funcionais em diferentes estados de oxidação e protonação, resultado no efeito observado. Ou seja, além do efeito da hidrofiliicidade, também seria possível que grupos funcionais carregados pudessem contribuir de maneira relevante para o aumento da adsorção da proteína após a oxidação. Tendo em vista esta última possibilidade realizamos ensaios descritos na seção 3.3.5.

3.3.5 – Investigando efeito da carga da superfície durante adsorção

Para estudar o efeito da carga da interface na quantidade de proteína adsorvida no eletrodo após certo intervalo de tempo, a adsorção foi conduzida numa interface eletrificada. Isso foi realizado aplicando diferentes potenciais elétricos (em relação ao RE) no momento da imersão do eletrodo numa solução de conA. As condições experimentais são melhor descritas na seção 2.4.3 (Tabela 2), mas as medidas foram realizadas empregando um eletrodo de referência conectado por um capilar à solução de proteína, e um fio de ouro como CE (ver Figura 13). Para obter o recobrimento a partir deste tipo de experimento tivemos que fazer algumas considerações. Como acreditamos que para diferentes potenciais a máxima quantidade de proteína não é necessariamente a mesma, provavelmente $R_{\theta=1} = h(E)$, de modo que deveríamos fazer uma isoterma para cada potencial para estimar o cada valor de $R_{\theta=1}$ e

assim empregar a Eq. 34 para obter o recobrimento. No entanto, supondo que $R_{\theta=1} \gg R_{\theta=0}$ em todos os potenciais, poderíamos empregar a Eq. 30 como uma aproximação (para mais detalhes, consultar dedução no ANEXO D). Nesta equação só é necessária a medida de R_{θ} e de $R_{\theta=0}$. Por isso além de executarmos medidas da adsorção (numa concentração de conA igual a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), realizamos ensaios para obter a resistência de transferência de carga após o eletrodo ter sido submetido ao mesmo potencial por 10 minutos, porém em NaCl $0,15 \text{ M}$ (para obter $R_{\theta=0}$). O mesmo foi feito, naturalmente, com soluções de proteína, e após o procedimento as medidas de impedância e voltametria na presença do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foram realizadas. Os potenciais aplicados ficaram entre 0 mV a 1100 mV , e os resultados das resistências medidas após a adsorção e dos recobrimentos em função do potencial são mostrados na Figura 53(a) e 53(b), respectivamente.

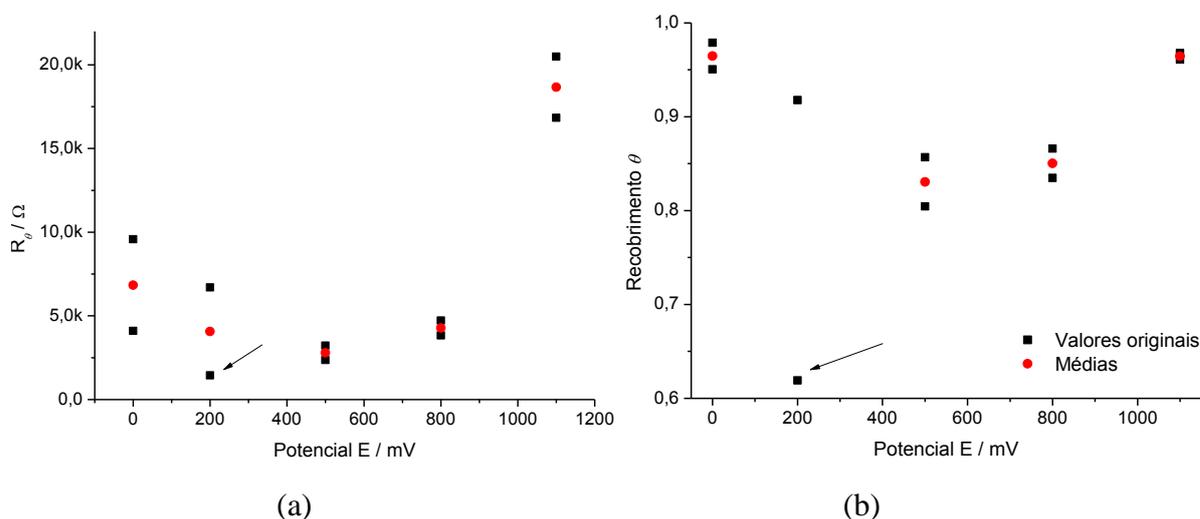


Figura 53: Valores de (a) R_{θ} e (b) θ para diferentes potenciais aplicados no momento da adsorção em conA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 10 minutos

A Figura 53(a) mostra que os valores de resistências de transferência de carga variam mais para potenciais extremos, o que pode se dever a influência de reações paralelas discutidas na seção 3.2.1, especialmente a reação de redução de oxigênio em baixos potenciais e da oxidação da superfície em elevados potenciais. Um dos valores de resistência observado foi muito baixo, na faixa de $1,5 \text{ k}\Omega$, e como $R_{\theta=0} \sim 0,5 \text{ k}\Omega$ neste caso, o valor de θ obtido foi anormalmente baixo, um pouco acima de 0,6. Pela observação da Figura 53(b) observamos que seu comportamento se diferencia da tendência inerente aos outros pontos, sendo portanto desconsiderando nas discussões subsequentes.

Nos gráficos da Figura 53 observa-se que os valores médios de resistência em função do potencial, bem como do recobrimento, apresentam um mínimo entre 500 e 600 mV, que pode

estar relacionado com o mínimo de capacitância observado tanto no eletrodo oxidado quanto no não-oxidado. Se de fato estiver, a variação do recobrimento com o potencial ser semelhante ao perfil de capacitância vs. potencial é um indício de que a *adsorção não é controlada pela carga*, caso contrário mais carga levaria a uma maior (ou menor) quantidade de proteína adsorvida de maneira contínua (sem mínimos). Resultados similares foram obtidos por Mieke et al. [250], mostrando que a adsorção de lisozima em diferentes potenciais em ouro tinha perfil muito próximo às medidas de capacitância, interpretando de maneira similar, que a carga não era o fator mais influente na quantidade de proteína adsorvida. Isso indica que a conA, quase neutra, tem adsorção promovida pela hidrofiliicidade da superfície.

Para finalizar, pretendemos discutir se os resultados apresentados nas seções precedentes permitem avaliar se a conA é uma proteína “soft” ou “hard”. Em proteínas “soft” a parte interna da proteína se expõe a superfícies hidrofóbicas, liberando as moléculas de água instáveis na superfície sem desestabilizar a parte interna da proteína, também hidrofóbica. Neste caso a adsorção é dominada pelo aumento de entropia do sistema. Como a conA adsorve mais em superfícies hidrofílicas, a interação entre a parte externa da proteína com a superfície é a responsável pela adsorção. Esta interação é forte o suficiente para retirar as moléculas de água fortemente ligadas à superfície hidrofílica. Ou seja, nestas condições é preferível que a conA maximize as interações com a superfície minimizando, porém, a exposição da parte apolar interna. Isso limita a desnaturação da proteína, mantendo certa estabilidade estrutural, o que não ocorre na adsorção de proteínas “soft”. Deste modo a proteína seria considerada “hard”. Para proteínas “hard”, a adsorção ocorre majoritariamente por interações eletrostáticas, às vezes só ocorrendo quando proteína e superfície possuem cargas opostas. Porém no pH estudado a conA é aproximadamente neutra, de modo que a carga da superfície não surtiria efeito na adsorção. Comprovamos este fato nos experimentos descritos nesta seção, onde a adsorção é realizada em diferentes potenciais. Para futuros experimentos seria preferível estudar a adsorção em pH baixo, em torno de 4, sendo possível obter a proteína positivamente carregada e, caso ela fosse “hard”, o aumento do potencial levaria a uma menor quantidade adsorvida (repulsão eletrostática superfície-proteína), enquanto que baixos potenciais levariam a uma maior adsorção.

Do ponto de vista estrutural as folhas β pregueadas são formadas por interações entre as fitas β ao longo de toda a estrutura da proteína. Este fato confere estabilidade à mesma frente à desnaturação pois múltiplas ligações de hidrogênio entre as fitas sustentam sua estrutura. Este fator provavelmente confere propriedades diferenciais a conA e outras lectinas no

tocante a adsorção quando comparadas com outras proteínas, e provavelmente levam a conA a adotar um comportamento do tipo “hard”.

As considerações acima são particularmente interessantes na construção de biosensores, pois a proteína adsorvida deve manter certa atividade, o que implica que deve ter certa estabilidade estrutural. A interação entre a proteína e açúcares, por exemplo, não poderia ser usada com esta finalidade se a proteína fosse “soft”.

4 - Conclusões

A adsorção da conA foi realizada em carbono vítreo, e diferentes parâmetros obtidos a partir da espectroscopia de impedância eletroquímica foram usados para quantificar a proteína adsorvida e para observar a influência de alguns fatores no processo adsorptivo. Pela observação da capacitância e sua dispersão após a adsorção em função da variação do potencial vs. Ag/AgCl obteve-se recobrimento de 23% constante entre 200 mV e 800 mV. A dispersão na capacitância relativa à proteína aumenta para maiores potenciais e estabiliza em 600 mV, possivelmente devido à reorientação do dipolo elétrico da conA. A dispersão na energia entre diferentes estados de moléculas polarizadas levaria a um aumento na dispersão na capacitância.

Em interface reativa, usando uma sonda redox, verificou-se que a adsorção aumenta consideravelmente após a anodização do eletrodo (por meio de voltametria cíclica e cronoamperometria em H₂SO₄ 0,5 M). Esta constatação é particularmente interessante no desenvolvimento de biosensores, pois a quantidade de proteína adsorvida deve ser suficientemente grande para que a sensibilidade da técnica seja apreciável. A superfície de carbono vítreo mostra-se, portanto, versátil na construção de dispositivos eletroquímicos baseados em camadas protéicas.

Escolhendo-se um dos pré-tratamentos oxidativos, variou-se a concentração das soluções de conA, e a partir de uma pseudo-isoterma constatou-se que a cinética da adsorção é de primeira ordem. O mecanismo difere em baixas concentrações, como pôde-se verificar através do recobrimento em diferentes tempos de adsorção, o processo mostrando-se controlado por difusão. As medidas de cinética permitiram verificar que as moléculas adsorvidas são majoritariamente diméricas. A adsorção por 10 minutos em soluções de conA com concentrações superiores à 0,01 mg·mL⁻¹ é o suficiente para obter a saturação do eletrodo oxidado, informação útil para o desenvolvimento multicamadas protéicas com a proteína, tema de estudos recentes.

Medidas de impedância após a oxidação revelaram um grande aumento na capacitância e indícios de espécies eletroativas geradas na superfície. Experimentos com adsorção conduzida em diferentes potenciais mostraram uma aparente correlação entre o recobrimento e a capacitância, indicando que a carga da interface não controla a adsorção. Acredita-se, portanto, que a diminuição na hidrofobicidade do eletrodo após a formação dos grupos seja o fator responsável pelo aumento da adsorção após tratamento anódico.

A preferência da conA por superfícies hidrofílicas mostra que é energeticamente mais favorável para proteína adsorver menos em superfícies hidrofóbicas, no caso carbono não-oxidado, do que desnaturar o suficiente para expor sua parte interna hidrofóbica. Esta característica, bem como a estrutura peculiar da proteína, remete a sua estabilidade estrutural, de modo que ela provavelmente deve ser classificada como sendo do tipo “hard”.

5 – Referências

- [1] Campbell, M. K., Farrell, S. O., Bioquímica, Vol. 1 - Bioquímica Básica, Tradução da 5. ed. norte-americana, Thomson Learning, São Paulo, 2007. p. 88.
- [2] Bouckaert, J., Dewallef, Y., Poortmans, F., Wyns, L., Loris, R., The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19778–19787 (2000).
- [3] Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 33–38 (1996).
- [4] Creighton, T. E., Protein - Structures and Molecular Properties, 2. ed., W. H. Freeman and Company. 1993. p. 1.
- [5] Hinderliter, A., Almeida, P. F. F., Creutz, C. E., Biltonen, R. L., Domain formation in a fluid mixed lipid bilayer modulated through binding of the C2 protein motif. *Biochemistry* **40**, 4181–4191, 2001.
- [6] Kotwal, A., Schmidt, C. E., Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials* **22**, 1055–1064, 2001.
- [7] Quiquampoix, H., Burns, R. G., Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* **3**, 401–406, 2007.
- [8] Lee, J. H., Jeong, B. J., Lee, H. B., Plasma protein adsorption and platelet adhesion onto comb-like PEO gradient surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **34**, 105–114, 1997.
- [9] Ihlenfeld, J. V., Mathis, T. R., Riddle, L. M., Cooper, S. L., Measurement of transient thrombus deposition on polymeric materials. *Thrombosis Research* **14**, 953–967, 1979.
- [10] Vogler, E. A., Siedlecki, C. A., Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* **30**, 1857–1869, 2009.
- [11] Gombotz, W. R., Guanghai, W., Horbett, T. A., Hoffman, A. S., Protein adsorption to poly (ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **25**, 1547–1562, 1991.
- [12] Albrektsson, T., Brånemark, P-I., Hansson, H.-A., Kasemo, B., Larsson, K., Lundström, I., McQueen, D. H., Skalak, R., The interface zone of inorganic implants *in vivo*: titanium implants in bone. *Annals of Biomedical Engineering* **11**, 1–27, 1983.
- [13] Nanci, A., Wuest, J. D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S., Mckee, M. D., Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of Biomedical Materials Research* **40**, 324–335, 1998.

- [14] Siqueira, W. L., Custodio, W., McDonald, E. E., New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *Journal of Dental Research* **91**, 1110–1118, 2012.
- [15] Visser, J., Jeurnink, Th. J. M., Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Experimental Thermal and Fluid Science* **14**, 407–424, 1997.
- [16] Changani, S. D., Belmar-Beiny, M. T., Fryer, P. J. Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Experimental Thermal and Fluid Science* **14**, 392–406, 1997.
- [17] Ho, C.-C., Zydney, A. L., Protein Fouling of Asymmetric and Composite Microfiltration Membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **40**, 1412–1421, 2001.
- [18] Hjorth, R., Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends in biotechnology* **15**, 230–235, 1997.
- [19] Vasina, E. N., Paszek, E., Jr., D. V. N., Nicolau, D. V., The BAD project: data mining, database and prediction of protein adsorption on surfaces. *Lab on Chip* **9**, 891–900, 2009.
- [20] Xu, Y., Takai, M., Ishihara, K., Phospholipid Polymer Biointerfaces for Lab-on-a-Chip Devices. *Annals of Biomedical Engineering* **38**, 1938–1953, 2010.
- [21] Aijian, A. P., Chatterjee, D., Garrell, R. L., Fluorinated liquid-enabled protein handling and surfactant-aided crystallization for fully *in situ* digital microfluidic MALDI-MS analysis. *Lab on Chip* **12**, 2552–2559, 2012.
- [22] Dimakis, V. T., Gavalas, V. G., Chaniotakis, N. A., Polyelectrolyte-stabilized biosensors based on macroporous carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* **467**, 217–223, 2002.
- [23] Zoungrana, T., Findenegg, G. H., Norde, W., Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes. *Journal of Colloid and Interface Science* **190**, 437–448, 1997.
- [24] Song, Y.-Y., Li, Y., Yang, C., Xia, X.-H., Surface electric field manipulation of the adsorption kinetics and biocatalytic properties of cytochrome c on a 3D macroporous Au electrode. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **390**, 333–341, 2008.
- [25] Wisniewski, N., Reichert, M., Methods for reducing biosensor membrane biofouling, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **18**, 197–219, 2000.
- [26] Hucknall, A., Kim, D.-H., Rangarajan, S., Hill, R. T., William, M. R., Chilkoti, A., Simple Fabrication of Antibody Microarrays on Nonfouling Polymer Brushes with Femtomolar Sensitivity for Protein Analytes in Serum and Blood. *Advanced Materials* **21**, 1968–1971, 2009.
- [27] Wahlgren, M., Arnebrant, T., Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in Biotechnology* **9**, 201–208, 1991.

- [28] Penners, G., Priel, Z., Silberberg, A., Irreversible adsorption of triple-helical soluble collagen monomers from solution to glass and other surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **80**, 437–444, 1981.
- [29] Krisdhasima, V., McGuire, J., Sproull, R., Surface hydrophobic influences on β -lactoglobulin adsorption kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science* **154**, 337–350, 1992.
- [30] Norde, W., Adsorption Of Proteins From Solution At The Solid-Liquid Interface. *Advances in Colloid and Interface Science* **25**, 267–340, 1986.
- [31] Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S., Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **162**, 87–106, 2011.
- [32] Blanco, E. M., Horton, M. A., Mesquida, P., Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns. *Langmuir* **24**, 2284–2287, 2008.
- [33] Bergman, A. A., Buijs, J., Herbig, J., Mathes, D. T., Demarest, J. J., Wilson, C. D., Reimann, C. T., Baragiola, R. A., Hull, R., Oscarsson, S. O., Nanometer-Scale Arrangement of Human Serum Albumin by Adsorption on Defect Arrays Created with a Finely Focused Ion Beam. *Langmuir* **14**, 6785–6788, 1998.
- [34] Rechendorff, K., Hovgaard, M. B., Foss, M., Zhdanov, V. P., Besenbacher, F., Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness. *Langmuir* **22**, 10885–10888, 2006.
- [35] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235–242, 2000.
- [36] Adamson, A. W., Gasp, A. P., Physical Chemistry of Surfaces, 6. ed., John Wiley & Sons. USA, 1997. p. 339–400.
- [37] Haynes, C. A., Norde, W., Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2**, 517–566, 1994.
- [38] Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K., On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**, 233–244, 2001.
- [39] Ramsden, J., Puzzles and paradoxes in protein adsorption, *Chemical Society Reviews* **24**, 73–78, 1995.
- [40] Waner, M. J., Gilchrist, M., Schindler, M., Dantus, M., Imaging the Molecular Dimensions and Oligomerization of Proteins at Liquid/Solid Interfaces. *The Journal of Physical Chemistry B* **102**, 1649–1657, 1998.
- [41] Norde, W., Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces: I. Adsorption isotherms. Effects

- of charge, ionic strength, and temperature. *Journal of Colloid and Interface Science* **66**, 257–265, 1978.
- [42] Arai, T., Norde, W., The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surfaces* **51**, 1–15, 1990.
- [43] Norde, W., Macritchie, F., Nowicka, G., Lyklema, J., Protein Adsorption at Solid-Liquid Interfaces: Reversibility and Conformation Aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* **112**, 447–456, 1986.
- [44] Norde, W., Favier, J. P., Structure of adsorbed and desorbed proteins. *Colloids and surfaces* **64**, 87–93, 1992.
- [45] Talasaz, A. H., Nemat-Gorgani, M., Liu, Y., Ståhl, P., Dutton, R. W., Ronaghi, M., Davis, R. W., Prediction of protein orientation upon immobilization on biological and nonbiological surfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 14773–14778, 2006.
- [46] Andrade, J. D., Hlady, V., Wei, A. P., Adsorption of complex proteins at interfaces, *Pure and Applied Chemistry* **64**, 1777–1781, 1992.
- [47] Neves-Petersen, M. T., Petersen, S. B., Protein electrostatics: a review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules—applications in biotechnology. *Biotechnology Annual Review* **9**, 315–395, 2003.
- [48] Dong, F., Olsen, B., Baker, N. A., Computational methods for biomolecular electrostatics. *Methods in cell biology* **84**, 843–870, 2008.
- [49] Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., McCammon, J. A., Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10037–10041, 2001.
- [50] Ivarsson, B., Hegg, P.-O., Lundström, K. I., Jönsson, U., Adsorption of proteins on metal surfaces studied by ellipsometric and capacitance measurements. *Colloids and Surfaces* **13**, 169–192, 1985.
- [51] Guo, B., Anzai, J.-I., Osa, T., Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and the effects of electrode potential. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **44**, 800–803, 1996.
- [52] Brusatori, M. A., Tie, Y., Van Tassel, P. R., Protein Adsorption Kinetics under an Applied Electric Field: An Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy Study. *Langmuir* **19**, 5089–5097, 2003.
- [53] Peretz, Y., Yarnitzky, C. N., Determination of the pzc at solid electrodes with a dropping electrolyte electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **498**, 87–92, 2001.
- [54] Leikis, D. I., Rybalka, K. V., Sevastyanov, E. S., Frumkin, A. N., Determination of the potentials of zero charge of solid metals by means of differential capacity measurements. *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **46**, 161–169, 1973.

- [55] Barclay, D. J., Chemical softness and specific adsorption at electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **9**, 318–321, 1968.
- [56] Wroblowa, H., Kovac, Z., Bockris, J. O'M., Isotherms and related data in the electro-adsorption of certain ions on mercury. *Transactions of the Faraday Society* **61**, 1523–1548, 1965.
- [57] Van der Linden, W. E., Dieker, J. W., Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* **119**, 1–24, 1980.
- [58] Rice, R. J., Pontikos, N. M., McCreery, R. L., Quantitative correlations of heterogeneous electro-transfer kinetics with surface properties of glassy carbon electrodes. *Journal of American Chemical Society* **112**, 4617–4622, 1990.
- [59] McCreery, R. L., Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry, *Chemical Reviews* **108**, 2646–2687, 2008.
- [60] Chen, P., McCreery, R. L., Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes by Specific Surface Modification. *Analytical Chemistry* **68**, 3958–3965, 1996.
- [61] Kuo, T.-C., McCreery, R. L., Surface Chemistry and Electron-Transfer Kinetics of Hydrogen-Modified Glassy Carbon Electrodes, *Analytical Chemistry* **71**, 1553–1560, 1999.
- [62] Hu, I.-F., Karweik, D. H., Kuwana, T., Activation and Deactivation of Glassy Carbon Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **188**, 59–72, 1985.
- [63] Engstrom, R. C., Electrochemical pretreatment of glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry* **54**, 2310–2314, 1982.
- [64] Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N., What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66, 1980.
- [65] Sumner, J. B., The globulins of the jack bean, *canavalia ensiformis*. *Journal of Biological Chemistry* **37**, 137–142, 1919.
- [66] Csonka, F. A., Murphy, J. C., Jones, D. B., The iso-electric points of various proteins. *Journal of the American Chemical Society* **48**, 763–768, 1926.
- [67] Sumner, J. B., Howell, S. F., Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology* **32**, 227–237, 1936.
- [68] Sumner, J. B., Howell, S. F., Zeissig, A., Concanavalin A and hemagglutination. *Science* **82**, 65–66, 1935.
- [69] Sumner, J. B., Howell, S. F., The rôle of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin, *Journal of Biological Chemistry* **115**, 583–588, 1936.
- [70] Kalb, A. J., Levitzki, A., Metal-binding sites of concanavalin A and their role in the binding of α -methyl D-glucopyranoside. *Biochemical Journal* **109**, 669–672, 1968.

- [71] Goldstein, I. J., Hollerman, C. E., Merrick, J. M., Protein-carbohydrate interaction I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta* **97**, 68–76, 1965.
- [72] Goldstein, I. J., Hollerman, C. E., Smith, E. E., Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. *Biochemistry* **4**, 876–883, 1965.
- [73] Kalb, A., Lustig, A., The molecular weight of concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta* **168**, 366–367, 1968.
- [74] McCubbin, W. D., Kay, C. M., Molecular weight studies on concanavalin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **44**, 101–109, 1971.
- [75] Greer, J., Kaufman, H. W., Kalb, A. J., An X-ray crystallographic study of concanavalin A. *Journal of Molecular Biology* **48**, 365–366, 1970.
- [76] Hardman, K. D., Wood, M. K., Schiffer, M., Edmundson, A. B., Ainsworth, C. F., Structure of concanavalin A at 4.25-Ångström resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 1393–1397, 1971.
- [77] Quioco, F. A., Reeke, G. N., Jr., Becker, J. W., Lipscomb, W. N., Edelman, G. M., Structure of concanavalin A at 4 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 1853–1857, 1971.
- [78] Wang, J. L., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 1130–1134, 1971.
- [79] Edmundson, A. B., Ely, K. R., Sly, D. A., Westholm, F. A., Powers, D. A., Liener, I. E., Isolation and characterization of concanavalin A polypeptide chains. *Biochemistry* **10**, 3554–3559, 1971.
- [80] McKenzie, G. H., Sawyer, W. H., Nichol, L. W., The molecular weight and stability of concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta* **263**, 283–293, 1972.
- [81] Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Reeke, G. N., Jr., Becker, J. W., Waxdal, M. J., Wang, J. L., The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2580–2584, 1972.
- [82] Wang, J. L., Cunningham, B. A., Waxdal, M. J., Edelman, G. M., The covalent and three-dimensional structural of concanavalin A. I. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F₁ and F₂. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1490–1502, 1975.
- [83] Cunningham, B. A., Wang, J. L., Waxdal, M. J., Edelman, G. M., The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F₃. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1503–1512, 1975.

- [84] Hardman, K. D., Ainsworth, C. F., Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **11**, 4910–4919, 1972.
- [85] Zand, R., Agrawal, B. B. L., Goldstein, I. J., pH-dependent conformational changes of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 2173–2176, 1971.
- [86] Reeke, G. N., Jr., Becker, J. W., Edelman, G. M., The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1525–1547, 1975.
- [87] Becker, J. R., Reeke, G. N., Jr., Wang, J. L., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1513–1524, 1975.
- [88] Becker, J. W., Reeke, G. N., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A. *Nature* **259**, 406–509, 1976.
- [89] Jack, A., Weinzierl, J., Kalb, A. J., An X-ray crystallographic study of demetallized concanavalin A. *Journal of Molecular Biology* **58**, 389–395, 1971.
- [90] Shoham, M., Yonath, A., Sussman, J. L., Moulton, J., Traub, W., Kalb, A. J., Crystal structure of demetallized concanavalin A: the metal-binding region. *Journal of Molecular Biology* **131**, 137–155, 1979.
- [91] Brown, R. D., III, Brewer, C. F., Koenig, S. H., Conformation states of concanavalin A: Kinetics of transitions induced by interaction with Mn^{2+} and Ca^{2+} Ions. *Biochemistry* **16**, 3883–3896, 1977.
- [92] Koenig, S. H., Brown, R. D., III, Brewer, C. F., Sherry, A. D., Conformational equilibrium of demetalized concanavalin A: a reexamination of the kinetics of its interaction with Ca^{2+} -ions and fluorescent saccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **109**, 1047–1053, 1982.
- [93] Koenig, S. H., Brewer, C. F., Brown, R. D., III, Conformation as the determinant of saccharide binding in concanavalin A: Ca^{2+} -concanavalin A complexes. *Biochemistry* **17**, 4251–4260, 1978.
- [94] Brown, R. D., III, Koenig, S. H., Brewer, C. F., Conformational equilibrium of demetalized concanavalin A. *Biochemistry* **21**, 465–469, 1982.
- [95] Reeke, G. N., Jr., Becker, J. W., Edelman, G. M., Changes in the three-dimensional structure of concanavalin A upon demetallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2286–2290, 1978.
- [96] Brewer, C. F., Brown, R. D., III, Koenig, S. H., Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin A: a structure-function study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **1**, 961–997, 1983.

- [97] Bhattacharyya, L., Brewer, C. F., Isoelectric focusing studies of concanavalin A and the lentil lectin. *Journal of Chromatography A* **502**, 131–142, 1990.
- [98] Dong, J., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E., Xu, Z., In situ characterization of the adsorbed Concanavalin a on germanium surface at various pH. *Biotechnology Progress* **24**, 972–980, 2008.
- [99] Anzai, J.-I., Kobayashi, Y., Construction of Multilayer Thin Films of Enzymes by Means of Sugar-Lectin Interactions. *Langmuir* **16**, 2851–2856, 2000.
- [100] Kobayashi, Y., Anzai, J.-I., Preparation and optimization of bienzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **507**, 250–255, 2001.
- [101] Yao, H., Guo, X., Hu, N., Loading of myoglobin into layer-by-layer films assembled by concanavalin A and dextran based on their biospecific recognition: An electrochemical study. *Electrochimica Acta* **54**, 7330–7337, 2009.
- [102] Oliver, N. S., Toumazou, C., Cass, A. E. G., Johnston, D. G., Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine* **26**, 197–210, 2009.
- [103] Schultz, J. S., Mansouri, S., Goldstein, I. J., Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites. *Diabetes Care* **5**, 245–253, 1982.
- [104] Ballerstadt, R., Evans, C., McNichols, R., Gowda, A., Concanavalin A for in vivo glucose sensing: a biotoxicity review. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 275–284, 2006.
- [105] Kremer, F. J. B., Engbersen, J. F. J., Kruijse, J., Bergveld, P., Starmans, D. A. J., Feijen, J., Reinhoudt, D. N., Immobilization and activity of Concanavalin A on tantalum pentoxide and silicon dioxide surfaces, *Sensors and Actuators B* **13-14**, 176–179, 1993.
- [106] Diniz, F. B., Ueta, R. R., Platinum oxidation and its effect on concanavalin A adsorption. *Electrochimica Acta* **49**, 4281–4286, 2004.
- [107] Ueta, R. R., Diniz, F. B., Adsorption of concanavalin A and lentil lectin on platinum electrodes followed by electrochemical impedance spectroscopy: effect of protein state. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **61**, 244–249, 2008.
- [108] Mielczarski, J. A., Dong, J., Mielczarski, E., Real time evaluation of composition and structure of concanavalin A adsorbed on a polystyrene surface. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 5228–5237, 2008.
- [109] Everett, D. H., Manual of symbols and terminology, for physicochemical quantities and units, Appendix II, Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry, Part I. *Pure and Applied Chemistry* **21**, 578-638, 1972.
- [110] Gibbs, J. W., Collected Words: The Scientific Papers of J. Willard Gibbs, Vol 1: Thermodynamics, Dover. New York, 1961.

- [111] Lopatkin, A. A., Two thermodynamic approaches to the description of adsorption on solid surfaces. *Pure and Applied Chemistry* **61**, 1981–1985, 1989.
- [112] Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of American Chemical Society* **38**, 2221–2295, 1917.
- [113] Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of American Chemical Society* **39**, 1848–1906, 1917.
- [114] Langmuir, I., The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society* **40**, 1361–1403. (1918)
- [115] Lyklema, J., Fundamentals of Interface and Colloid Science – Volume II: Solid-Liquid Interfaces, Academic Press. London, 1995. p. 1.27.
- [116] Temkin, M. I., Pyzhev, V., Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst. *Acta Physicochimica U.S.S.R.* **12**, 327–356, 1940.
- [117] Frumkin, A., Über die Beeinflussung der Adsorption von Neutralmolekülen durch ein elektrisches Feld. *Zeitschrift für Physik* **35**, 792–802, 1926.
- [118] Fowler, R. H., Guggenheim, E. A., Statistical Thermodynamics, Cambridge University Press. Cambridge, 1956.
- [119] Brunauer, S., Emmett, P. H., Teller, E., Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of American Chemical Society* **60**, 309–319, 1938.
- [120] Fowler, R. H., A Statistical Derivation of Langmuir's Adsorption Isotherm. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* **31**, 260–264, 1935.
- [121] Everett, D. H., Thermodynamics of adsorption from solution. Part 1.—Perfect systems. *Transactions of the Faraday Society* **55**, 1803–1813, 1964.
- [122] Yang, C.-H., Statistical Mechanical Aspects of Adsorption Systems Obeying the Temkin Isotherm, *The Journal Physical Chemistry* **97**, 7097–7101, 1993.
- [123] Lyklema, J., Fundamentals of Interface and Colloid Science – Volume II: Solid-Liquid Interfaces, Academic Press. London, 1995. p. 2.64.
- [124] Rudziński, W., Łajtar, L., Zając, J., Wolfram, E., Pászli, I., Ideal Adsorption from Binary Liquid Mixtures on Heterogeneous Solid Surfaces: Equations for Excess Isotherms and Heats of Immersion. *Journal of Colloid and Interface Science* **96**, 339–359, 1983.
- [125] Nikitas, P., A Simple Mathematical Method for Development of Isotherms for Heterogeneous Adsorption from Dilute Solutions Involving Differences in Molecular Sizes of Components. *Journal of Colloid and Interface Science* **129**, 579–581, 1989.

- [126] Franses, E. I., Siddiqui, F. A., Ahn, D. J., Chang, C.-H., Wang, N.-H. L., Thermodynamically Consistent Equilibrium Adsorption Isotherms for Mixtures of Different-Size Molecules. *Langmuir* **11**, 3177–3183, 1995.
- [127] Sadana, A., Protein adsorption and inactivation on surfaces. Influence of heterogeneities. *Chemical Reviews* **92**, 1799–1818, 1992.
- [128] Giles, C. H., Smith, D., Huitson, A., A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science* **47**, 755–765, 1974.
- [129] Giles, C. H., D’Silva, A. P., Easton, I. A., A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm Part II. Experimental Interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science* **47**, 766–778, 1974.
- [130] Hlady, V., Buijs, J., Jennissen, H. P., Methods for studying protein adsorption. *Methods in enzymology* **309**, 402-429, 1999.
- [131] Haynes, C. A., Norde, W., Structures and stabilities of adsorbed proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **169**, 313–328, 1995.
- [132] De Baillou, N., Voegel, J. C., Schmitt, A., Adsorption of human albumin and fibrinogen onto heparin-like materials I. Adsorption isotherms. *Colloids and Surfaces* **16**, 271–288, 1985.
- [133] Young, B. R., Pitt, W. G., Cooper, S. L., Protein adsorption on polymeric biomaterials I. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* **124**, 28-43, 1988.
- [134] Nygren, H., Logarithmic growth in surface adsorption. *Advances in Colloid and Interface Science* **62**, 137–159, 1995.
- [135] Liu, M., Zhang, Y., Wang, M., Deng, C., Xie, Q., Yao, S., Adsorption of bovine serum albumin and fibrinogen on hydrophilicity-controllable surfaces of polypyrrole doped with dodecyl benzene sulfonate—A combined piezoelectric quartz crystal impedance and electrochemical impedance study. *Polymer* **47**, 3372–3381, 2006.
- [136] Farcas, M., Cosman, N. P., Ting, D. K., Roscoe, S. G., Omanovic, S., A comparative study of electrochemical techniques in investigating the adsorption behaviour of fibrinogen on platinum. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **649**, 206–218, 2010.
- [137] Johnson, R. D., Arnold, F. H., The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta* **1247**, 293–297, 1995.
- [138] Oliva, F. Y., Cámara, O. R., Avalle, L. B., Adsorption of human serum albumin on electrochemical titanium dioxide electrodes: Protein – oxide surface interaction effects studied by electrochemical techniques. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **633**, 19–34, 2009.
- [139] Lassen, B., Malmsten, M., Structure of Protein Layers during Competitive Adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science* **180**, 339–349, 1996.

- [140] Young, B. R., Pitt, W. G., Cooper, S. L., Protein adsorption on polymeric biomaterials: II. Adsorption kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science* **125**, 246–260, 1988.
- [141] Adamczyk, Z., Siwek, B., Zembala, M., Reversible and irreversible adsorption of particles on homogeneous surfaces. *Colloid and Surfaces* **62**, 119–130, 1992.
- [142] Norde, W., Protein adsorption at solid surfaces: A thermodynamic approach. *Pure and Applied Chemistry* **66**, 491–496, 1994.
- [143] Lyklema, J., Fundamentals of Interface and Colloid Science – Volume II: Solid-Liquid Interfaces, Academic Press. London, 1995. p. 1.30.
- [144] Millitzer, M., Wenzig, E., Peukert, W., Adsorption Isotherms and Irreversible Binding of Proteins on Commercially Available Hydrophobic Adsorbents. *Chemical Engineering & Technology* **28**, 756–761, 2005.
- [145] Can, Ö., Holland, N. B., Modified Langmuir isotherm for a two-domain adsorbate: derivation and application to antifreeze proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **329**, 24–30, 2009.
- [146] Seigel, R. R., Harder, P., Dahint, R., Grunze, M., On-Line Detection of Nonspecific Protein Adsorption at Artificial Surfaces. *Analytical Chemistry* **69**, 3321–3328, 1997.
- [147] Pagonabarraga, I., Rubi, J. M., Derivation of the Langmuir adsorption from non-equilibrium thermodynamics. *Physica A* **188**, 553–567, 1992.
- [148] Mysels, K. J., Diffusion-Controlled Adsorption Kinetics. General Solution and Some Applications. *The Journal of Physical Chemistry* **86**, 4648–4651, 1982.
- [149] Chukhrai, E. S., Atyaksheva, L. F., Pilipenko, O. S., The Special Features of Protein Adsorption Isotherms on Silica Adsorbents. *Russian Journal of Physical Chemistry A* **85**, 890–896, 2011.
- [150] Bornzin, G. A., Miller, I. F., The Kinetics of Protein Adsorption on Synthetics and Modified Natural Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **86**, 539–558, 1982.
- [151] Lundström, I., Elwing, H., Simple Kinetic Models for Protein Exchange Reactions on Solid Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **136**, 68–84, 1990.
- [152] Langmuir, I., Schaefer, V. J., The effect of dissolved salts on insoluble monolayers. *Journal of American Chemical Society* **59**, 2400–2414, 1937.
- [153] Ward, A. F. H., Tordai, L., Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *The Journal of Chemical Physics* **14**, 453–461, 1946.
- [154] Mysels, K. J., Frisch, H. L., Diffusion-Controlled Adsorption: Ideal Adsorption through a Stagnant Layer. *Journal of Colloid and Interface Science* **99**, 136–140, 1984.

- [155] Tornberg, E., The Application of the Drop Volume Technique to Measurements of the Adsorption of Proteins at Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **64**, 391–402, 1978.
- [156] Graham, D. E., Phillips, M. C., Proteins at Liquid Interfaces I. Kinetics of Adsorption and Surface Denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science* **70**, 403–414, 1979.
- [157] Van Dulm, P., Norde, W., The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* **91**, 248–255, 1983.
- [158] Soderquist, M. E., Walton, A. G., Structural Changes in Proteins Adsorbed on Polymer Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **75**, 386–397, 1980.
- [159] Schaaf, P., Talbot, J., Surface exclusion effects in adsorption processes. *The Journal of Chemical Physics* **91**, 4401–4409, 1989.
- [160] Calonder, C., Tie, Y., Van Tassel, P. R., History dependence of protein adsorption kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10664–10669, 2001.
- [161] Norde, W., Anusiem, A. C. I., Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids and Surfaces* **66**, 73–80, 1992.
- [162] Aptel, J. D., Voegel, J. C., Schmitt, A., Adsorption kinetics of proteins onto solid surfaces in the limit of the interfacial interaction control. *Colloids and Surfaces* **29**, 359–371, 1988.
- [163] Kalinin, N. L., Ward, L. D., Winzor, D. J., Effects of solute multivalence on the evaluation of binding constants by biosensor technology: studies with concanavalin A and interleukin-6 as partitioning proteins. *Analytical Biochemistry* **228**, 238–244, 1995.
- [164] Shinohara, Y., Kim, F., Shimizu, M., Goto, M., Tosu, M., Hasegawa, Y., Kinetic measurement of the interaction between an oligosaccharide and lectins by a biosensor based on surface plasmon resonance. *European Journal of Biochemistry* **223**, 189–194, 1994.
- [165] Schaaf, P., Dejardin, Ph., Coupling between interfacial protein adsorption and bulk diffusion. A numerical study. *Colloids and Surfaces* **24**, 239–247, 1987.
- [166] Varoqui, R., Pefferkorn, E., Adsorption kinetics at a plane interface: the excluded surface effect. *Journal of Colloid and Interface Science* **109**, 520–526, 1986.
- [167] Sánchez-Ruiz, J. M., López-Lacomba, J. L., Cortijo, M., Mateo, P. L., Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* **27**, 1648–1652, 1988.
- [168] Zhdanov, V. P., Kasemo, B., Simulations of denaturation of adsorbed proteins. *Physical Review E* **56**, 2306–2309, 1997.

- [169] Sarkar, D., Chattoraj, D. K., Activation parameters for kinetics of protein adsorption at silica-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* **157**, 219–226, 1993.
- [170] Bernabeu, P., Tamisier, L., De Cesare, A., Caprani, A., Study of the adsorption of albumin on a platinum rotating disk electrode using impedance measurements. *Electrochimica Acta* **33**, 1129–1136, 1988.
- [171] Bernabeu, P., De Cesare, A., Caprani, A., Kinetics of albumin and fibrinogen adsorption onto a rotating disk electrode. Effect of temperature, concentration and material. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **265**, 261–275, 1989.
- [172] Bernabeu, P., Caprani, A., Influence of surface charge on adsorption of fibrinogen and/or albumin on a rotating disc electrode of platinum and carbon. *Biomaterials* **11**, 258–264, 1990.
- [173] Caprani, A., Lacour, F., Analysis and physical significance of the kinetic parameters associated with albumin adsorption onto glassy carbon obtained by electrochemical impedance measurements. *Journal Electroanalytical Chemistry* **25**, 241–258, 1991.
- [174] Mullet, M., Fievet, P., Bouhallab, S., Reggiani, J. C., Pagetti, J., Study of the adsorption of a hydrophobic peptide onto carbon surfaces by capacitance measurements. *Journal of Membrane Science* **128**, 243–254, 1997.
- [175] Fievet, P., Mullet, M., Reggiani, J. C., Pagetti, J., Influence of surface charge on adsorption of a hydrophobic peptide onto a carbon surface by capacitance measurements. *Colloids and Surfaces A* **144**, 35–42, 1998.
- [176] Lacour, F., Ficquelmont-Loïzos, M. M. de, Caprani, A., Effect of the ionic strength of the supporting electrolyte on the kinetics of albumin adsorption at a glassy carbon rotating disk electrode. *Electrochimica Acta* **36**, 1811–1816, 1991.
- [177] Michael, K. E., Vernekar, V. N., Keselowsky, B. G., Meredith, J. C., Latour, R. A., García, A. J., Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir* **19**, 8033–8040, 2003.
- [178] Krisdhasima, V., Vinaraphong, P., McGuire, J., Adsorption kinetics and elutability of α -lactalbumin, β -casein, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **161**, 325–334, 1993.
- [179] Macdonald, D. D., Review of mechanistic analysis by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **35**, 1509–1525, 1990.
- [180] Lisdat, F., Schäfer, D., The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 1555–1567, 2008.
- [181] Macdonald, J. R., Impedance Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering* **20**, 289–305, 1992.
- [182] Macdonald, D. D., Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **51**, 1376–1388, 2006.

- [183] Bockris, J. O'M., Reddy, A. K. N., Gamboa-Aldeco, M., Modern Electrochemistry 2A - Fundamentals of Electroics, Second Edition, Kluwer Academic Publishers. United States of America, 2002. p. 1127.
- [184] Pettit, C. M., Goonetilleke, P. C., Sulyma, C. M., Roy, D., Combining Impedance Spectroscopy with Cyclic Voltammetry: Measurement and Analysis of Kinetic Parameters for Faradaic and Nonfaradaic Reactions on Thin-Film Gold. *Analytical Chemistry* **78**, 3723–3729, 2006.
- [185] Orazem, M. E., Pébère, N., Tribollet, B., Enhanced Graphical Representation of Electrochemical Impedance Data. *Journal of Electrochemical Society* **153**, B129–B136, 2006.
- [186] Macdonald, J. R., Garber, J. A., Analysis of impedance and admittance data for solids and liquids. *Journal of the Electrochemical Society* **124**, 1022–1030, 1977.
- [187] Randles, J. E. B., Kinetics of rapid electrode reactions. *Discussions of the Faraday Society* **1**, 11, 1947.
- [188] Armstrong, R. D., Firman, R. E., Thirsk, H. R., The A.C. Impedance of Complex Electrochemical Reactions. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **56**, 244–263, 1973.
- [189] Kerner, Z., Pajkossy, T., On the origin of capacitance dispersion of rough electrodes. *Electrochimica Acta* **46**, 207–211, 2000.
- [190] G.J. Brug, A. L. G. Van den Eeden, Sluyters-Rehbach, M., Sluyters, J. H., The analysis of electrode impedances complicated by presence of a constant phase element. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **176**, 275–295, 1984.
- [191] Córdoba-Torres, P., Mesquita, T. J., Devos, O., Tribollet, B., Roche, V., Nogueira, R. P., On the intrinsic coupling between constant-phase element parameters α and Q in electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **72**, 172–178, 2012.
- [192] Martin, M. H., Lasia, A., Influence of experimental factors on the constant phase element behavior of Pt electrodes. *Electrochimica Acta* **56**, 8058–8068, 2011.
- [193] Devos, O., Gabrielli, C., Tribollet, B., Simultaneous EIS and in situ microscope observation on a partially blocked electrode application to scale electrodeposition. *Electrochimica Acta* **51**, 1413–1422, 2006.
- [194] Nyikos, L., Pajkossy, T., Fractal dimension and fractional power frequency-dependent impedance of blocking electrodes. *Electrochimica Acta* **30**, 1533–1540, 1985.
- [195] Pajkossy, T., Nyikos, L., Impedance of Fractal Blocking Electrodes. *Journal of Electrochemical Society* **133**, 2061–2064, 1986.
- [196] Wang, J. C., Impedance of a fractal electrolyte-electrode interface. *Electrochimica Acta* **33**, 707–711, 1988.

- [197] Wang, J. C., Comments on a fractal model for blocking interfaces. *Electrochimica Acta* **34**, 987–990, 1988.
- [198] Keddam, M., Takenouti, H., Impedance of fractal interfaces: new data on the Von Koch model. *Electrochimica Acta* **33**, 445–448, 1988.
- [199] Bates, J. B., Chu, Y. T., Stribling, W. T., Surface Topography and Impedance of Metal-Electrolyte Interfaces. *Physical Review Letters* **60**, 627–630, 1988.
- [200] De Levie, R., Fractals and rough electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **281**, 1–21, 1990.
- [201] De Levie, R., The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements. *Electrochimica Acta* **10**, 113–130, 1965.
- [202] Pajkossy, T., Nyikos, L., Impedance of planar electrodes with scale-invariant capacitance distribution. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **332**, 55–61, 1992.
- [203] Cao, Q.-Z., Wong, P.-Z., Schwartz, L. M., Numerical studies of the impedance of blocking electrodes with fractal surfaces. *Physical Review B* **50**, 5771–5774, 1994.
- [204] Pajkossy, T., Impedance of rough capacitive electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **364**, 111–125, 1994.
- [205] Pajkossy, T., Impedance spectroscopy at interfaces of metals and aqueous solutions — Surface roughness, CPE and related issues. *Solid State Ionics* **176**, 1997–2003, 2005.
- [206] Parsons, R., Modern Aspects of Electrochemistry no. 1, Editado por Bockris, J. O'M., Conway, B. E., Butterworths Scientific Publications, Academic Press Inc. New York, 1954. p. 141.
- [207] Lasia, A., Modern aspects of electrochemistry no. 32., Editado por Conway, B. E., Bockris, J. O'M., White, R. E., Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York, 2002. p. 143.
- [208] Damian, A., Omanovic, S., Interactive adsorption behavior of NAD^+ at a gold electrode surface. *Langmuir* **23**, 3162–3171, 2007.
- [209] Barradas, R. G., Sedlak, J. M., Some observations on recent theories of adsorption of organic compounds in the double layer. *Electrochimica Acta* **17**, 1901–1905, 1972.
- [210] Frumkin, A. N., Damaskin, B. B., Survila, A. A., The congruence of the adsorption isotherm with respect to the electrode potential or charge and the choice of an independent electric variable. *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **16**, 493–503, 1968.
- [211] Koryta, J., Dvořák, J., Kavan, L., Principles of electrochemistry, Second Edition, John Wiley & Sons. England, 1993. p. 235.

- [212] Blomgren, E., Bockris, J. O'M., Jesch, C., The adsorption of butyl, phenyl and naphthyl compounds at the interface mercury—aqueous acid solution. *The Journal of Physical Chemistry* **65**, 2000–2010, 1961.
- [213] Stoner, G., Srinivasan, S., Adsorption of Blood Proteins on Metals Using Capacitance Techniques. *The Journal of Physical Chemistry* **74**, 1088–1094, 1970.
- [214] Mirsky, V., Riepl, M., Wolfbeis, O. S., Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **12**, 977–989, 1997.
- [215] Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., Wallace, G. G., Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions. *Electrochimica Acta* **49**, 4223–4230, 2004.
- [216] Feng, L., Andrade, J. D., Protein Adsorption on Low-Temperature Isotropic Carbon II. Effects of Surface Charge of Solids. *Journal of Colloid and Interface Science* **166**, 419–426, 1994.
- [217] Sabatani, E., Rubinstein, I., Maoz, R., Sagiv, J., Organized self-assembling monolayers on electrodes part I. Octadecyl derivatives on gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **219**, 365–371, 1987.
- [218] Sabatani, E., Rubinstein, I., Organized Self-Assembling Monolayers on Electrodes. 2. Monolayer-Based Ultramicroelectrodes for the Study. *The Journal of Physical Chemistry* **91**, 6663–6669, 1987.
- [219] Sabatani, E., Cohen-Boulakia, J., Bruening, M., Rubinstein, I., Thioaromatic Monolayers on Gold: A New Family of Self-Assembling Monolayers. *Langmuir* **9**, 2974–2981, 1993.
- [220] Omanovic, S., Roscoe, S. G., Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel. *Langmuir* **15**, 8315–8321, 1999.
- [221] Oliveira, M. D. L., Correia, M. T. S., Diniz, F. B., Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 728–732, 2009.
- [222] Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., Wallace, G. G., Investigation of Ig.G adsorption and the effect on electrochemical responses at titanium dioxide electrode. *Langmuir* **21**, 316–322, 2005.
- [223] Phillips, R. K. R., Omanovic, S., Roscoe, S. G., Electrochemical Studies of the Effect of Temperature on the Adsorption of Yeast Alcohol Dehydrogenase at Pt. *Langmuir* **17**, 2471–2477, 2001.
- [224] Cosman, N. P., Fatih, K., Roscoe, S. G., Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of α -lactalbumin and β -casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **574**, 261–271, 2005.

- [225] Li, H., Robertson, A. D., Jensen, J. H. Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein pK_a Values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **61**, 704–721, 2005.
- [226] Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., Baker, N. A., PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* **32**, W665–W667, 2004.
- [227] Goldstein, I. J., Reichert, C. M., Misaki, A., Interaction of concanavalin A with model substrates. *Annals New York Academy of Sciences* **234**, 283–296, 1974.
- [228] Poretz, R. D., Goldstein, I. J., Protein-Carbohydrate Interaction XI. A study of turbidity as it relates to concanavalin A-glycan interaction. *Immunology* **14**, 165–174, 1968.
- [229] Waseem, A., Salahuddin, A., Anomalous temperature-dependence of the specific interaction of concanavalin a with a multivalent ligand-dextran. *Biochimica et Biophysica Acta* **746**, 65–71, 1983.
- [230] Salahuddin, A., Begum, R., Averill, B. K., Salt-induced inhibition of the precipitin reaction of concanavalin A with polysaccharides and glycoprotein. *Biochemical Journal* **220**, 639–642, 1984.
- [231] Gnahn, M., Pajkossy, T., Kolb, D. M., The interface between Au (111) and an ionic liquid. *Electrochimica Acta* **55**, 6212–6217, 2010.
- [232] Neves, R. S., De Robertis, E., Motheo, A. J., Capacitance dispersion in EIS measurements of halides adsorption on Au(210). *Electrochimica Acta* **51**, 1215–1224, 2006.
- [233] Cámara, O. R., Avalle, L. B., Oliva, F. Y., Protein adsorption on titanium dioxide: Effects on double layer and semiconductor space charge region studied by EIS. *Electrochimica Acta* **55**, 4519–4528, 2010.
- [234] Bondarenko, A. S., Stephens, I. E. L., Bech, L., Chorkendorff, I., Probing adsorption phenomena on a single crystal Pt-alloy surface under oxygen reduction reaction conditions. *Electrochimica Acta* **82**, 517–523, 2012.
- [235] Córdoba-Torres, P., Mesquita, T. J., Nogueira, R. P., Influence of geometry-induced current and potential distributions on the characterization of constant-phase element behavior. *Electrochimica Acta* **87**, 676–685, 2013.
- [236] Karez, K., Ghahremaninezhad, A., Asselin, E., Electrochemical properties of metallurgical-grade silicon in hydrochloric acid. *Electrochimica Acta* **54**, 6548–6553, 2009.
- [237] Shao, L.-H., Biener, J., Kramer, D., Viswanath, R. N., Baumann, T. F., Hamza, A. V., Weissmüller, J., Electrocapillary maximum and potential of zero charge of carbon aerogel. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 7580–7587, 2010.

- [238] Grahame, D. C., The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Reviews* **41**, 441-501, 1947.
- [239] Löfter, G., Schreiber, H., Steinhauser, O., Calculation of the Dielectric Properties of a Protein and its Solvent: Theory and a Case Study. *Journal of Molecular Biology* **270**, 520–534, 1997.
- [240] Habib, M. A., Bockris, J. O'M., Potential-Dependent Water Orientation: An in Situ Spectroscopic Study. *Langmuir* **2**, 388–392, 1986.
- [241] Bogomolova, A., Komarova, E., Reber, K., Gerasimov, T., Yavuz, O., Bhatt, S., Aldissi, M., Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing. *Analytical Chemistry* **81**, 3944–3949, 2009.
- [242] Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., Wallace, G. G., Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode. *Journal of Colloid and Interface Science* **261**, 312–319, 2003.
- [243] Bard, A. J., Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*, Second Edition, John Wiley & Sons. United States of America, 2001. p. 96.
- [244] Nicholson, R. S., Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Analytical Chemistry* **37**, 1351–1355, 1965.
- [245] Lide, D. R., *Handbook of Chemistry and Physics*, 89th ed., CRC Press. United States of America, 2008. p. 5-77.
- [246] McDermott, M. T., McDermott, C. A., McCreery, R. L., Scanning Tunneling Microscopy of Carbon Surfaces: Relationships between Electrode Kinetics, Capacitance, and Morphology for Glassy Carbon Electrodes. *Analytical Chemistry* **65**, 937–944, 1993.
- [247] Miller, R., Grigoriev, D. O., Krägel, J., Makievski, A. V., Maldonado-Valderrama, J., Leser, M., Michel, M., Fainerman, V. B., Experimental studies on the desorption of adsorbed proteins from liquid interfaces. *Food Hydrocolloids* **19**, 479–483, 2005.
- [248] VanderNoot, T. J., Limitations in the analysis of ac impedance data with poorly separated faradaic and diffusional processes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **300**, 199–210, 1991.
- [249] Huet, M., Claverie, J.-M., Sedimentation studies of the reversible dimer-tetramer transition kinetics of concanavalin A. *Biochemistry* **17**, 236–241, 1978.
- [250] Kleijn, J. M., Barten, D., Stuart, M. A. C., Adsorption of charged macromolecules at a gold electrode. *Langmuir* **20**, 9703–9713, 2004.
- [251] Spearman, C., The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology* **15**, 72–101, 1904.

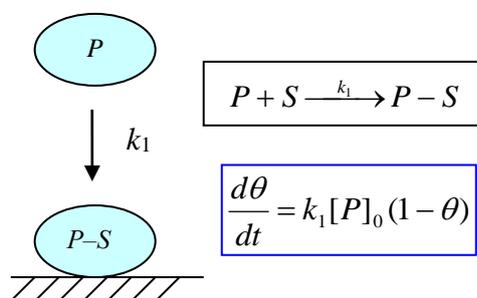
- [252] Artusi, R., Verderio, P., Marubini, E., Bravais-Pearson and Spearman correlation coefficients: meaning, test of hypothesis and confidence interval. *The International Journal of Biological Markers* **17**, 148–151, 2002.
- [253] Glasser, G. J., Winter, R. F., Critical Values of the Coefficient of Rank Correlation for Testing the Hypothesis of Independence. *Biometrika* **48**, 444–448, 1961.
- [254] Conover, W. J., Practical Nonparametric Statistics, Third Edition, John Wiley & Sons. United States of America, 1999. p. 314-319.
- [255] Fisher, R., The goodness of fit of regression formulae, and the distribution of regression coefficients. *Journal of the Royal Statistical Society* **85**, 597–612, 1922.
- [256] Neill, J., Testing for lack of fit in nonlinear regression, *The Annals of Statistics* **16**, 733–740, 1988.
- [257] Joglekar, G., Schuenemeyer, J. H., LaRiccia, V., Lack-of-fit testing when replicates are not available. *The American Statistician* **43**, 135–143, 1989.
- [258] Bates, D. M., Watts, D. G., Nonlinear Regression Analysis and Its Applications, John Wiley & Sons. United States of America, 1988. p. 120–121.
- [259] Kirkwood, J. G., Shumaker, J. B., The influence of dipole moment fluctuations on the dielectric increment of proteins in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **38**, 855–862, 1952.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Modelos de cinética de adsorção

APÊNDICE A.1 – Sequencial de uma etapa

Considere o seguinte processo de adsorção de uma espécie P em uma superfície S , gerando uma espécie adsorvida $P-S$, processo elementar regido por uma constante de equilíbrio k_1 . A reação é ilustrada abaixo com a respectiva equação diferencial que governa o processo elementar, assumindo adsorção em sítios específicos:

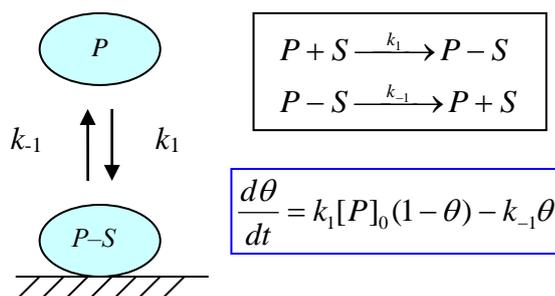


Resolvendo a equação diferencial via integração para as condições de contorno $\theta(t = 0) = 0$ e $\theta(t) = \theta_t$:

$$\Rightarrow \int_0^{\theta_t} \frac{d\theta}{1 - \theta} = k_1[P]_0 t \Rightarrow \ln[1 - \theta] = -k_1[P]_0 t \quad \theta_t = 1 - e^{-k_1[P]_0 t}$$

APÊNDICE A.2 – Modelo de Langmuir

Similar ao processo descrito no APÊNDICE A.1, o modelo de Langmuir tem um processo desortivo adicional de primeira ordem, cuja constante de velocidade é k_{-1} neste caso. Deste modo temos um processo tal qual ilustrado abaixo, com sua respectiva equação diferencial.



Assume-se que $[P]_0$ não varia com tempo (concentração grande o suficiente para gerar um processo de pseudo-primeira ordem). Neste caso a equação diferencial pode ser resolvida via integração:

$$\Rightarrow \frac{d\theta}{dt} = k_1[P]_0(1-\theta) - k_{-1}\theta = k_1[P]_0 - \theta(k_1[P]_0 + k_{-1})$$

$$\int_0^{\theta_t} \frac{d\theta}{k_1[P]_0 - \theta(k_1[P]_0 + k_{-1})} = \ln[k_1[P]_0 - \theta(k_1[P]_0 + k_{-1})]_0^{\theta_t} = -(k_1[P]_0 + k_{-1})t$$

$$\ln \left[\frac{k_1[P]_0 - \theta_t(k_1[P]_0 + k_{-1})}{k_1[P]_0} \right] = -(k_1[P]_0 + k_{-1})t \quad \theta_t = \frac{k_1[P]_0}{(k_1[P]_0 + k_{-1})} (1 - e^{-(k_1[P]_0 + k_{-1})t})$$

APÊNDICE B – Ferramentas estatísticas

APÊNDICE B.1 - Teste de correlação de Spearman

Para testar a independência entre duas variáveis randômicas quando a associação entre elas não é necessariamente linear frequentemente calcula-se o coeficiente de correlação de postos de Spearman, ρ [251]. Ao invés de usar os valores de x e y e suas médias para calcular a correlação de acordo com Pearson (para associações lineares), faz-se o mesmo, mas com o chamado posto de cada variável. Os postos para cada valor de cada variável são resultantes de um ordenamento numérico. Num conjunto x_1, x_2, \dots, x_N , por exemplo, o menor valor de x recebe posto 1, o segundo menor 2, e assim sucessivamente. Deste modo a cada valor x_i corresponde um posto $R(x_i)$ de 1 até N (no APÊNDICE B N não equivale ao número total de sítios disponíveis para adsorção, mas sim ao número total de medidas). O mesmo é feito com o conjunto y_1, y_2, \dots, y_N , sendo que para cada y_i há um $R(y_i)$. Caso não existam valores de x ou de y que coincidam, o coeficiente ρ pode ser calculado pela equação abaixo:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N [R(x_i) - R(y_i)]^2}{N(N^2 - 1)} \quad \text{Eq. 35}$$

O ρ de Spearman é insensível a certos tipos de dependências, como as não-monotônicas [252]. Para avaliar a significância usam-se testes de hipótese unilaterais e bilaterais. Caso deseje-se verificar se há uma tendência de que y aumente para maiores valores de x , compara-se o valor de ρ com o tabelado na literatura para $\alpha = 0,05$ e um dado N [253]. Caso seja maior a correlação é significativa. Para se investigar a possibilidade de que a tendência contrária é significativa, o valor obtido de ρ (negativo) deve ser menor que o negativo do valor tabelado para $\alpha = 0,05$. Ambos os testes são unilaterais, verificando uma tendência única. Já se o objetivo é investigar alguma correlação, seja negativa ou positiva, compara-se o $|\rho|$ com o valor tabelado para $\alpha = 1-(0,05/2) = 0,025$. Neste caso o teste é bilateral [254].

APÊNDICE B.2 - Teste da Falta de Ajuste

Este teste visa verificar a adequação de um modelo a partir de um teste F, no qual são comparadas as variância que o modelo não prevê (da falta de ajuste) com a variância resultante da dispersão natural no sistema (do erro puro). Ele é aplicável tanto a modelos lineares quanto não lineares, com ou sem replicatas [255–257]. No presente caso suporemos que as replicatas estão presentes.

Seja N o número total de observações, em que para cada valor de uma variável dependente y corresponde a outro na independente x . Para o valor de x_1 são medidos os valores $y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n_1}$ (n_1 replicatas), neste que é chamado de nível 1. Se forem escolhidas M variáveis independentes, teremos M níveis, até o valor de x_M , que apresenta n_M replicatas ($y_{M1}, y_{M2}, \dots, y_{Mn_M}$). O valor médio para cada nível é dado por \bar{y}_{n_i} , de modo que para cada nível i há um valor médio. A diferença entre um valor de y_{ik} qualquer ($k = 1, 2, \dots, n_i$) e a média em seu nível i é dado por $y_{ik} - \bar{y}_i$, e a soma dos quadrados destas diferenças é o que se chama de soma quadrática do erro puro (SQ_{ep}), segundo a fórmula abaixo:

$$SQ_{ep} = \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^{n_i} (y_{ik} - \bar{y}_i)^2$$

O número de graus de liberdade desta soma quadrática (v_{ep}) equivale a $N - M$, de modo que a variância associada ao erro puro é $SQ_{ep}/(N - M)$, geralmente chamada de média quadrática do erro puro (MQ_{ep}):

$$MQ_{ep} = \frac{1}{N - M} \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^{n_i} (y_{ik} - \bar{y}_i)^2 \quad \text{Eq. 36}$$

Uma função não-linear que descreve y em função de x e de um conjunto de p parâmetros $\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_p$ é representada por $f(x_i, \Omega)$, em que $i = 1, 2, \dots, M$. Uma estimativa dos parâmetros é obtida por métodos iterativos (como o Levenberg-Marquardt), fornecendo $\hat{\Omega}_1, \hat{\Omega}_2, \dots, \hat{\Omega}_p$. Levanta-se a hipótese nula de que o valor esperado de y_{ik} seja equivalente a $f(x_i, \hat{\Omega})$. Logo calcula-se a diferença entre os valores y_{ik} e o valor previsto segundo o modelo não-linear, $f(x_i, \hat{\Omega})$. Somando-se os quadrados destas diferenças obtemos o resíduo do modelo na forma de soma quadrática residual (SQ_r):

$$SQ_r = \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^{n_i} [y_{ik} - f(x_i, \hat{\Omega})]^2$$

A soma quadrática residual pode ser separada na parcela residual natural do sistema (SQ_{ep}) acrescida do resíduo deixado pelo modelo, a soma quadrática da falta de ajuste (SQ_{faj}). Logo SQ_{faj} pode ser obtida subtraindo SQ_{ep} de SQ_r :

$$SQ_{faj} = \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^{n_i} [y_{ik} - f(x_i, \hat{\Omega})]^2 - \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^{n_i} (y_{ik} - \bar{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^M n_i [\bar{y}_i - f(x_i, \hat{\Omega})]^2$$

O número de graus de liberdade desta soma quadrática (v_{faj}) é $M - p$, de modo que a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) é dada pela Eq. 38:

$$MQ_{faj} = \frac{1}{M - p} \sum_{i=1}^M n_i [\bar{y}_i - f(x_i, \hat{\Omega})]^2 \quad \text{Eq. 37}$$

Neste ponto as variâncias MQ_{ep} e MQ_{faj} são comparadas estatisticamente através de um teste de hipótese. O resíduo que o modelo não consegue reproduzir (MQ_{faj}) não deve diferir significativamente do resíduo natural do sistema (MQ_{ep}) para que ele seja considerado ajustado. Caso haja uma diferença entre elas, possivelmente o modelo não reproduz algum comportamento sistemático na forma de alguma funcionalidade não considerada no modelo. Por exemplo, usar um modelo linear para modelar uma parábola resulta em resíduos com

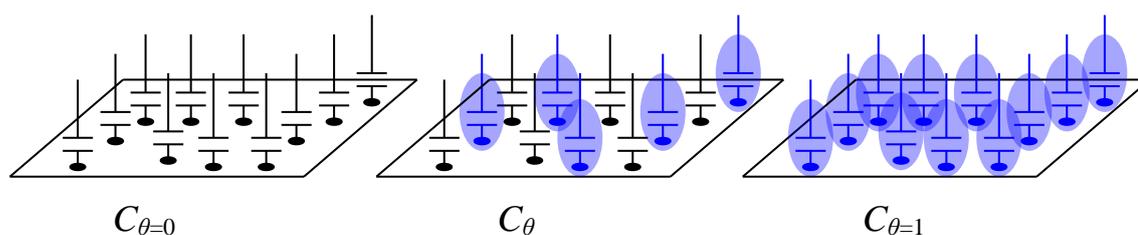
formato parabólico. Esta tendência sistemática não considerada pelo modelo não é da mesma natureza da variação natural (a princípio aleatória) do sistema. Deste modo o modelo não estaria ajustado, necessitando de um termo quadrático adicional neste exemplo.

O valor de F obtido dos dados equivale a MQ_{faj}/MQ_{ep} . Consultando-se o valor tabelado de F num nível de confiança escolhido (95% por exemplo) para v_{faj} e v_{ep} graus de liberdade, respectivamente, encontra-se $F_0 = F_{v_{faj}, v_{ep}}^{\alpha=0,05}$ (para um teste bilateral). Se $F > F_0$ as variâncias diferem, e conseqüentemente o modelo não está ajustado, pois o resíduo por ele deixado não é puramente aleatório. Por outro lado se $F < F_0$, MQ_{faj} não difere significativamente de MQ_{ep} , de modo que o modelo está ajustado. Caso vários modelos sejam comparados (desde que um não se converta no outro por modificação nos parâmetros), os que se mostram ajustados com menores valores de F são preferíveis aos com os maiores valores de F [258].

ANEXOS

ANEXO A – Dedução alternativa do recobrimento em função da capacitância

Suponhamos que numa superfície existam N sítios, e que a capacitância medida nestas condições seja $C_{\theta=0}$. Após a adsorção N_{ads} destes sítios são ocupados com o adsorbato, gerando uma capacitância C_{θ} , e para um sistema em que todos os sítios estão ocupados, obtemos uma capacitância $C_{\theta=1}$. Com estas afirmações determinamos os limites (ou condições de contorno) para nossa função que relaciona θ com C , de modo que quando $\theta \rightarrow 0$, $C_{\theta} \rightarrow C_{\theta=0}$, e similarmente quando $\theta \rightarrow 1$, $C_{\theta} \rightarrow C_{\theta=1}$. Se considerarmos que a cada sítio corresponde uma capacitância, e que todas estão em paralelo, teríamos uma representação semelhante à apresentada abaixo:



Como a capacitância resultante de um conjunto em paralelo é a soma das capacitâncias, poderíamos obter a capacitância de um sítio desocupado ($C_{\theta=0}'$) dividindo a capacitância total na superfície sem adsorbato pelo número de sítios: $C_{\theta=0}' = C_{\theta=0} / N$. De maneira similar seríamos capazes de obter a capacitância para um sítio ocupado ($C_{\theta=1}'$) a partir da capacitância resultante de uma superfície com todos os sítios ocupados: $C_{\theta=1}' = C_{\theta=1} / N$. Em um recobrimento parcial a capacitância resultante (C_{θ}) é obtida pela soma de todas as capacitâncias em paralelo, isto é, a soma de todas as capacitâncias referentes aos sítios desocupados com as dos sítios ocupados. A soma de todas as capacitâncias dos sítios desocupados equivale a $C_{\theta=0}'(N - N_{ads})$ (soma de todos os $N - N_{ads}$ sítios desocupados), e a das capacitâncias dos sítios ocupados igual a $C_{\theta=1}'N_{ads}$. A capacitância resultante é, portanto:

$$C_{\theta} = C_{\theta=0}'(N - N_{ads}) + C_{\theta=1}'N_{ads} = \frac{C_{\theta=0}}{N}(N - N_{ads}) + \frac{C_{\theta=1}}{N}N_{ads}$$

e lembrando que $\theta = N_{ads}/N$:

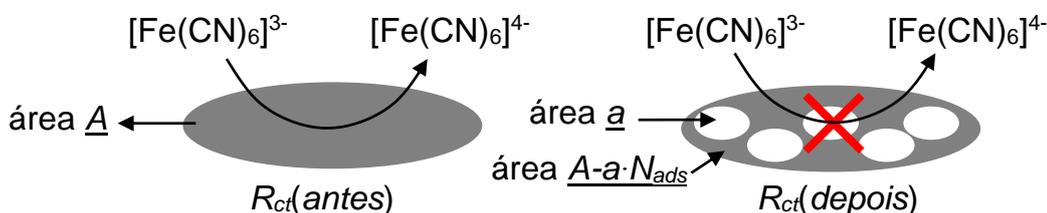
$$C_{\theta} = \frac{C_{\theta=0}}{N}(N - N_{ads}) + \frac{C_{\theta=1}}{N}N_{ads} = C_{\theta=0}(1 - \theta) + C_{\theta=1}\theta$$

Uma função $C(\theta)$ que obedece às condições impostas: $C(\theta = 0) = C_{\theta=0}$ e $C(\theta = 1) = C_{\theta=1}$. Rearranjando a função obtemos a Eq. 27. Uma outra maneira de obter a mesma relação é considerar C_{θ} como uma média ponderada das capacitâncias limites, $C_{\theta=0}$ e $C_{\theta=1}$, em que os pesos são os números de sítios desocupados e ocupados, respectivamente:

$$C_{\theta} = \frac{C_{\theta=0}(N - N_{ads}) + C_{\theta=1}N_{ads}}{(N - N_{ads}) + N_{ads}} = \frac{C_{\theta=0}(N - N_{ads}) + C_{\theta=1}N_{ads}}{N} = C_{\theta=0}(1 - \theta) + C_{\theta=1}\theta$$

ANEXO B – Dedução do recobrimento em função da resistência via modelo eletroquímico

Suponha uma reação de transferência de elétrons na interface, como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Na superfície de área A , completamente isenta do adsorbato em questão, a reação na interface implica uma resistência de transferência de carga $R_{ct}(\text{antes})$. Com a adsorção, a área recoberta pela espécie adsorvida não permite a transferência de elétrons através dela, de modo que a área disponível para a reação redox é menor, sendo subtraída por um fator proporcional ao número de moléculas adsorvidas N_{ads} , multiplicado pela a área de contato do adsorbato com a superfície a . Neste caso a resistência à transferência de carga aumenta para $R_{ct}(\text{depois})$.



Esse modelo assume implicitamente que não existe transferência de elétrons através do adsorbato (como através de tunelamento), que 1 molécula de adsorbato corresponde a 1 área a (não considera a formação de multicamadas nem ancoramento de proteínas) e que existe uma orientação preferencial do adsorbado o suficiente para que exista só uma área de contato a .

Empregando a Eq. 19, a razão entre as duas resistências acima citadas fornece a seguinte relação:

$$\frac{R_{ct}(depois)}{R_{ct}(antes)} = \frac{1/A(depois)}{1/A(antes)} = \frac{A(antes)}{A(depois)} = \frac{A}{A - a \cdot N_{ads}} \Rightarrow A - a \cdot N_{ads} = A \frac{R_{ct}(antes)}{R_{ct}(depois)}$$

$$N_{ads} = \frac{A}{a} \left(1 - \frac{R_{ct}(antes)}{R_{ct}(depois)} \right)$$

O recobrimento percentual é equivalente ao número de sítios ocupados pelo número total de sítios, de maneira que segundo nosso modelo essa razão equivale à área ocupada pelo adsorbato ($a \cdot N$) dividida pela área total (A). O recobrimento pode ser obtido, portanto, em função das resistências de transferência de carga:

$$\theta = \frac{a \cdot N_{ads}}{A} = \frac{a}{A} \left[\frac{A}{a} \left(1 - \frac{R_{ct}(antes)}{R_{ct}(depois)} \right) \right] \Rightarrow \theta = 1 - \frac{R_{ct}(antes)}{R_{ct}(depois)}$$

O que equivale, naturalmente, à Eq. 30. Algumas das falhas deste modelo, além das limitações impostas na sua dedução, é que se espera que para uma monocamada a resistência de transferência de carga aumente infinitamente, portanto para recobrimentos elevados ele seria particularmente falho.

ANEXO C – Associação entre distribuição de Boltzmann e orientações de moléculas adsorvidas em interface eletrizada

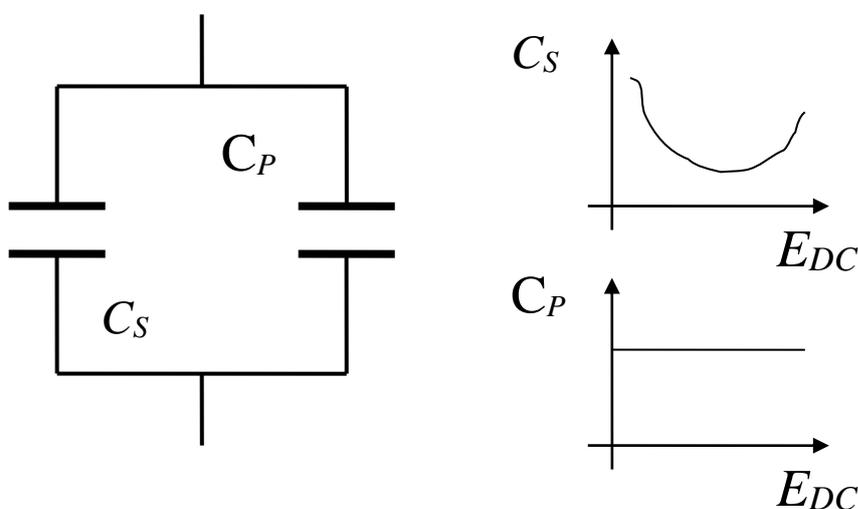
Se há um intercâmbio entre as orientações com dipolo paralelo e perpendicular ao campo elétrico, podemos dizer que a razão entre as respectivas populações nos referidos estados, η_{\parallel} e η_{\perp} , é proporcional a diferença de energia entre elas. Neste caso, assumindo um modelo simplesmente elétrico, esta diferença de energia é $p \cdot X \cdot [\cos(0^\circ) - \cos(90^\circ)] = p \cdot X$. Deste modo a equação de Boltzmann para este caso seria:

$$\frac{\eta_{\perp}}{\eta_{\parallel}} = \exp \left[- \frac{pX}{kT} \right]$$

O campo elétrico está relacionado à carga q uma vez que $X = q / (A\epsilon\epsilon_0)$, e esta pode ser obtida pela variação da capacitância com o potencial:

$$q = \int_{E_0}^E C dE$$

em E_0 é o PZC. A variação na capacitância causada pela proteína é constante ao longo da faixa de potencial estudada, de modo que o comportamento das curvas de capacitância vs. potencial antes e depois da adsorção pode ser interpretado como no seguinte modelo, no qual a capacitância da proteína (C_P) é arranjada em paralelo com a capacitância da solução (C_S), mas só esta última varia com o potencial:



Neste caso a capacitância após a adsorção da proteína seria a soma $C = C_S + C_P$, que varia com o potencial porque C_S é uma função de E_{DC} , embora C_P não seja. Isso implica que a diferença $C - C_S$ fornece C_P , que por ser independente do potencial, pode ser retirada da integral que relaciona capacitância e carga, gerando a relação $q = C_P \cdot (E - E_0)$.

Consequentemente, a seguinte relação pode ser derivada:

$$\frac{\eta_{\perp}}{\eta_{\parallel}} = \exp\left[-\frac{pX}{kT}\right] = \exp\left[-\frac{pq}{kTA\epsilon_p\epsilon_0}\right] = \exp\left[-\frac{pC_P(E - E_0)}{kTA\epsilon_p\epsilon_0}\right] = \eta_0 \exp[-\gamma E]$$

Em que $\eta_0 = \exp(\gamma E_0)$ e $\gamma = pC_P / (kTA\epsilon_p\epsilon_0)$.

O valor de C_P/A pôde ser estimado dos nossos dados pela média dos valores de $(C - C_{\theta=0})$ para os diferentes potenciais, gerando um valor de $39,4 \times 10^{-3} \text{ F} \cdot \text{m}^{-2}$ (importante lembrar que neste caso $\theta = 0,23$). Para empregar as equações deduzidas acima nos resultados que obtivemos temos que supor que o decaimento supostamente exponencial observado na Figura

27(b) seja referente à mudança de população das moléculas em diferentes orientações, e que este processo promove uma variação na distribuição energética da superfície de modo que influencia o valor de α . Postulamos que a relação entre α e a distribuição energética é direta, *premissa que pode não ser verdadeira*, embora isso não invalide o modelo, mas sua aplicação nos resultados obtidos nos presentes experimentos. Porém, assumindo esta premissa, o valor Ω_3 obtido por ajuste não linear para uma função exponencial $y = \Omega_1 + \Omega_2 \exp(\Omega_3 x)$ nos dados da Figura 27(b) poderia fornecer uma estimativa dos valores de ε_P ou de p . Como empregamos previamente $\varepsilon_P = 15$, usamos este valor para estimar p . Ele pode ser obtido, portanto, através da equação abaixo:

$$\gamma = pC_P / (kT A \varepsilon_P \varepsilon_0) \Rightarrow p = \gamma (kT \varepsilon_P \varepsilon_0) / (C_P / A)$$

Se usarmos o valor de $\Omega_3 = (1/0,14)$ obtido pelo ajuste da função exponencial dos dados como uma estimativa de γ , temos que:

$$p = \gamma (kT \varepsilon_P \varepsilon_0) / (C_P / A)$$

$$p = (1/0,14) \text{V}^{-1} (1,38 \times 10^{-23} \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \times 298,16 \text{K} \times 15 \times 8,85 \times 10^{-12} \text{C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}) / (39,4 \times 10^{-3} \text{C} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-2})$$

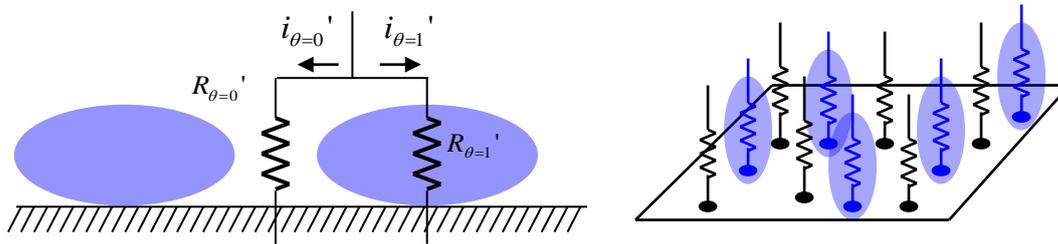
$$p = 9,9 \times 10^{-29} \text{C} \cdot \text{m} (1 \text{D} / 3,33564 \times 10^{-30} \text{C} \cdot \text{m}) = 30 \text{D}$$

O momento de dipolo elétrico de proteínas geralmente se situa na faixa de centenas de Debyes [259], de modo que o valor estimado é relativamente baixo. Deve-se levar em conta, entretanto, que empregamos C_P para $\theta = 0,23$ no cálculo. É de se esperar que só seria possível estimar valores razoáveis de momento de dipolo da proteína quanto houvesse a formação de uma monocamada. Experimentos verificando as curvas de $\Delta\alpha$ vs. E_{DC} para diferentes recobrimentos mostrariam, neste caso, uma queda menos abrupta para concentrações menores de proteína adsorvida, levando a observação de maiores momentos de dipolo estimados.

ANEXO D - Dedução do recobrimento em função da resistência via modelo elétrico

Similarmente ao sistema deduzido no ANEXO A, podemos considerar uma superfície com sítios desocupados, cuja corrente que os perpassam é $i_{\theta=0}$, e sítios ocupados cuja

corrente é $i_{\theta=1}'$, como resultado de uma diferença de potencial E através de resistências $R_{\theta=0}'$ e $R_{\theta=1}'$, como representado na figura abaixo:



Considerando que a corrente total é a soma das correntes em paralelo, é possível obter relação análoga à deduzida para capacitâncias no ANEXO A (pois a capacitância resultante de capacitâncias em paralelo também é a soma das capacitâncias individuais):

$$i = i_{\theta=0}'(N - N_{ads}) + i_{\theta=1}'N_{ads} = \frac{i_{\theta=0}'}{N}(N - N_{ads}) + \frac{i_{\theta=1}'}{N}N_{ads} = i_{\theta=0}'(1 - \theta) + i_{\theta=1}'\theta$$

Considerando a lei de Ohm:

$$\frac{E}{R_{\theta}} = \frac{E}{R_{\theta=0}}(1 - \theta) + \frac{E}{R_{\theta=1}}\theta \Rightarrow \theta = \left(\frac{1}{R_{\theta}} - \frac{1}{R_{\theta=0}} \right) \left(\frac{1}{R_{\theta=1}} - \frac{1}{R_{\theta=0}} \right)^{-1} = \left(\frac{R_{\theta=0} - R_{\theta}}{R R_{\theta=0}} \right) \left(\frac{R_{\theta=1} R_{\theta=0}}{R_{\theta=0} - R_{\theta=1}} \right)$$

$$\theta = \left(\frac{R_{\theta=1}}{R_{\theta}} \right) \left(\frac{R_{\theta=0} - R_{\theta}}{R_{\theta=0} - R_{\theta=1}} \right) \Rightarrow \theta = \left(\frac{R_{\theta=1}}{R_{\theta}} \right) \left(\frac{R_{\theta} - R_{\theta=0}}{R_{\theta=1} - R_{\theta=0}} \right)$$

É importante notar que para $R_{\theta=1} \gg R_{\theta=0}$, $\theta \approx 1 - R_{\theta=0}/R_{\theta}$, que é a mesma relação deduzida no ANEXO B. Por outro lado ela considera a possibilidade de que haja uma corrente através das moléculas adsorvidas, de modo que para um eletrodo totalmente recoberto a resistência observada não seja infinitamente grande.