

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO  
ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**PRODUÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE BIOPOLÍMEROS ATRAVÉS DE  
DEPOSIÇÃO “LAYER-BY-LAYER” COM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS  
E DE IMOBILIZAÇÃO DE LINFÓCITOS**

**AUTOR: FERNANDO DA CRUZ VASCONCELLOS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. MARISA MASUMI BEPPU**

**Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Engenharia Química como parte dos pré-requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química**

**Campinas - São Paulo**

**Julho - 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

V441p	<p>Vasconcellos, Fernando da Cruz Produção de nanoestruturas de biopolímeros através de deposição "Layer-by-Layer" com propriedades antibacterianas e de imobilização de linfócitos / Fernando da Cruz Vasconcellos. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Marisa Masumi Beppu. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Biopolímeros. 2. Linfócitos. 3. Nanotecnologia. 4. Filmes finos. 5. Nanoestrutura. I. Beppu, Marisa Masumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em Inglês: Production of biopolymer nanostructures through layer-by-layer deposition with antibacterial and lymphocyte immobilization properties

Palavras-chave em Inglês: Biopolymers, Lymphocytes, Nanotechnology, Thin films, Nanostructure

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Edvaldo Sabadini, Rubens Maciel Filho,  
Olga Zazuco Higa, Bronislaw Polakiewicz

Data da defesa: 25-05-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Fernando da Cruz Vasconcellos e aprovada em 25 de maio de 2011  
pela banca examinadora constituída pelos doutores:



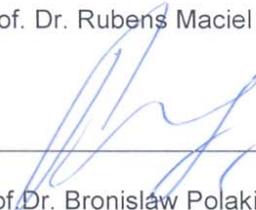
Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu - Orientadora



Prof. Dr. Edvaldo Sabadini



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho



Prof. Dr. Bronisław Polakiewicz



Profa. Dra. Olga Zazuco Higa



ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO  
DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDO DA CRUZ VASCONCELLOS,  
E ORIENTADA PELA PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. MARISA MASUMI BEPPU.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Masumi Beppu (orientadora)

CAMPINAS - 2011



Dedico esta Tese  
à minha família.



Agradeço em primeiro lugar a minha família, em especial minha esposa Florencia Wisnivesky Rocca Rivarola, minha mãe Elza da Costa Cruz Vasconcellos, meu pai José Inácio Cotrim Vasconcellos, e meu irmão Bernardo da Cruz Vasconcellos, por todo o apoio durante toda minha vida.

À professora Marisa M. Beppu, pela orientação, apoio durante todo o período de doutorado, e suas contribuições para a minha formação acadêmica e profissional. Agradeço também por ter aberto a possibilidade de colaborar com grupos do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT).

Aos professores Michael F. Rubner e Robert E. Cohen, dos departamentos de Ciência de Materiais e Engenharia e Engenharia Química, respectivamente, do *Massachusetts Institute of Technology*, pela co-orientação e por terem sempre me incentivado, em todos os momentos, durante minhas pesquisas durante e após minha estadia no MIT.

Aos professores Darrell J. Irvine e Krystyn van Vliet, do MIT pela colaboração de sugestões ao longo do trabalho de doutorado. Aos professores Edivaldo Sabadini, Rubens Maciel Filho, Theo Kieckbusch, e Sônia Alves Bueno, da UNICAMP, à professora Olga Zazuco Higa do IPEN, e ao professor Bronislaw Polakiewicz, da USP São Paulo, pelas sugestões e contribuições nos exames de qualificação de doutorado, que enriqueceram muito o trabalho.

Aos amigos do laboratório LEQUIP da UNICAMP que contribuíram com discussões e apoio ao longo do doutorado: Ennio B. Flores, Rogério A. Bataglioli, Mariana A. Moraes, Fernanda C. de Godoi, Rodrigo B. Rabelo, Raquel F. Weska, Grinia M. Nogueira, Wellington Vieira, Rafael Tiba.

Aos meus colegas do MIT: Albert J. Swiston, Nurxat Nuraje, Koushik Mukherjee, Jun Young Kim, Adam Zeiger, Jenny Lichter, Pinar Kurt, Gary Chia, Erik H. Williamson, Wui Siew Tan, Jonathan DeRocher, Shreerang Chhatre, Yi Du, e Hiro Shimomura.

Agradeço ao suporte financeiro da CAPES, do CNPq, da FAPESP e do CMSE (*Center for Material Science and Engineering*), MIT.

À UNICAMP e ao MIT por toda a infraestrutura e suporte durante o desenvolvimento desta tese de doutorado.

À toda minha família, pelo amor, amizade e carinho.

---

*“The best way to predict the future is to invent it.”*

(Alan Kay)



## RESUMO

O trabalho trata da produção de filmes nanoestruturados multicamadas de biopolímeros sobre substratos sólidos com a técnica de deposição *layer-by-layer* (LbL). A técnica de montagem *layer-by-layer* é uma ferramenta adequada para produção controlada de filmes de multicamadas com propriedades importantes tais como: a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a baixa toxicidade, a hidrofiliabilidade e a baixa citotoxicidade, concedendo a estes filmes grande versatilidade em suas aplicações. O foco principal da pesquisa foi estudar multicamadas dos polieletrólitos naturais quitosana e ácido hialurônico e sua aplicabilidade para: 1) promover a adesão de linfócitos B, 2) gerar superfícies antibacterianas. Os testes da preparação e o estudo da variação de parâmetros de montagem de filmes dos biopolímeros, assim como sua caracterização foram úteis para a avaliação dessas aplicações. O estudo também incluiu a produção de filmes multicamadas contendo outros biopolímeros (alginato de sódio e carboximetilcelulose), assim como polímeros sintéticos e nanopartículas. A caracterização dos filmes envolveu diversas técnicas de análise, dentre elas: microscopia de força atômica (MFA), que permitiu obter informações sobre a topologia e elasticidade dos filmes, e microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D), que permitiu fazer uma análise em tempo real das características dos filmes durante a deposição dos biopolímeros. Os resultados obtidos neste trabalho mostram a viabilidade da fabricação de filmes multicamadas a base de biopolímeros para uso na imobilização de linfócitos B. Os resultados mapeiam e otimizam as variáveis de preparação dos filmes de multicamadas dos polieletrólitos (PEMs) de HA e CHI através do pH, força iônica, e última camada depositada, que influenciam a imobilização seletiva dos linfócitos. Estes filmes exploram as interações CD44-ácido hialurônico sem a necessidade de utilização de reações químicas agressivas e promovem a adesão seletiva de linfócitos assegurando a viabilidade, habilidade de replicação e funções dos linfócitos, após a imobilização. Filmes assim construídos tem aplicação em biossensores a base de células, engenharia do sistema imune, sistemas de diagnóstico e tratamento de doenças entre outras. Os resultados mostraram também que a técnica LbL é viável para a construção de superfícies antibacterianas. As propriedades antibacterianas e de imobilização de linfócitos da superfície desses filmes são passíveis de aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chaves:** Biopolímeros, *Layer-by-Layer*, Linfócitos, Bionanotecnologia, Superfícies Antibacterianas



## ABSTRACT

This thesis is on the production of biopolymer nanostructured multilayered thin films deposited on solid substrates utilizing the layer-by-layer (LbL) deposition technique. The layer-by-layer deposition technique of assembly is a simple yet versatile and powerful tool for the controlled production of biopolymer multilayered thin films carrying important properties, such as: biocompatibility, biodegradability, low toxicity, hydrophilicity, low cytotoxicity, which entice them as candidates for a wide variety of applications. The main focus of the research was the study of natural biopolymer polyelectrolytes such as chitosan and hyaluronic acid, and their applicability in: 1) promoting the adhesion of B lymphocytes, and 2) generating antibacterial surfaces. The film preparation process in itself and the study of the film properties as a function of deposition parameters, such as pH and ionic strength, during assembly, were very important in tailoring the multilayer film for specific applications. The study also included the production of multilayered films composed by other biopolymers (sodium alginate, carboxymethylcellulose), as well as by synthetic polymers and nanoparticles. The characterization of the films involved various techniques, such as: atomic force microscopy (AFM) - which allowed the acquisition of information regarding film topology and elasticity, and the quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), which permitted an analysis, in real time, of the film characteristics during deposition of the biopolymers. The results obtained in this work show the feasibility of fabricating multilayered thin films based on biopolymers for their use in the adhesion of B lymphocytes. The results map out and optimize the preparation of polyelectrolyte multilayered (PEMs) composed of HA and CHI through the variation of pH, ionic strength, and choice of last layer deposited, all factors that influence the selective immobilization of lymphocytes. These films explore the CD44-hyaluronic acid interactions without the use of aggressive chemical reactions to promote the selective adhesion of lymphocytes, maintaining their viability, meaning, maintaining their ability to replicate and their native functions after being immobilized. The results also show the feasibility of the LbL technique in producing biopolymer films having antibacterial properties. Both film characteristics – the adhesion and the antibacterial properties – find applicability in the area of bionanotechnology. These films may be used in the fabrication of cell based sensors, in immune system engineering, in diagnostics systems and in disease treatments, among others.

**Keywords:** Biopolymers, *Layer-by-Layer*, Lymphocytes, Bionanotechnology, Antibacterial Surfaces



## SUMÁRIO

Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
Sumário .....	xvii
Lista de Figuras .....	xxi
Lista de Tabelas .....	xxvii
Nomenclatura .....	xxix
CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO .....	1
CAPÍTULO 2 .....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 INTRODUÇÃO .....	3
2.1.1 Quitosana .....	3
2.1.2 Ácido Hialurônico .....	4
2.1.3 Alginato de Sódio .....	5
2.1.4 Carboximetilcelulose .....	5
2.2 Biomateriais .....	6
2.3 Técnica de Deposição <i>Layer-by-Layer</i> (LbL) .....	6
2.4 Técnica LbL de Produção de PEMs .....	7
2.5 Modelos da Formação de Multicamadas de Polieletrólitos .....	10
2.6 Modelos de Zonas para as Multicamadas de Polieletrólitos .....	12
2.7 LbL com Quitosana e Ácido Hialurônico .....	13
2.8 LbL com Quitosana e Alginato de Sódio .....	15
2.9 LbL com Quitosana e Carboximetilcelulose .....	17
2.10 Estudos de LbL com outros Biopolímeros .....	18
2.11 Aplicações de PEMs na Área Biomédica .....	18
2.11.1 Aplicações de PEMs envolvendo células .....	19
2.11.2 Aplicações de PEMs envolvendo células do sistema imunológico .....	20
2.11.3 Aplicações de PEMs envolvendo bactérias .....	21
2.11.4 Métodos e Máquinas de Automação para a Deposição LbL .....	23
CAPÍTULO 3 .....	25
PEMs DE BIOPOLÍMEROS .....	25
3.1 INTRODUÇÃO .....	25
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.2.1 Materiais .....	26
3.2.2 Métodos de Preparação e Caracterização de PEMs .....	27
3.2.2.1 Preparação de Substratos para Deposição LbL .....	27
3.2.2.2 Preparação de Soluções de Polieletrólitos .....	27
3.2.2.3 Preparação das Multicamadas de Polieletrólitos (PEMs) .....	28
3.2.3 Caracterizações das PEMs .....	29
3.2.3.1 Perfilometria .....	29

3.2.3.2 Elipsometria .....	30
3.2.3.3 Ângulo de Contato .....	33
3.2.3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	33
3.2.3.5 Espectroscopia UV-Vis .....	34
3.2.3.6 Microscopia de Força Atômica .....	34
3.2.3.7 Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação (QCM-D) .....	35
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.3.1 Formação de Filmes PEMs .....	37
3.3.2 Ângulo de Contato de PEMs de HA/CHI .....	53
3.3.3 FTIR das PEMs de HA/CHI.....	54
3.3.4 Adsorção de Corantes e UV-Vis das PEMs de HA/CHI .....	55
3.3.5 Microscopia de Força Atômica (MFA) das PEMs de HA/CHI.....	58
3.3.6 QCM-D das PEMs de HA/CHI.....	61
3.3.7 Sistemas ALG/CHI e CMC/CHI.....	66
3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	70
CAPÍTULO 4 .....	71
MULTICAMADAS DE POLIELETRÓLITOS PARA PROMOVER A IMOBILIZAÇÃO DE LINFÓCITOS B .....	71
4.1 INTRODUÇÃO .....	71
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
4.2.1 Materiais.....	73
4.2.2 Preparação de Substratos para Deposição LbL.....	74
4.2.3 Preparação de Soluções de Polieletrólitos e Nanopartículas.....	74
4.2.4 Montagem das PEMs .....	75
4.2.5 PEMs de HA/CHI para Adesão de Linfócitos .....	75
4.2.6 Cultura de Linfócitos B CH27 .....	75
4.2.7 Adesão de Linfócitos nas PEMs.....	75
4.2.8 Espessura e Rugosidade das PEMs .....	77
4.2.9 Espectroscopia UV-Visível .....	77
4.2.10 Adesão de Linfócitos B.....	77
4.2.11 Filmes de PEMs Padronizados .....	78
4.2.12 Imagens e Nanoindentação com MFA.....	79
4.2.13 Descolamento das PEMs com Linfócitos B.....	80
4.2.14 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM).....	80
4.2.15 Viabilidade dos Linfócitos B.....	81
4.2.16 Reação de PEMs com SPDP para Adesão de Linfócitos.....	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.3.1 Construção das PEMs para Adesão de Linfócitos .....	82
4.3.2 Adesão de Linfócitos B CH27.....	83
4.3.3 Adesão de Linfócitos em Filmes de PEMs Padronizados .....	85
4.3.4 Determinação de grupos Carboxila do HA e Amônio da CHI.....	92
4.3.5 Módulo de Elasticidade e Topografia de Filmes de PEMs .....	95
4.3.6 Linfócitos Funcionalizadas com PEMs em Solução RPMI .....	99
4.3.7 Reação de PEMs com SPDP .....	101
4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	104
4.5 APÊNDICE .....	106

---

CAPÍTULO 5 .....	109
FILMES FINOS ANTIBACTERIANOS COMPOSTOS POR MULTICAMADAS DE BIOPOLÍMEROS .....	109
5.1 INTRODUÇÃO .....	109
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	111
5.2.1 Materiais .....	111
5.2.2 Preparação das PEMs. ....	111
5.2.3 Teste de Proliferação de Bactérias – Ensaio <i>Waterborne</i> . ....	112
5.3 RESULTADOS .....	113
5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	115
5.5 APÊNDICE .....	116
CONCLUSÕES FINAIS .....	117
TRABALHOS FUTUROS E EM ANDAMENTO .....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	123
ANEXO I .....	139
SISTEMA-MÁQUINA AUTOMÁTICA DE IMERSÃO PARA A TÉCNICA <i>LAYER-BY-LAYER</i> .....	139
A.0 INTRODUÇÃO .....	139
A.1 Fundamentos da Invenção .....	140
A.2 Projeto e Construção da Máquina Automática LbL Nanostructure Pro .....	141
A.3 Operação do Equipamento LbL Nanostructure Pro .....	143
A.4 Produção de Filmes Nanoestruturados com LbL Nanostructure Pro .....	144
A.5 CONCLUSÃO PARCIAL .....	144
A.6 TRABALHOS FUTUROS .....	145
A.7 APÊNDICE .....	146



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 2.1.** Estrutura molecular da quitosana.

**Figura 2.2.** Representação da estrutura química do ácido hialurônico. (A = ácido D-glicurônico, B = N-acetil-glicosamina)

**Figura 2.3.** Representação da estrutura química do alginato de sódio. (M = ácido manurônico, G = ácido gulurônico)

**Figura 2.4.** Representação da estrutura química da carboximetilcelulose.

**Figura 2.5.** (A) Idealização do processo de formação do filme de multicamadas. (B) Imagens moleculares simplificadas das duas primeiras adsorções, mostrando a deposição do filme a partir de um substrato de carga positiva.

**Figura 2.6.** Desenho esquemático do modelo de zonas para multicamadas de polieletrólitos.

**Figura 2.7.** Representação esquemática das interações iônicas entre a quitosana (CHI) e o ácido hialurônico (HA): (A) pH 3,0 ; (B) pH 5,0.

**Figura 2.8.** Representação esquemática das interações iônicas entre a quitosana e o alginato: (A) pH 2,0 ; (B) pH 5,4.

**Figura 3.1.** Representação da estrutura química do poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC).

**Figura 3.2.** Representação da estrutura química do poliestireno sulfonato de sódio (SPS).

**Figura 3.3.** Representação esquemática de uma medida de elipsometria.

**Figura 3.4.** Procedimento básico utilizado em medidas de elipsometria para determinar propriedades de materiais a partir de dados experimentais.

**Figura 3.5** Exemplo de parâmetros para análise de filmes com a técnica de elipsometria, (A) utilizando *wafer* de Si, e (B) lâmina de vidro.

**Figura 3.6.** Representação da estrutura química do corante azul de alciano.

**Figura 3.7.** Equipamento Q-Sense D300.

**Figura 3.8.** Representação esquemática do modelo de Voigt.

**Figura 3.9.** Representação esquemática da superfície de (A) substratos de vidro e (B) *wafer* de silício.

**Figura 3.10.** Representação esquemática da reação de substratos de vidro com NaOH.

**Figura 3.11.** Representação esquemática das reações de *wafers* de silício com plasma de oxigênio.

**Figura 3.12.** Espessura de PEMs de CHI/HA em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 ou pH 5,0, e 0 mM NaCl, depositados sobre *wafers* de silício. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.13.** Representação esquemática dos regimes de crescimento de PEMs de CHI/HA em substratos sólidos.

**Figura 3.14.** Representações esquemáticas de crescimento de PEMs de CHI/HA em condições de (A) pH 3,0 e (B) pH 5,0, depositados sobre *wafers* de silício.

**Figura 3.15.** Rugosidade (*rms*) dos filmes de CHI/HA em função do número de bicamadas depositadas diretamente em *wafers* de silício, preparados em pH 3,0 ou pH 5,0, e 0 mM NaCl. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figure 3.16.** Percentagem da rugosidade (*rms*) dos filmes de CHI/HA normalizado pela espessura do filme respectivo, em função do número de bicamadas depositadas diretamente sobre *wafers* de silício. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.17.** Medida de perfilometria de filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> depositados sobre lâminas de vidro, (A) imagem óptica do filme com ranhura feita com um estilete, (B) gráfico de análise da espessura e rugosidade (*rms*) do filme (em angstroms) versus a distância percorrida pela ponta de diamante (*stylus*).

**Figura 3.18.** Filmes de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> depositados sobre (A) vidro e (B) *wafer* de Si.

**Figura 3.19.** Exemplo de um gráfico de dados experimentais e modelados de elipsometria para um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>.

**Figura 3.20.** Comparação de medidas de curvas de crescimento de HA3/CHI3, 0 mM NaCl, através de medidas com as técnicas de perfilometria e elipsometria.

**Figura 3.21.** Espessura de PEMs de HA/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM e 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 7 medidas: perfilometria)

**Figura 3.22.** Representação esquemática da conformação das cadeias poliméricas, de (A) CHI e (B) HA, em soluções preparadas na ausência e na presença de NaCl, e em pH 3,0 e pH 5,0.

**Figura 3.23.** Rugosidade (*rms*) de filmes (nm) de (CHI3/HA3) e (HA5/CHI5) na ausência e presença de 100 mM NaCl em função do número de bicamadas. (depositados em lâminas de vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>; média de 7 medidas de perfilometria)

**Figura 3.24.** Espessura e rugosidade de filmes de HA3/CHI6, 0 mM NaCl, depositados em *wafers* de Si recobertos com a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> em função do número de bicamadas. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.25.** Béqueres contendo soluções de HA3 e CHI6 para a formação de PEMs, após a deposição de 20 bicamadas: (A) HA3 com três soluções de lavagem com pH 3,0, e CHI6 com todas as soluções de lavagem com pH 6,0; (A) HA3 com três soluções de lavagem com pH 3,0, e CHI6 com três lavagens consecutivas com pH 6,0, pH 3,0, e pH 3,0, respectivamente.

**Figura 3.26.** Filmes de (HA3/CHI6)<sub>20</sub> preparados com (A) todas as soluções de lavagem de CHI com pH 6,0, e (B) com uma solução de lavagem com pH 6,0, seguida de duas soluções de lavagem com pH 3,0 para CHI.

**Figura 3.27.** Ângulos de contato estáticos de água Milli-Q (pH 5,7) em filmes de CHI3/HA3 depositados (na presença e ausência de 100 mM NaCl) em lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 7 medidas: goniômetro)

**Figura 3.28.** Absorbância (unidades arbitrárias) versus comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>) para filmes de (CHI3/HA3)<sub>25</sub> e (CHI5/HA5)<sub>25</sub> depositados sobre janelas de ZnSe.

**Figura 3.29.** Imagens de lâminas de vidro contendo filmes de HA3/CHI3, 100 mM NaCl, com a incorporação do corante azul de alciano, em função do número de bicamadas (0,5 - 9,5) depositadas.

**Figura 3.30.** Absorbâncias de lâminas de vidro contendo filmes de HA3/CHI3, 100 mM NaCl, com a incorporação do corante azul de alciano, em função do número de bicamadas (0,5 - 9,5) depositadas.

**Figura 3.31.** Imagens MFA (5 μm x 5 μm) de filmes de (a) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, (b) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, (c) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, (d) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, 100 mM NaCl, (e) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, 100 mM NaCl, (f) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3</sub>, (g) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3,5</sub>, (h) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3</sub>, 100 mM NaCl.

**Figura 3.32.** Análise de MFA contendo a (a) altura, (b) rugosidade para um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>.

**Figura 3.33.** Rugosidade de filmes de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> e HA/CHI preparados com pH 3,0 e pH 5,0, com ou na ausência de 100 mM NaCl, na soluções poliméricas (medidas através de MFA).

**Figura 3.34.** Dados de QCM-D (Frequência e Dissipação em função do tempo e número de camadas depositadas) de filmes de (HA3/CHI3) depositados com (A) 0 mM NaCl e, (B) 100 mM NaCl nas soluções poliméricas.

**Figura 3.35.** Modelagem (pontos pretos) das curvas de frequência (curva azul) e dissipação (curva vermelha) para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) sem NaCl.

**Figura 3.36.** Modelagem (pontos pretos) das curvas de frequência (curva azul) e dissipação (curva vermelha) para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) com 100 mM NaCl.

**Figura 3.37.** Modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) sem NaCl.

**Figura 3.38.** Modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) com 100 mM de NaCl.

**Figura 3.39.** Comparação da modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de sete bicamadas de (HA3/CHI3) com 100mM de NaCl (curva verde) e sem NaCl (curva azul).

**Figura 3.40.** Espessura de PEMs de ALG/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM NaCl e com 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.41.** Rugosidade de PEMs de ALG/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM NaCl e 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.42.** Espessura de PEMs de CMC/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 4,0, 0 NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 3 medidas: perfilometria)

**Figura 3.43.** Absorbância de azul de alciano (*alcian blue*) em filmes de (HA3/CHI3)<sub>3</sub>, (CMC4/CHI4)<sub>3</sub> e (ALG3/CHI3)<sub>3</sub>.

**Figura 4.1.** Desenhos esquemáticos e imagens ópticas da adesão de linfócitos B em filmes nas forma de filmes uniformes e padronizados.

**Figura 4.2.** Desenhos esquemáticos ilustrando a adesão de linfócitos em filmes de PEMs planos (A) e filmes padronizados (B).

**Figura 4.3.** Ilustração esquemática do processo que utiliza uma abordagem tradicional fotolitográfica de descolamento para padronizar filmes poliméricos ultrafinos.

**Figura 4.4.** Estrutura molecular do reticulante heterobifuncional sulfo-LC-SPDP.

**Figura 4.5.** Desenho esquemático da ligação entre PEMs de HA/CHI e linfócitos B com SPDP – agente quelante.

**Figura 4.6.** Adesão de linfócitos B em filmes de (a) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,x</sub> e (b) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3,x</sub>, para x=0 ou 5. Barras de erro correspondem ao erro padrão da média da amostra, para 7 medidas independentes em 7 replicatas.

**Figura 4.7.** Micrografias ópticas de linfócitos B aderidos em filmes de (a) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub> construído com 100 mM NaCl (a PEM com a maior adesão de linfócitos), (b) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub> construído sem NaCl (o segundo melhor sistema de adesão), e (c) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub> construído com 100 mM NaCl (PEM com a menos eficiente adesão). Escala = 50 μm.

**Figura 4.8.** Imagem fluorescente de um filme padronizado de (MNP4/FITCPAH3)<sub>9,5</sub>(CHI3/HA3)<sub>3</sub> construído com 100 mM NaCl. Escala = 50 μm.

**Figura 4.9.** Linfócitos B aderidos em filmes padronizados de (a) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3</sub> (ocupação de ~57%), (b) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3</sub> construído com 100 mM NaCl (ocupação ~71%), (c) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3,5</sub> (ocupação ~54%), e (d) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3,5</sub> construído com 100 mM NaCl (ocupação de ~56%) após 1 hora de agitação e incubação. Escala = 50 μm.

**Figura 4.10.** Imagem óptica de um filme padronizado de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>(CHI3/HA3)<sub>3</sub> fabricado com 100 mM NaCl aderindo linfócitos B. Escala = 500 μm.

**Figura 4.11.** Filmes padronizados com linfócitos B após 2 horas de agitação e incubação em filmes de (a) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3</sub> construídos com 100 mM NaCl (ocupação ~ 97%) e (b) (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3,5</sub> sem NaCl (ocupação ~ 90%); (c) linfócitos B aderidos não especificamente em um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, (representativo da superfície intersticial dos filmes padronizados). Escala = 50 μm.

**Figura 4.12.** Imagens ópticas de linfócitos B com PEMs de (ALG3/CHI3)<sub>3</sub> e (ALG3/CHI3)<sub>3,5</sub>, ambos com 0 mM NaCl, antes e após a etapa de lavagem com HBSS, demonstrando que não há adesão seletiva de linfócitos nestes filmes de PEMs.

**Figura 4.13.** Desenho esquemático e micrografias dos filmes padronizados onde os linfócitos B foram introduzidos e incubados nos filmes com a terminação de HA e CHI na presença e na ausência de 100 mM NaCl, respectivamente – antes e após a etapa de adicionar HA solúvel para aderir competitivamente com o receptor CD44 ou CHI.

**Figura 4.14.** Absorbância do corante azul de alciano para filmes de (a) (HA3/CHI3) e (b) (HA5/CHI5) normalizados pela espessura dos filmes. Os números 1 a 4 correspondem aos filmes com a maior a menos capacidade de adesão de linfócitos.

**Figura 4.15.** Absorbância do corante rosa de bengala para filmes de (a) (HA3/CHI3) e (b) (HA5/CHI5) normalizados pela espessura dos filmes. Os números 1 a 4 correspondem aos filmes com a maior a menos capacidade de adesão de linfócitos.

**Figura 4.16.** Módulos de elasticidade e morfologia de filmes de PEM de HA3/CHI3. (a) Módulos de Young  $E$  (média ± desvio padrão) medidos via nanoindentação com microscopia de força atômica indicado pela diferença estatística significativa entre estes quatro filmes (ANOVA,  $p = 0,15$ ). (b) Imagens de topografia de MFA com modo contato mostram que montagem na presença de sal altera a morfologia de superfície das PEMs. A comparação com a Figura 4.6a indica que não há uma correlação entre esta topologia de superfície e a adesão de linfócitos B.

**Figura 4.17.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de (HA3/CHI3)<sub>3</sub>, 0 mM NaCl.

**Figura 4.18.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de (HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, 0 mM NaCl.

**Figura 4.19.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de (HA3/CHI3)<sub>3</sub>, 100 mM NaCl.

**Figura 4.20.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de (HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, 100 mM NaCl.

**Figura 4.21.** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de linfócitos funcionalizados com PEMs de -(MNP4/FITC-PAH)<sub>9,5</sub>(CHI3/HA3)<sub>3</sub>, com 100 mM NaCl.

**Figura 4.22.** Imagens de microscopia fluorescente de PEMs funcionalizadas com o ligante SPDP (região de fluorescência na metade do lado esquerdo).

**Figura 5.1.** Representação esquemática dos ensaios *waterborne* com bactérias em filmes de PEMs.

**Figura 5.2.** Ensaios *waterborne* com *S. epidermidis* mostrando nenhuma atividade antibacteriana em substratos de vidro sem recobrimento e em substratos recobertos com (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>2</sub> e (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, demonstrando uma redução de adesão bacteriana de 90 e 99%, respectivamente, em comparação ao vidro e ao vidro recoberto somente com um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>.

**Figura A.1.** Representação esquemática do processo de deposição *layer-by-layer*.

**Figura A.2.** Imagem do sistema da máquina automática de imersão.

**Figura A.3.** Desenho esquemático do sistema da máquina automática de imersão.

**Figura A.4.** Interface personalizada para controle do sistema da máquina automática de imersão.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 3.1.** Exemplo de uma medida de espessura de um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> com a técnica de elipsometria.

**Tabela 4.1.** Valores de espessura e rugosidade de filmes de HA/CHI com 3,0 e 3,5 camadas depositados sobre uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. A média foi obtida de sete medidas, cada uma realizada em 7 replicatas.

**Tabela 4.2.** Quantificação dos diferentes cenários da adesão de linfócitos B em função das condições de deposição e tempos de incubação. Todos os filmes foram construídos com pH 3,0. A ocupação total dos filmes padronizados aumenta com o tempo de incubação, mas o número de células fora das PEMs em forma de cilindros é constante, indicando que a adesão fora das PEMs em forma de cilindros não é específica.



## NOMENCLATURA

Å	Angstroms
AC	Acetato de Celulose
Ag	Prata
ALG	Alginato de Sódio
An	Índice de Refração
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
CHI	Quitosana
CLSM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
CMC	Carboximetilcelulose
CMSE	<i>Center for Materials Science and Engineering</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSE	<i>Department of Materials Science and Engineering</i>
<i>E</i>	Módulo de Young
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida Hidrocloro
FCS	Soro Fetal Bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FT-IR	Transformada de Fourier no Infravermelho
G	Gramas
G+	Gram Positiva
G-	Gram Negativa

GS	Grau Médio de Substituição
HA	Ácido Hialurônico
hiAc	Hidrocloreto de Acridina
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
Hz	Hertz
IDM	Idometacina
ISN	<i>Institute for Soldier Nanotechnologies</i>
LB	<i>Lauria Broth</i>
LC-SPDP	Sulfosuccinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamide)hexanoate
LCST	Temperatura Mínima de Solução Crítica
LEQUIP	Laboratório de Engenharia e Química de Produtos
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
MNPs	Nanopartículas Superparamagnéticas
MSE	Erro Quadrático Médio
MW	Massa Molecular

N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAH	Poli(alilamina hidroclorada)
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PbS	Sulfeto de Chumbo
PC	Policarbonato
PDAC	Poli(cloreto de dialildimetilamônio)
PEM	Multicamadas de Polieletrólitos
PEG	Poli(etileno glicol)
pKa	Constante de Dissociação do Ácido
pKb	Constante de Dissociação da Base
PLC	Controlador Lógico Programável
PMAA	Polimetil Metacrilato
PNIPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida)
PS	Poliestireno
QCM-D	Microbalança de Cristal com Dissipação
RMS	Raiz Quadrática Média ( <i>root mean squared</i> )
rpm	Revoluções por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAMSA	5-((2-(e-3)-S-(mercapto-acetil)succinil)amino)fluoresceína
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Si	Silício
SiO <sub>2</sub>	Óxido de Silício
S/P	Estreptomicina/Penicilina
SPS	Poli(estireno sulfonato de sodio)
THF	Tetrahidrofurano
Thick	Espessura
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – Visível
w/v	Razão Massa/Volume
ZnSe	Seleneto de Zinco

LETRAS GREGAS

$\Delta$	Ângulo Elipsométrico
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\Psi$	Ângulo Elipsométrico
$\nu$	Sobre-tons (Overtone) do Crystal de QCM-D
$\Omega$	Ohm

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Polieletrólitos são polímeros com cargas positivas (policátions) ou negativas (poliânions) que são geralmente solúveis em água. Complexos de polieletrólitos vêm sendo utilizados em diversas aplicações médicas, como sistemas de liberação controlada de fármacos, adesivos odontológicos, revestimentos entéricos de fármacos, membranas de rins artificiais para diálise de sangue, revestimento de implantes compatíveis com o sangue, lentes de contato, materiais de suporte para regeneração de tecidos, entre outros (SCRANTON *et al.*; 1995, KOTZ, 1996). Presentemente, uma nova classe de complexos de polieletrólitos, os filmes de multicamadas de polieletrólitos (PEMs) produzidos com a técnica de *layer-by-layer* (LbL), vem se destacando por sua versatilidade e aplicabilidade.

Estudos sobre a preparação de PEMs pela técnica de deposição *layer-by-layer* (LbL), têm crescido exponencialmente nos últimos anos. A técnica, apesar de simples, é extremamente versátil para a fabricação de filmes finos multicomponentes nano-estruturados. A fabricação desses filmes multicomponentes pela técnica *layer-by-layer* significa literalmente realizar uma montagem nanoscópica de camada sobre camada, de centenas de diferentes materiais em um único dispositivo utilizando técnicas de baixo custo e ambientalmente sustentáveis. A partir do desenvolvimento do método para preparar multicamadas de polieletrólitos com cargas opostas, uma grande variedade de materiais tem sido utilizada para produzir filmes finos com diversas propriedades e aplicações.

Apesar do grande volume de pesquisas sobre PEMs, a maioria dos estudos foi realizada com polímeros sintéticos, tais como o poli(ácido acrílico) (PAA) e a poli(alilamina hidroclorada) (PAH). PEMs com estes polieletrólitos têm sido estudadas para diversas aplicações, tais como: nanoreatores para a síntese de nanopartículas de prata (WANG *et al.*, 2002); na fabricação de filmes microporosos com constantes dielétricas baixas (DURSTOCK & RUBNER, 2001); substratos que seletivamente controlam a adesão de células (ZHENG *et al.*, 2004, BERG *et al.*, 2004); filmes com propriedades anti-embaçantes e anti-refletivas (CEBECI *et al.*, 2006), dentre outras.

No presente trabalho, o grande interesse foi exatamente estudar PEMs de polímeros naturais. Os filmes de PEMs de polímeros naturais têm vantagens sobre as PEMs obtidas com polímeros sintéticos, no que se refere a aplicações em biotecnologia, onde são de importância

as propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Para esse estudo foram preparados e caracterizados novos materiais compostos por PEMs obtidas pela deposição alternada de polímeros naturais, tais como a quitosana, o ácido hialurônico, o alginato de sódio, e a carboximetilcelulose, sobre substratos sólidos. Devido às características dos biopolímeros mencionados, estes são fortes candidatos para a produção de PEMs de grande aplicabilidade na área de engenharia de processos e materiais visando a área de bionanotecnologia.

Em resumo, o objetivo do trabalho incluiu a produção e a caracterização de PEMs a partir de biopolímeros, sendo desenvolvido nas seguintes etapas:

1. Preparação da montagem do experimento para a execução das deposições consecutivas das multicamadas.
2. Produção dos filmes de PEMs dos polímeros naturais, variando-se parâmetros (pH, concentração de NaCl (força iônica)) de preparação para avaliar a influência destes nas propriedades finais das PEMs.
3. Análise e caracterização dos filmes de PEMs obtidos, com a aplicação das seguintes técnicas de análise: Perfilometria, Elipsometria, Ângulo de Contato, Microscopia de Força Atômica (MFA), e Espectroscopias UV-Vis e de Transformada de Fourier no Infravermelho (FT-IR), e Microbalança de Cristal (QCM-D).
5. Estudo das interações das superfícies das multicamadas com células do sistema imunológico, linfócitos B (*B-cells*), para se obter superfícies para seletivamente promover a adesão de linfócitos.
6. Estudo das interações dos filmes de PEMs com células bacterianas, para se obter superfícies antibacterianas.

O capítulo 2 contém a Revisão Bibliográfica. O capítulo 3 discute os estudos de preparação e caracterização das PEMs de biopolímeros. No capítulo 4 apresenta-se o estudo direcionado para a preparação de superfícies para a adesão de linfócitos B. O capítulo 5 apresenta o estudo da utilização de PEMs de biopolímeros como superfícies antibacterianas. O capítulo 6 apresenta as conclusões finais. O capítulo 7 discute trabalhos em andamento e sugestões para trabalhos futuros, e o capítulo 8 contém as referências bibliográficas. O anexo I trata da concepção e construção de uma máquina automática de imersão, para a preparação de multicamadas LbL.

## CAPÍTULO 2

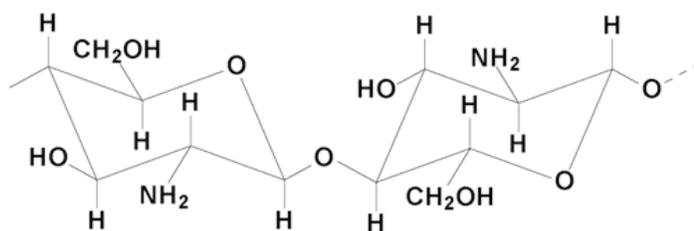
### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Presentemente, existe um grande interesse no estudo de nanoestruturas de polímeros naturais, tais como a quitosana, o ácido hialurônico, o alginato de sódio e a celulose, etc., para a produção de filmes multicamadas de polieletrólitos (PEMs) com propriedades úteis em aplicações biotecnológicas e de nanotecnologia.

##### 2.1.1 Quitosana

A quitosana (CHI), poli-(D-glicosamina), é um polímero obtido da desacetilação da quitina, um abundante polissacarídeo presente no exoesqueleto de crustáceos, como o siri e o caranguejo. Trata-se de um aminopolissacarídeo biodegradável, biocompatível, hidrofílico e atóxico (ROBERTS, 1992). A presença de grupos polares amino e acetamida, na estrutura da quitosana, fornece ao polímero a propriedade de alta hidrofiliicidade (ASSIS & SILVA, 2003). Sua estrutura química é constituída pelos copolímeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) - 2-acetamida 2-desoxi-D-glicose, com grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. A Figura 2.1 mostra a estrutura molecular da quitosana, que tem um  $pKb \approx 6,0$ .



**Figura 2.1.** Estrutura molecular da quitosana (adaptada de TAO *et al.*, 2007).

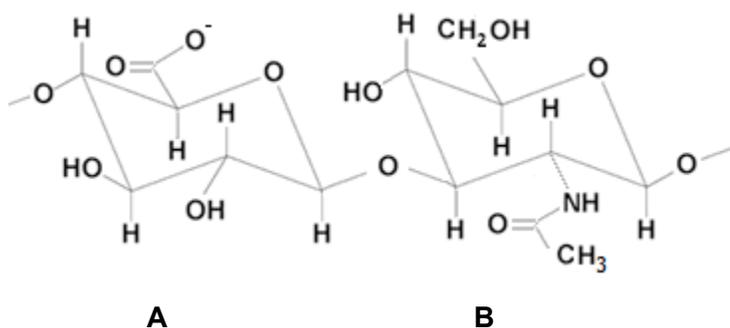
A quitosana pode ser dissolvida em soluções aquosas de ácidos, como os ácidos acético, fórmico e cítrico, além do ácido clorídrico em soluções diluídas, resultando em soluções viscosas. Nestas, comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose, de composição variável em função do grau médio de acetilação, que representa a fração de unidades 2-

acetamida-2-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose. O grau de acetilação é um dos principais parâmetros utilizados para a caracterização da quitosana. A solubilidade da quitosana está relacionada com a razão relativa das unidades acima mencionadas, presentes nas suas cadeias macromoleculares (SANTOS *et al.*, 2003).

Quando a quitosana está solubilizada, apresenta grupos amino protonados no carbono C-2 da glicosamina, tornando-se, portanto, um polieletrólito catiônico. As propriedades exibidas pela quitosana incluem: alta solubilidade, alta reatividade química, alta processabilidade e moldabilidade, assim como propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, cicatrizantes, e antimicrobianas, dentre outras. A quitosana tem sido utilizada para a produção de micro (VASCONCELLOS *et al.*, 2011) ou nanopartículas, por apresentar propriedades interessantes, como a de mucoadesividade e de ser facilmente esterilizável por métodos convencionais (AGNIHOTRI *et al.*, 2004). A CHI vem também recebendo grande atenção na sua utilização como biomaterial e na produção e desenvolvimento de formulações terapêuticas (ROBERTS, 1992), no tratamento de águas, na produção de cosméticos, aditivos alimentícios e membranas semipermeáveis.

### 2.1.2 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (HA) é um mucopolissacarídeo, macromolécula do grupo das glicosaminoglicanas. É um polímero linear não ramificado, aniônico, composto de ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina, ligados através de ligações alternadas glicosídicas  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3. A Figura 2.2 mostra uma representação da estrutura química do ácido hialurônico, que tem um  $pK_a \approx 2,9$ .



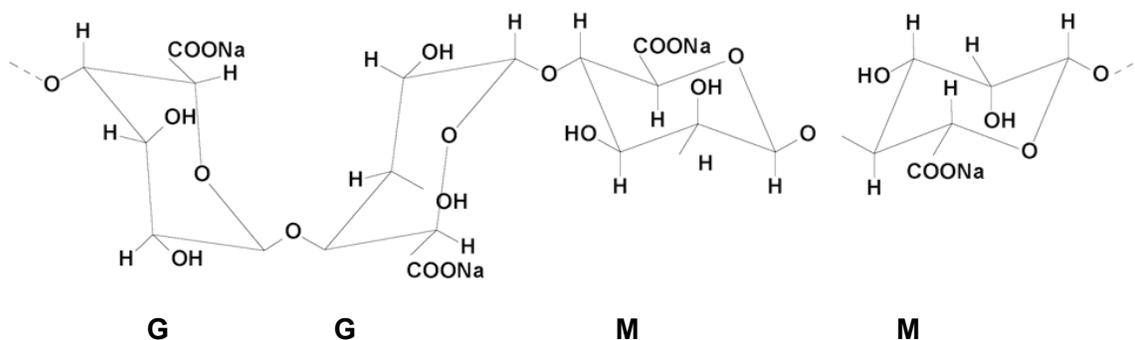
**Figura 2.2.** Representação da estrutura química do ácido hialurônico.  
(A = ácido D-glicurônico, B = N-acetil-glicosamina)

O HA encontra-se amplamente distribuído em vários tecidos conectivos de animais, como componente principal de substâncias intercelulares, que mantém uma matriz gelificada

ligando-se a proteínas, outros mucopolissacarídeos e água. O HA está presente principalmente no cordão umbilical, fluido sinovial, e humor vítreo. O HA atua como um lubrificante para proteção contra infecções bacterianas e retém água (LAČPÍK *et al.*, 1998).

### 2.1.3 Alginato de Sódio

O alginato (ALG), por sua vez, é um polissacarídeo extraído de diversas espécies de algas marrons (*Phaeophyceae*). Este é um carboidrato coloidal hidrofílico com grande potencial na fabricação de multicamadas e biofilmes devido às suas propriedades coloidais. O alginato é um copolímero linear composto de resíduos do ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) ( $pK_a \approx 4,0$ ) e do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G) ( $pK_a \approx 3,5$ ). A Figura 2.3 mostra uma representação da estrutura química do ácido manurônico de sódio e do ácido gulurônico de sódio. O alginato é utilizado em diversas aplicações que exploram a sua capacidade em formar géis e em ser biocompatível.



**Figura 2.3.** Representação da estrutura química do alginato de sódio (M = ácido manurônico, G = ácido gulurônico) (adaptada de TAO *et al.*, 2007).

### 2.1.4 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, muito solúvel em água, com a qual forma tanto soluções como géis. A estrutura da carboximetilcelulose é baseada no polímero de celulose de  $\beta$ -(1,4)-D-glicopiranosose. Diferentes preparações podem ter diferentes graus de substituição dos grupos hidroxila e normalmente o grau médio de substituição (GS) situa-se acima de 0,5 e pode chegar até 0,9. A Figura 2.4 mostra uma representação da estrutura química da carboximetilcelulose que tem um  $pK_a \approx 3,0$ .

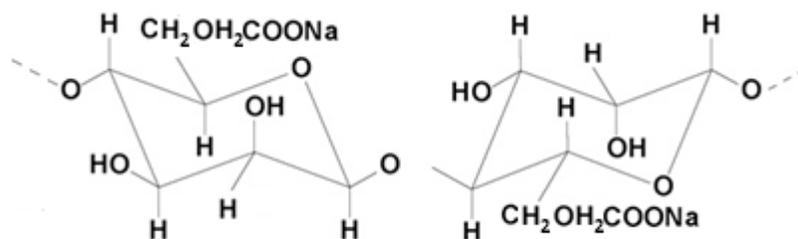


Figura 2.4. Representação da estrutura química da carboximetilcelulose.

## 2.2 Biomateriais

Biomateriais são materiais compostos de uma substância ou mistura de substâncias, sintéticas ou naturais, que atuam parcial ou totalmente em sistemas biológicos para tratar, aumentar, interagir, ou substituir tecidos, órgãos, ou outros sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). Exemplos de biomateriais incluem próteses, implantes, biossensores, dentre outros.

O desenvolvimento de biomateriais envolve uma multidisciplinaridade das áreas de engenharia, ciência dos materiais, biologia, ciências médicas, química e biotecnologia. Neste particular, a técnica *layer-by-layer* tem uma enorme aplicabilidade na produção de biomateriais personalizados para fins específicos, desde aplicações na área de órgãos artificiais como na de tratamento e diagnóstico de diversas doenças e processos biológicos (TANG *et al.*, 2006; BOUDOU *et al.*, 2010).

## 2.3 Técnica de Deposição *Layer-by-Layer* (LbL)

A técnica *layer-by-layer* (LbL), descrita inicialmente por Iler (ILER, 1966) e desenvolvida por Decher (DECHER *et al.*, 1992; DECHER & SCHMITT, 1992; DECHER, 1997), consiste na deposição alternada de políons de cargas opostas em substratos sólidos ou colóides e vem sendo extensivamente estudada, nos últimos anos, na produção de estruturas moleculares de multicomponentes e filmes ultrafinos com nano-arquiteturas específicas. Essa técnica de deposição, além de simples e bastante versátil, é de grande potencial por permitir a deposição de uma camada molecular de cada vez e, portanto, a formação de complexos de multicamadas alternadas de polieletrólitos (PEMs) de poliânions-policátions. As estruturas formadas por estas multicamadas são normalmente fabricadas pela adsorção sequencial de polímeros com cargas opostas, tipicamente em substratos sólidos, a partir de soluções diluídas destes componentes. Já que o processo envolve a adsorção de polímeros a partir de soluções, não há, em princípio,

restrições com respeito à topologia e ao tamanho do substrato utilizado no processo (DECHER, 1997).

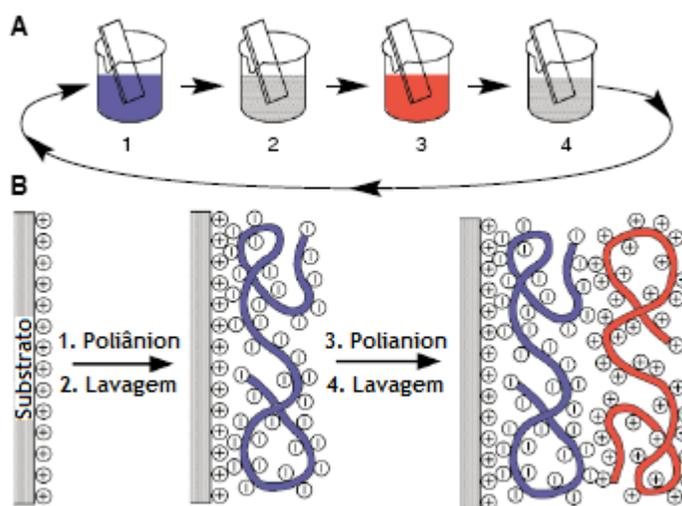
A técnica LbL foi inicialmente utilizada na produção de revestimentos de substratos planos e tem sido estendida para revestir colóides (DONATH *et al.*, 1998; SUKHORUKOV *et al.*, 1998; MÖHWALD, 2000; LEPORATTI *et al.*, 2000; ANTIPOV *et al.*, 2003; SILVANO *et al.*, 2002). Uma das maiores vantagens da adsorção LbL é que, por ser feita a partir de soluções, permite a incorporação de uma grande variedade de materiais nas camadas individuais além da obtenção de uma arquitetura definida em função da sequência da deposição. A técnica LbL permite, portanto, a obtenção de um controle rigoroso sobre a composição, as propriedades das multicamadas e, conseqüentemente, sobre sua funcionalidade (DECHER, 1997). Essa complexa funcionalidade é dividida por Decher, em duas categorias: 1) a manipulação das interações de superfície e 2) a fabricação de dispositivos baseados em propriedades de superfície. Na primeira, estão incluídas as produções de superfícies anti-corrosivas, anti-refletivas, anti-estáticas, não aderentes, indutoras de nucleação, hidrofílicas ou hidrofóbicas, biocompatíveis, com propriedades antibacterianas, com propriedades de reconhecimento molecular, de sensibilidade química ou com bio-sensibilidade, com propriedades de controle de fluxo, etc. (DECHER & SCHLENOFF, 2002). Na segunda categoria, a sequência da deposição dos diversos materiais define a arquitetura do filme de multicamadas e, conseqüentemente, do dispositivo fabricado. Neste processo de *self-assembly* (auto-montagem), esta fabricação de dispositivos pode ser denominada de montagem programada, ou controlada, ou direcionada. Isso é muito importante do ponto de vista da engenharia, onde se podem controlar os arranjos, principalmente unidimensionais, e a funcionalidade de nanocompósitos formados pelas multicamadas. Exemplos de tais nanocompósitos incluem reatores de membrana (CHIA *et al.*, 2008, MECKING & THOMANN, 2000), dispositivos fotônicos de LED (*light emitting diodes*) (FOU *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1999; MATTOUSSI, *et al.*, 2000; SRIVASTAVA & KOTOV, 2008) e filmes ultra-finos compartimentalizados com barreiras de camadas ou membranas de separação (DAI *et al.*, 2001; KRASEMANN *et al.*, 2001; FARHAT & SCHLENOFF, 2001), eletrodos para células de combustível (MICHEL *et al.*, 2007), nanotubos de polieletrólitos (CHIA *et al.*, 2009, LEE *et al.*, 2007; TAN & DESAI 2004; MITCHELL *et al.*, 2002), dentre outros (DECHER & SCHLENOFF, 2002).

#### **2.4 Técnica LbL de Produção de PEMs**

A fabricação de filmes multicamadas pelo processo LbL consiste na obtenção de um dispositivo nanoscópico único, constituído por materiais escolhidos entre muitos materiais

diferentes, utilizando uma técnica de baixo custo e sem danos ao meio ambiente. Os materiais utilizados nas multicamadas podem ser moléculas orgânicas, compostos inorgânicos, colóides, células e biomacromoléculas como proteínas, enzimas ou DNA. A técnica pode ser aplicada a superfícies de diferentes formatos e tipos e resistentes a solventes, tais como microcápsulas, colóides ou células biológicas (DECHER & SCHLENOFF, 2002).

A fabricação de um filme em um substrato, com a imersão em béqueres comuns pode ser realizada manual ou automaticamente (Figura 2.5A). A representação da adsorção alternada para a formação do filme com multicamadas, no nível molecular (Figura 2.5B), mostra um substrato com carga positiva adsorvendo um poliânion e um polication consecutivamente. As etapas 1 e 3 representam a adsorção de poliânions e polications, respectivamente. As etapas 2 e 4 representam lavagens. As quatro etapas representam a sequência de formação de filmes com a mais simples arquitetura  $(A/B)_n$ , (polímeros A e B depositados alternadamente, sendo  $n$  o número de camadas). A produção de filmes mais complexos requer somente mais béqueres e uma nova sequência de adsorção. Na figura, os contra-íons foram omitidos e a estequiometria dos grupos carregados entre poliíons, e entre o substrato e poliânions, é arbitrário (DECHER, 1997).



**Figura 2.5.** (A) Idealização do processo de formação do filme de multicamadas. (B) Imagens moleculares simplificadas das duas primeiras etapas de adsorção, mostrando a deposição do filme a partir de um substrato de carga positiva (adaptado de DECHER, 1997).

A deposição LbL envolve a adsorção de uma única espécie de composto para cada etapa de adsorção, produzindo, por adsorções sucessivas, um filme de multicamadas com uma sequência de camadas muito bem definida (DECHER & SCHLENOFF, 2002).

A maior parte dos filmes de multicamadas tem sido produzida utilizando principalmente a atração eletrostática como força motriz para a adsorção e subsequente montagem das multicamadas. Entretanto, estudos têm demonstrado a possibilidade de utilizar outras interações para se obter a deposição de multicamadas. Estas interações podem incluir, por exemplo: ligações de hidrogênio (STOCKTON & RUBNER, 1997; CLARK & HAMMOND, 2000, SUCH *et al.*, 2011), ligações covalentes (YAN *et al.*, 1999; HUCK *et al.*, 2000), interações do tipo ácido-base de Lewis (SHIMAZAKI *et al.*, 2001), ou de reconhecimento específicos, entre a biotina e a estreptavidina (CASSIER *et al.*, 1998).

No processo LbL, a estrutura de cada camada depende de um conjunto de parâmetros que devem ser controlados, tais como: concentração das soluções e de seus constituintes, tempos de adsorção, tempos de lavagens, umidade relativa do ar, força iônica, pH, temperatura, tipos de agitação durante a adsorção e lavagem, velocidade de imersão, entre outros (DECHER & SCHLENOFF, 2002). Nos trabalhos publicados, o processo de deposição LbL tem sido, usualmente, realizado à temperatura ambiente.

Já que os filmes de PEMs são produzidos pelas deposições alternadas e consecutivas de poliânions e policátions, após algumas camadas, a estrutura e as propriedades de cada camada são governadas pela escolha do par de polieletrólitos e pelas condições de deposição, isto é, com o aumento de camadas a influência do substrato utilizado para a deposição é reduzida (DECHER, 1997). O estudo destes compostos certamente contribui para indicar escolhas de biopolímeros para a produção de filmes de multicamadas de interesse tecnológico.

Com respeito à categoria dos polieletrólitos, PEMs podem ser fabricadas a partir de polieletrólitos (ácidos ou bases) fortes, fracos ou uma combinação destes. Ao contrário do que ocorre com multicamadas formadas a partir de polieletrólitos fortes, as PEMs de polieletrólitos fracos permitem que a densidade de cargas, ao longo da sua cadeia polimérica, seja mais facilmente controlada a partir do ajuste do pH das soluções de polieletrólitos (ácidos ou bases) fracos. O grupo do Prof. Michael Rubner, do MIT (SHIRATORI & RUBNER, 2000), demonstrou que para o caso de polieletrólitos de ácidos e bases fracos, a espessura das camadas pode ser precisamente controlada ajustando o pH. Com isso, é possível se obter um maior controle das propriedades físicas da estrutura polimérica, além da espessura, tais como: conformação, densidade de carga linear e grau das ligações iônicas inter-cadeias - todas de importância para a formação das PEMs e de suas interações com o meio onde estiverem inseridos.

Outro trabalho do grupo do Prof. Michael Rubner (MENDELSONH *et al.*, 2000), mostrou que após a produção das PEMs, uma subsequente imersão em soluções ácidas, produz filmes de multicamadas com estrutura microporosa. Descobriram também que os filmes microporosos poderiam sofrer uma segunda reorganização na sua estrutura, uma vez imersos em água pura, resultando em uma morfologia de poros mais bem definida.

A variação do pH pode ser utilizada para agir sobre a funcionalidade, tanto da superfície como das estruturas internas dos filmes multicamadas. Isto permite a preparação de nanocompósitos inorgânicos de filmes finos e moldes para um chapeamento de metal, sem a necessidade de se utilizar forças elétricas (*electroless metal plating*). Com isso, o grupo de Rubner (JOLY *et al.*, 2000) conseguiu produzir nanoreatores para nanopartículas da prata (Ag) e do semicondutor sulfeto de chumbo (PbS).

A variação da força iônica, conseguida através da concentração de sal, é um parâmetro que permite o controle da espessura das camadas individuais. Em estudos realizados por Decher e Schmitt, (DECHER & SCHMITT, 1992) verificou-se que o aumento da concentração de sal, dentro de certos limites, aumenta a espessura do filme de forma precisa. Quando filmes de multicamadas compostos de polieletrólitos são imersos sequencialmente em soluções de sal e de água pura, ocorrerá um mecanismo de abrir e fechar as pontes salina entre os íons positiva ou negativamente carregados pertencentes, respectivamente, às cadeias poliméricas dos poliânions e policátions (DUBAS & SCHLENOFF, 2001). É como se as multicamadas sofressem um processo de inchaço e desinchaço, produzindo um efeito similar ao de recozimento (*annealing*). Quando o sal é difundido para dentro do filme, parte das ligações iônicas entre as cadeias podem se abrir. Com a remoção do sal difundido para fora do filme, estas ligações se fecham. Esse processo de fechamento pode ocorrer entre diferentes pares de contra-íons em um processo de ligação mais favorável das cadeias poliiônicas e, assim, estabelecendo uma estrutura mais equilibrada (DECHER & SCHLENOFF, 2002). Em um trabalho do grupo de Schlenoff (DUBAS & SCHLENOFF, 2001), multicamadas de polieletrólitos foram “alisadas” com a utilização do procedimento mencionado acima.

Em estudos de sistemas ternários de PEMs, o grupo de Rubner (LEE *et al.*, 2005) demonstrou que multicamadas de polieletrólitos, modificadas com a incorporação de nanopartículas de prata (Ag), adquiriam propriedades antibacterianas.

## 2.5 Modelos da Formação de Multicamadas de Polieletrólitos

No processo de formação de multicamadas com polieletrólitos, vários fatores (interações químicas e físicas) são responsáveis por este processo complexo (VON KLITZING, 2006). As

forças motrizes responsáveis pelo crescimento das PEMs podem ser de natureza eletrostática, assim como não eletrostática, como interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, e ligações covalentes (BOUDOU *et al.*, 2010). Na hipótese de que a interação eletrostática é a principal força motriz, a primeira camada é obtida pela adsorção do polieletrólito na superfície com carga oposta. A carga de polieletrólito adsorvido é suficiente para inverter a carga da superfície, observados em experimentos de potencial zeta (CARUSO *et al.*, 1998). Cada camada subsequente se liga à camada anterior, previamente depositada, possibilitando a formação de um complexo de polieletrólitos. É importante destacar que existe a interação entre a última camada depositada e as camadas mais internas, gerando assim, multicamadas interpenetradas. Utilizando-se o modelo teórico *Debye-Huckel*, para descrever esta complexação, pode-se obter a quantidade adsorvida (a absorvância) por camada, e a espessura das camadas (CASTELNOVO & JOANNY, 2000).

A adsorção e a remoção de polieletrólitos em superfícies vêm sendo extensivamente pesquisadas utilizando-se soluções analíticas e numéricas das equações não lineares de campo médio, considerações de escalonamento, modelos discretos de redes cristalinas de camadas de *multi-Stern*, e simulações computacionais (SHAFIR *et al.*, 2003; CARRILLO & DOBRYNIN, 2007). Modelos teóricos para a formação de multicamadas de polieletrólitos, também têm sido estudados em diversos trabalhos (JOANNY, 1999; CASTELNOVO & JOANNY, 2000; PARK *et al.*, 2002; MESSINA, 2004; PATEL *et al.*, 2005). Nos estudos citados, sugeriu-se que a inversão de carga de superfície com a adsorção de polieletrólitos ocorre devido às seguintes condições: (i) concentração de sal suficientemente alta, (ii) condições de solvente  $\theta$ , (iii) interações de curta distância fracas, entre a superfície e as multicamadas de polieletrólitos (JOANNY, 1999; CASTELNOVO & JOANNY, 2000). A inversão de cargas e a complexação de poliânions e policátions, foram utilizadas para modelar a formação das PEMs (CASTELNOVO & JOANNY, 2000). A descrição teórica para a sobre-compensação de cargas tem evoluído consideravelmente. Dependendo da natureza química dos poliíons e/ou colóides, utilizados no processo de deposição, a importância da contribuição eletrostática pode variar, e outras interações como as de ligações de hidrogênio, van der Waals, ou transferência de cargas, também podem influenciar nas características finais das PEMs (DECHER, 1997; VON KLITZING, 2006).

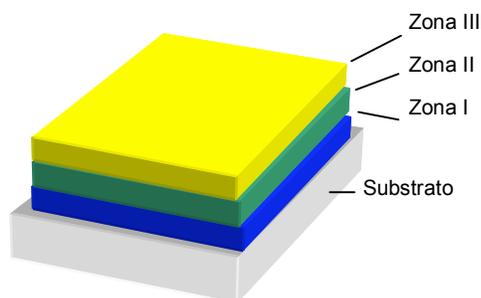
Estudos recentes discutem a importância do ganho de entropia global, pelo sistema, como resultado da liberação de contraíons, quando poliânions e policátions interagem, e apontam este como sendo o fator mais importante para a formação das multicamadas (LAUGEL *et al.*, 2006). Os contraíons - presentes em terminais carregados dos polímeros em

solução - são liberados quando os polieletrólitos são adsorvidos pelo substrato ou polímero de carga oposta, aumentando assim, a entropia do sistema. Além disso, há um ganho de entropia pela reestruturação das moléculas de água ao redor das cargas durante as interações entre policátions/poliânions e pelas mudanças na conformação estrutural dos polieletrólitos durante a formação de PEMs. A avaliação da contribuição da entalpia para a formação de PEMs é bastante complexa, onde interações entre carga/carga, carga/água e estrutura da água, estão presentes. Laugel *et al.* argumentaram que quando o processo de complexação entre um policátion/poliânion é exotérmico ( $\Delta H$  negativo), mudanças na entalpia e a entropia do sistema favorecem a complexação “forte” das PEMs - como é o caso de filmes que crescem linearmente. Para processos endotérmicos ( $\Delta H$  positivo) da complexação policátion/poliânion, a entalpia e a entropia podem ter contribuições opostas no processo de complexação, resultando em um complexo “fraco” – como é o caso de filmes que crescem exponencialmente (LAUGEL *et al.*, 2006).

Apesar dos vários estudos realizados, o entendimento do processo, pelo qual as estruturas das multicamadas de polieletrólitos realmente são formadas no nível nanomolecular e termodinâmico, ainda não está claro.

## 2.6 Modelos de Zonas para as Multicamadas de Polieletrólitos

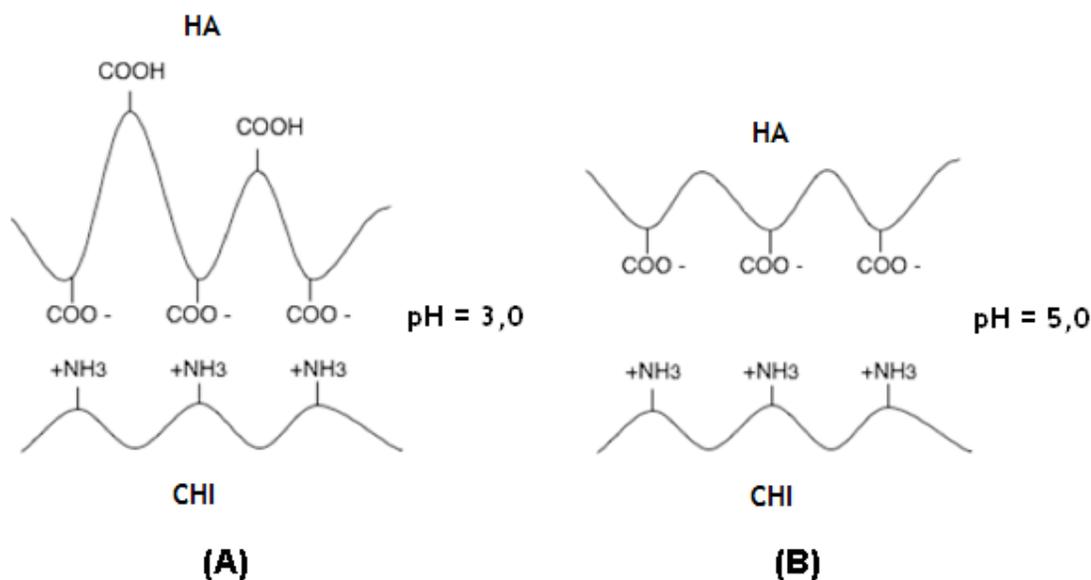
O filme de multicamadas composto por dois polieletrólitos simples, um aniônico e outro catiônico, pode ser dividido em três zonas (LANDAM *et al.*, 2000). A zona I é composta por uma ou algumas camadas de polieletrólitos, próximas ao substrato, o qual pode influenciar a multicamada. A zona II é o meio contínuo (*bulk*) do filme, distante da possível influência de interfaces. A zona III é constituída por uma ou algumas camadas de polieletrólitos próximas à superfície mais externa do filme. Aqui, a multicamada é influenciada pela superfície em contato com o ar ou com a solução do meio de hidratação. (DECHER & SCHLENOFF, 2002).



**Figura 2.6.** Desenho esquemático do modelo de zonas para multicamadas de polieletrólitos.

## 2.7 LbL com Quitosana e Ácido Hialurônico

PEMs de quitosana e ácido hialurônico podem ser sequencialmente depositadas com a técnica de LbL, formando filmes que apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade. A Figura 2.7 mostra uma representação esquemática da ligação iônica entre estes polímeros, dependente dos pHs das soluções dos polieletrólitos utilizados (durante) no processo de formação das PEMs. É importante ter conhecimento do  $pK_a$  e do  $pK_b$  dos polieletrólitos (neste caso, CHI  $pK_b \approx 6,0$ , HA  $pK_a \approx 2,9$ ) (DENUZIERE *et al.*, 1996; RINAUDO *et al.*, 1999; LAČPÍK *et al.*, 1998; CLELAND *et al.*, 1982), para um melhor entendimento da participação das cargas de ambos no processo LbL.



**Figura 2.7.** Representação esquemática das interações iônicas entre a quitosana (CHI) e o ácido hialurônico (HA): (A) pH 3,0 ; (B) pH 5,0.

Existem diversos trabalhos que tratam do estudo e da produção de PEMs compostos por quitosana e ácido hialurônico. Filmes multicamadas compostos de quitosana e ácido hialurônico tem sido estudados visando várias aplicações biotecnológicas. Alguns destes estudos utilizaram PEMs de HA/CHI para a encapsulação de células (HILLBERG *et al.*, 2006), enquanto outros avaliaram o comportamento de adesão de células aderentes - como os osteoblastos e fibroblastos - na superfície destes filmes (RICHERT *et al.*, 2002, 2004 A, B; THIERRY *et al.*, 2003; CROLL *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2007 A,B,C; CHUA *et al.*, 2008). Como exemplo, Richert *et al.* demonstraram que filmes multicamadas de HA/CHI resistem a

adesão de condrócitos, que são células presentes no tecido cartilaginoso (RICHERT *et al.*, 2004 A).

Outros estudos importantes para o desenvolvimento de biomateriais biocompatíveis incluem a investigação da adesão de proteínas em multicamadas de CHI/HA. Croll *et al.* observaram que substratos de poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) recobertos com PEMs de CHI/HA são altamente resistentes contra a adesão não-específica de proteínas (fibronectina humana e albumina de soro bovino). Esse estudo mostrou que as PEMs de CHI/HA, que contém grupos funcionais amino e de ácido carboxílico, podem ser funcionalizadas com biomoléculas, como o colágeno IV, para aplicações específicas de engenharia tecidual – reconhecimento de superfície e adesão eficiente por fibroblastos. A propriedade de resistir à adesão de proteínas é especialmente importante para aplicação de engenharia tecidual e implantes, já que a adesão de proteínas podem resultar a respostas imunológicas e inflamações (CROLL *et al.*, 2006).

Filmes multicamadas de CHI/HA tem sido utilizados como recobrimentos de próteses dentárias e incorporação e liberação controlada de fármacos, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Estudos demonstraram que a reticulação dos filmes de CHI/HA aumentou a resistência a degradação de enzimas (lisozima e amilase) encontradas na saliva (ETIENNE *et al.*, 2005).

Bongaerts *et al.* demonstraram que PEMs de CHI/HA apresentam superfícies que podem significativamente resistir a adesão de proteínas presentes na saliva humana (BONGAERTS *et al.*, 2009). Substratos de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) recobertos com PEMs de CHI/HA, com duas ou cinco bicamadas, ambos, adsorveram ~4x menos proteínas presentes na saliva, em comparação com substratos sem o recobrimento. Esta diminuição da adesão de proteínas foi atribuída ao alto grau de hidratação da última camada no filme de PEMs de HA. Os autores também destacaram que a dessorção das proteínas foi mais fácil obtida para PEMs com cinco bicamadas em comparação com PEMs com somente duas bicamadas de CHI/HA (BONGAERTS *et al.*, 2009).

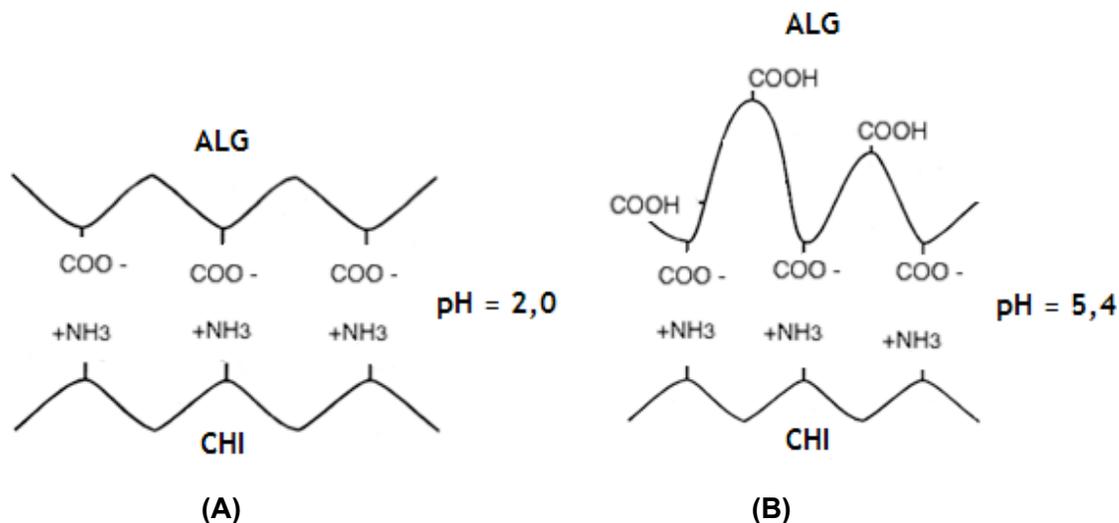
Liu *et al.* descreveram a utilização de multicamadas de CHI/HA - recobrimdo substratos de polietileno tereftalato (PET) - para a imobilização da enzima tripsina e subsequente identificação das proteínas mioglobina, citocromo c, e albumina de soro bovino (LIU *et al.*, 2006). Esse procedimento oferece grande potencial para análises de proteínas com baixos volumes de amostra e também fornece um método simples para aumentar a estabilidade e reter as atividades catalíticas de enzimas, quando imobilizadas em uma superfície biocompatível, em comparação com outros métodos que utilizam enzimas dispersas em solução (LIU *et al.*, 2006).

Lu e Hu investigaram, em um estudo similar, a incorporação da mioglobina em multicamadas de CHI/HA para realizar estudos eletroquímicos de proteínas (LU & HU, 2006).

Outros estudos descrevem os efeitos de estratégias diferentes de preparação (FENG *et al.*, 2005, KIM *et al.*, 2004 B), da massa molecular (KUJAWA *et al.*, 2005), da adição de polieletrólitos sintéticos (SALOMAKI & KANKARE, 2009) e da utilização de quitosana modificada com fosforilcolina (KUJAWA *et al.*, 2007) na construção e propriedades finais de PEMs de CHI e HA.

## 2.8 LbL com Quitosana e Alginato de Sódio

Quando o alginato de sódio e a quitosana são sequencialmente depositados com a técnica de LbL, a quitosana - devido as suas características catiônicas - se complexa com as cargas opostas das moléculas do alginato, formando PEMs que apresentam boa estabilidade mecânica e biodegradabilidade (YANG *et al.*, 2007). Dependendo dos pHs das soluções de polieletrólitos utilizados no processo de formação das PEMs, pode-se controlar o nível das ligações entre as cargas opostas, como por exemplo, da quitosana e do alginato, como mostra a Figura 2.8, disponibilizando diferentes grupos funcionais para reações posteriores.



**Figura 2.8.** Representação esquemática das interações iônicas entre a quitosana e o alginato: (A) pH 2,0 ; (B) pH 5,4 (adaptado de KUMAR, 2000).

Esta característica pode ser explorada para formar PEMs com diferentes propriedades, referentes à espessura e rigidez, por exemplo.

Estudos envolvendo a utilização da técnica LbL para a produção de filmes de PEMs de quitosana e alginato de sódio prometem ser muito promissores em pesquisas futuras. Um dos primeiros grupos a estudar estas PEMs foi o de Lajimi *et al.* (LAJIMI *et al.*, 2004), onde se

pesquisou a deposição LbL de quitosana e alginato de sódio em membranas de acetato de celulose (AC) a serem utilizadas em nanofiltração. A influência das estruturas de superfícies ultrafinas, das multicamadas de CHI/ALG, no desempenho quanto à permeabilidade das membranas (fluxo de água e rejeição de íons), foi estudada para PEMs com diferente número de pares de polieletrólitos adsorvidos. Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medidas de permeabilidade mostraram que a permeabilidade hidráulica foi levemente afetada pelas multicamadas (LAJIMI *et al.*, 2004).

Em um estudo de liberação de fármacos, o grupo de Ye (YE *et al.*, 2005 A) utilizou a técnica LbL, com quitosana e alginato de sódio, para revestir e encapsular micro-cristais do fármaco indometacina (IDM), que age como um antiinflamatório. O encapsulamento teve como objetivo melhorar a forma de administração da indometacina. Nesse trabalho verificou-se que a taxa de liberação do fármaco não se alterou em função da concentração de NaCl, porém com o aumento da temperatura, do meio contendo o fármaco encapsulado pelo filme, o processo de liberação do fármaco foi acelerado. Este estudo mostra um método simples e novo para controlar a permeabilidade dos filmes de multicamadas construídos com a técnica de LbL (YE *et al.*, 2005 A).

O mesmo grupo de Ye (YE *et al.*, 2005 B) produziu PEMs de quitosana e alginato em substratos de nanopartículas de poliestireno (PS) com diâmetros de aproximadamente 180 nm, com a subsequente remoção do substrato, que foi então dissolvido utilizando-se tetrahydrofurano (THF). O pH e a concentração de sal das soluções de polieletrólitos foram otimizados para assegurar a deposição alternada. O hidrocloreto de acridina (hiAc), (reagente químico hidrofílico usado como modelo de um fármaco), foi utilizado para testar as propriedades de carregamento e liberação das nanocápsulas. Observou-se que o hidrocloreto de acridina se depositou espontaneamente dentro das cápsulas devido a sua interação eletrostática com os resíduos de estireno sulfonado, negativamente carregados, do substrato PS dentro das cápsulas. Com a reticulação das paredes das cápsulas com glutaraldeído, a taxa de liberação do hA se tornou um pouco mais lenta. Esses resultados também demonstraram que polímeros naturais têm grande potencial como sistemas de liberação de fármacos (YE *et al.*, 2005 B).

Estudos realizados por TAO *et al.*, demonstraram que microcápsulas compostas de alginato e quitosana produzidas pela técnica LbL foram capazes de encapsular eficientemente o fármaco anticancerígeno doxorubicina, sem a adição de outros reagentes. Estas cápsulas foram produzidas utilizando-se substratos de melamina-formaldeído, com a subsequente remoção deste material através de sua dissolução em HCl. Ainda neste trabalho, verificou-se que a taxa de liberação do fármaco depende do número de camadas produzidas sobre o

substrato. Os resultados de ensaios colorimétricos de viabilidade celular demonstraram que a doxorubicina encapsulada foi mais eficiente na destruição de células cancerígenas do que a doxorubicina na sua forma livre (TAO *et al.*, 2007).

Nanotubos biodegradáveis foram produzidos por Yang *et al.* através da técnica LbL com adsorção alternada de quitosana e alginato em poros internos de substratos de policarbonato, com a subsequente remoção do substrato. Segundo os autores, os biomateriais naturais se mostraram viáveis para a confecção destes nanotubos de filmes finos. A espessura dos nanotubos pôde ser controlada pelo número de camadas adsorvidas. Análises com microscopia de força atômica confirmaram a biodegradabilidade dos nanotubos quando imersos em uma solução contendo pancreatina. Os resultados de viabilidade celular comprovaram também que os nanotubos de quitosana/alginato apresentam baixa citotoxicidade (YANG *et al.*, 2007).

Outro grupo (HILLBERG *et al.*, 2006), encapsularam células de *E. coli* com multicamadas alternadas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos, utilizando a técnica LbL. Além da quitosana e do alginato, o ácido hialurônico e oligonucleotídeos foram utilizados. Medidas de potencial zeta para as multicamadas de quitosana/alginato e quitosana/ácido hialurônico indicaram que a deposição alternada de camadas foi realizada com sucesso, com a esperada alternância de carga da superfície. A adsorção de camadas foi confirmada com microscopia de fluorescência. O grupo também desenvolveu um protocolo novo para a preparação das amostras, o que possibilitou analisar, na faixa nanométrica, as multicamadas na superfície externa das células, através da microscopia eletrônica de transmissão. Os autores observaram que foi possível crescer uma segunda geração de células a partir das células encapsuladas da primeira geração, demonstrando que a atividade celular não foi afetada com a presença das multicamadas de polieletrólitos (HILLBERG *et al.*, 2006).

Wu e colaboradores (WU *et al.*, 2009) utilizaram PEMs de quitosana e alginato para a encapsulação de células estromais da medula óssea e recobrimento de superfícies de titânio. Estes complexos PEMs-células apresentam grande potencial para aplicações de implantes dentários e de juntas e articulações na área de engenharia tecidual.

## 2.9 LbL com Quitosana e Carboximetilcelulose

PEMs de quitosana e carboximetilcelulose tem sido pouco estudadas (VENANZI *et al.*, 2008, HABERSKA & RUZGAS, 2009). Recentemente, Haberska e Ruzgas publicaram um trabalho no qual no qual PEMs de CHI/CMC foram estudadas através de elipsometria *in situ* e medidas eletroquímicas. Estes filmes, como os de CHI/ALG e ALG/CHI, têm grande potencial para recobrimento e produção de dispositivos nanoestruturados biocompatíveis.

## 2.10 Estudos de LbL com outros Biopolímeros

Além dos trabalhos acima referidos, existem outros trabalhos que avaliam PEMs de quitosana ou de alginato associadas a outros materiais interessantes, e que apresentaram resultados promissores. Entre estes, podemos destacar o trabalho de Wilson (WILSON *et al.*, 2007) na utilização de PEMs de poli-L-lisina e alginato para o recobrimento efetivo de implantes com testes *in vivo*. Estes filmes de multicamadas mimetizam membranas e propiciam uma nova forma de produzir recobrimentos robustos, biocompatíveis, e bioquimicamente heterogêneos, para implantes.

Outros estudos tem ainda demonstrado que PEMs de alginato e poli-L-lisina, depositadas sobre superfícies – tais como a do colágeno - que são, normalmente, altamente susceptíveis à aderência de células, as transformam em superfícies bioinertes, evitando assim, a adesão de células e proteínas (ELBERT *et al.*, 1999).

PEMs de quitosana e gelatina foram produzidas para melhorar a biocompatibilidade de superfícies de filmes de titânio com células (osteoblastos) em um estudo realizado por Cai *et al.* (CAI *et al.*, 2005). Os resultados mostraram que as superfícies modificadas melhoraram a sua biocompatibilidade. Em um estudo posterior, Cai *et al.* (CAI *et al.*, 2007) estudaram filmes nanoestruturados de quitosana e fibroína de seda para recobrir superfícies de titânio e aumentar a adesão de osteoblastos na nova superfície funcionalizada com estes biopolímeros.

## 2.11 Aplicações de PEMs na Área Biomédica

Complexos de polieletrólitos são, em geral, biomateriais poliméricos, contendo biomacromoléculas (enzimas, DNA, RNA) e nanopartículas, que vem sendo utilizados em diversas aplicações médicas. PEMs são utilizadas para a funcionalização de superfícies, recobrimento de próteses, modificação e funcionalização de células, construção de nanobioreatores, e obtenção de estruturas complexas para diagnósticos e tratamentos de diversas doenças. Testes *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a enorme aplicabilidade e potencialidade de PEMs nas áreas de medicina, engenharia química, biologia, engenharia tecidual, farmacêutica, ciência de materiais, dentre outras (Al *et al.*, 2003; BOUDOU *et al.*, 2010).

A maior parte das pesquisas sobre PEMs tem sido realizada principalmente com a utilização de polímeros sintéticos (DURSTOCK & RUBNER, 2001; WANG *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2004; BERG *et al.*, 2004; CEBECI *et al.*, 2006; LITCHER *et al.*, 2009) entretanto, o presente trabalho utiliza polímeros naturais para a produção de PEMs, tendo em vista o

interesse no estudo da interação destas PEMs com células, incluindo linfócitos e bactérias, além de outras biomacromoléculas.

### 2.11.1 Aplicações de PEMs envolvendo células

Problemas envolvendo células tem recebido atenção no âmbito da aplicabilidade de PEMs, seja no que diz respeito à encapsulação destas com as PEMs, ou às suas interações com as superfícies das PEMs.

A encapsulação de células, com nanocápsulas poliméricas, tem recebido muita atenção devido a sua grande aplicabilidade nas áreas de biotecnologia, ecologia, e medicina. Células encapsuladas com revestimentos poliméricos biocompatíveis tem grande potencial para tratamentos clínicos (ou terapias clínicas). Estudos demonstram que estas podem ser encapsuladas pela técnica *layer-by-layer* (DECHER, 1997; DIASPRO *et al.* 2002; SVALDO-LANERO *et al.*, 2006; HILLBERG *et al.*, 2006). As células encapsuladas podem ser imobilizadas em substratos microestruturados (KROL *et al.*, 2005), o que é um passo crucial para a produção de biosensores de células com aplicações que vão desde a área farmacológica até as áreas de biologia celular e toxicologia (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007).

De modo geral, a encapsulação polimérica tem a finalidade de conferir propriedades físico-químicas à superfície das células sem prejudicar a viabilidade celular. Portanto, é extremamente importante investigar os efeitos do recobrimento das células por PEMs no que diz respeito à preservação das mesmas. (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007). Já que as propriedades das multicamadas de polieletrólitos podem ser ajustadas através de um controle fino do protocolo de deposição (escolha de polieletrólitos, número de camadas, força iônica, temperatura, e pH) é de grande potencial, a investigação das propriedades do recobrimento no sistema híbrido.

Alguns dos aspectos tratados nos trabalhos referidos acima são aqui resumidos. Células de levedura encapsuladas com 4 camadas poliméricas se mantiveram vivas e com capacidade de replicação (DIASPRO *et al.*, 2002). Outros estudos mostram que a encapsulação com o sistema híbrido de célula/multicamadas de polieletrólitos aumenta a rigidez da célula em comparação com aquela observada na célula sem recobrimento (SVALDO-LANERO *et al.*, 2006). A inserção de uma célula viva no sistema composto com PEMs aumenta o número de parâmetros necessários na interpretação dos resultados da caracterização biofísica do sistema híbrido. Estudos extensivos de cápsulas de polieletrólitos obtidas através da deposição *layer-by-layer* em substratos não-vivos, com a subsequente remoção do substrato de sacrifício, mostraram um aumento da rigidez e um decréscimo da permeabilidade da célula em

consequência do aumento do número de camadas depositadas. É interessante entender como o uso de uma parte central viva da célula pode influir nesse resultado e até que ponto a célula pode afetar as propriedades do recobrimento (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007).

Svaldo-Lanero *et al.* (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007) investigaram a morfologia e as propriedades mecânicas de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) encapsuladas utilizando-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM). Células vivas individuais foram recobertas com deposição alternada de camadas de polieletrólitos com cargas opostas, a polialilamina hidrocloreada (PAH) e o poli(estireno sulfonato) de sódio (SPS), respectivamente. As propriedades das células encapsuladas, com diferentes números de camadas de polieletrólitos, e a partir de soluções de polieletrólitos com diferentes forças iônicas, foram investigadas. As imagens de AFM indicam um aumento na estabilidade do recobrimento com polieletrólitos, quando a força iônica das soluções é reduzida. Uma avaliação da viabilidade das células encapsuladas foi realizada com medidas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A análise de CLSM indica que as células preservam sua estrutura sub-celular e sua capacidade de duplicação após a encapsulação. (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007).

O trabalho de Schneider (SCHNEIDER *et al.*, 2007 C) utilizou a técnica LbL para pesquisar PEMs de quitosana e ácido hialurônico, onde foi estudado o efeito da reticulação química das PEMs nas propriedades físico-químicas das multicamadas e na capacidade destas de adesão celular. Os filmes de quitosana e ácido hialurônico foram reticulados utilizando carbodiimida (N=C=N) dissolvida em água. A rugosidade, espessura e dureza das PEMs foram avaliadas, e os autores concluíram que a reticulação aumenta apenas a dureza e a rugosidade. Os filmes reticulados também se mostraram mais resistentes à degradação enzimática pela hialuronidase. Outra conclusão interessante se refere ao efeito favorável que o aumento da dureza dos filmes teve para promover a adesão de células de condrosarcoma. Mais uma vez, ficou demonstrado que as PEMs são apropriadas para várias aplicações devido a suas propriedades de adesão e estabilidade mecânica, incluindo a estabilidade em meios enzimáticos (SCHNEIDER *et al.*, 2007 C).

### **2.11.2 Aplicações de PEMs envolvendo células do sistema imunológico**

Estratégias para imobilizar células não-aderentes do sistema imunológico em superfícies são de grande interesse para estudos imunológicos fundamentais, produção de biossensores a base de células e aplicações de engenharia do sistema imune. Poucos métodos de imobilização de células do sistema imune têm sido descritos na literatura (KIM *et al.*, 2004 A; KIM *et al.*, 2006). Kim e colaboradores apresentaram um método não-litográfico para se obter

padrões de células B utilizando uma padronização microscópica de polímeros sintéticos e utilizando interações específicas com anticorpos ou biotina-estreptavidina para a adesão das células B (KIM *et al.*, 2004 A). A estreptavidina é uma proteína com altíssima afinidade pela biotina (vitamina B7) – em contato, as duas formam uma das ligações mais fortes (não covalentes) na natureza. Esse método de imobilização foi estendido em um trabalho posterior onde micropoços de hidrogel padronizados, funcionalizados com anticorpos, foram fabricados para imobilizar células T para a detecção sensível de fragmentos de peptídeos e monitoramento de interações entre as células de linfócitos B e T (KIM *et al.*, 2006).

Linfócitos B são células do sistema imunológico adaptativo que tem evoluído para identificar agentes patogênicos muito eficientemente. Elas são, devido às suas habilidades de detecção, candidatas excepcionais para a fabricação de biossensores baseados em células para aplicações em diagnósticos de doenças infecciosas, em engenharia do sistema imune, onde podem ser utilizados para localizar e alcançar tecidos doentes e infectados (RIDER *et al.*, 2003). Resultados prévios tem mostrado uma aplicação específica das multicamadas de polieletrólitos (PEMs) de biopolímeros, onde células B e T foram funcionalizadas com *patches* (a base de filmes de PEMs) celulares (SWISTON *et al.*, 2008). A adesão destes *patches* envolveu a interação do linfócito com o ácido hialurônico que foi depositado como última camada externa, da montagem do filme multicamadas. A interação foi mediada pelo receptor celular de superfície, CD44, encontrado no linfócito propriamente dito e em vários tipos de células do sistema imunológico (UNDERHILL, 1992). O CD44 é uma glicoproteína, que tem três domínios físicos com funções específicas, incluindo: o domínio citoplasmático, o qual é responsável pela interação com o citoesqueleto; o domínio central, o qual é responsável pelo direcionamento de linfócitos; e o domínio com terminal amino, que se liga ao HA. Este domínio do CD44, contendo o terminal amino, reconhece e se liga a uma sequência de seis unidades de repetição da cadeia polimérica do HA. A interação entre o HA e o receptor CD44 é mais intensa em condições de pH neutro, e o aumento da força iônica do meio aumenta significativamente a adesão do HA, provavelmente devido a neutralização da repulsão entre o HA e o CD44 – os dois apresentam alta carga negativa (UNDERHILL, 1992).

### 2.11.3 Aplicações de PEMs envolvendo bactérias

O procedimento *layer-by-layer* tem sido também utilizado para aplicações biológicas na preparação de superfícies antibacterianas. Tendo em vista que a adesão bacteriana em superfícies - através de forças de van der Waals relativamente fracas e reversíveis, ligações eletrostáticas e hidrofóbicas - é considerada o início do processo de infecção bacteriana (OFEK

*et al.*, 2003), muitos estudos deram destaque ao desenvolvimento de superfícies que possam inibir a adesão de bactérias. As bactérias que conseguem se manter aderidas à superfície formam ligações estáveis com a superfície via ligantes específicos, tais como fímbrias ou pili, que são microfibrilas protéicas que se estendem da membrana das bactérias e que servem como pontos de fixação das bactérias à superfície - mantendo-as a nanômetros de distância da mesma (OFEK *et al.*, 2003; PALMER *et al.*, 2007).

Para evitar a adesão bacteriana em superfícies, existem três abordagens diferentes: superfícies que liberam substâncias bactericidas, recobrimentos que resistem à adesão de bactérias e superfícies que possuem ação bactericida ao contato (LICHTER *et al.*, 2009).

PEMs que liberam biocidas são normalmente preparadas com prata, íons de prata, antibióticos, fármacos e compostos de quaternários de amônio (FENG *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2005; DAI e BRUENING, 2002; LI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2008; CHUANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2005; GRUNLAN *et al.*, 2004, KRUTYAKOV *et al.*, 2008). Como exemplo, Feng *et al.* utilizaram íons de prata para evitar a multiplicação de bactérias via uma ligação destes íons aos grupos tióis das membranas bacterianas. O processo aumenta a permeabilidade da membrana celular, permitindo assim, a entrada dos íons de prata no interior da célula e a sua ligação ao DNA - evitando a reprodução de bactérias. CUI *et al.* prepararam nanoreatores de PEMs com grupos de ácidos carboxílicos livres e disponíveis para a ligação de íons de prata (CUI *et al.*, 2008). Outras substâncias bactericidas, como os antibióticos gentamicina (CHUANG *et al.*, 2008) e ciprofloxacina hidrocloreada (MAO *et al.*, 2005), também têm sido incorporados em PEMs, para aplicações de liberação controlada. Grunlan *et al.* estudaram PEMs antimicrobianas com a incorporação e subsequente liberação controlada da cetrimida, um composto de quaternários de amônio – compostos com ação catiônica forte que lisa membranas celulares carregadas negativamente, resultando em morte celular (GRUNLAN *et al.*, 2005). No processo, a molécula catiônica se liga, permeabiliza e lisa a membrana bacteriana, negativamente carregada, similarmente ao processo da ação da quitosana com grupos amino protonados.

Vários trabalhos exemplificam superfícies resistentes às bactérias por si só (BOULMEDAIS *et al.*, 2004; RIEDL *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2005; RICHERT *et al.*, 2004 A; CHUANG *et al.*, 2008). Especificamente, Richert *et al.* mostraram que PEMs de quitosana e ácido hialurônico, depositadas com pH 5,0 e em altas concentrações de NaCl (0,15 M), evitam a adesão de aproximadamente 80% das bactérias *E. coli*, enquanto que reduz a adesão, entre 20% a 40%, no caso de filmes preparados com pH 5,0 em baixas concentrações de NaCl (0,01 M) (RICHERT *et al.*, 2004 A). Segundo o trabalho, a redução da adesão bacteriana está

correlacionada com o aumento da espessura do filme ou a uma redução da rigidez do filme em condições de alta força iônica. O grupo de Cassinelli *et al.* sugeriu que a hidrofiliabilidade do ácido hialurônico é responsável pela redução da adesão bacteriana (CASSINELLI *et al.*, 2000). A resistência à adesão de bactérias devido à presença do ácido hialurônico em filmes multicamadas ainda não foi comprovada, já que o HA é usualmente utilizado na construção de filmes com outras espécies que inativam ou destroem bactérias, tais como íons de prata (MALCHER *et al.*, 2008) e quitosana (RICHERT *et al.*, 2004 A; CHUA *et al.*, 2008).

A quitosana, devido às suas características catiônicas, tem sido utilizada como componente na fabricação de superfícies que tenham a propriedade de inativar bactérias quando com elas entrar em contato. A quitosana, tanto quando está dispersa em solução ou quando está imobilizada em superfícies, consegue se ligar às membranas celulares de bactérias negativamente carregadas e rompê-las (RABEA *et al.*, 2003).

Em PEMs contendo CHI, as cargas catiônicas da CHI conseguem interagir com as bactérias que tentam se aderir às superfícies das PEMs (FU *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2006; BRATSKAYA *et al.*, 2007; CHUA *et al.*, 2008; ELSABEE *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que a quitosana em PEMs é mais eficaz na redução da adesão de bactérias em superfícies em comparação com uma única camada de quitosana absorvida (ELSABEE *et al.*, 2008) ou ligada covalentemente na superfície de substratos (BRATSKAYA *et al.*, 2007). Uma maior densidade de quitosana na superfície das PEMs aumenta a atividade antibacteriana da superfície. Portanto, condições escolhidas no preparo das PEMs, tais como força iônica e pH podem ser otimizadas para aumentar os segmentos de quitosana na superfície de um filme e, com isso, aumentar a atividade antibacteriana das PEMs. Combinando propriedades antibacterianas de vários compostos, Yuan *et al.* demonstraram que filmes de PEMs híbridos de quitosana com prata e titânia (que cria radicais biocidas aplicando irradiação UV) são recobrimentos antibacterianos multifuncionais (YUAN *et al.*, 2008).

#### **2.11.4 Métodos e Máquinas de Automatização para a Deposição LbL**

O processo LbL muitas vezes requer a deposição de mais de 10 bicamadas para produzir filmes finos funcionais resistentes. Estes sistemas requerem tempos de imersão da ordem de 5 a 10 minutos, o que torna o processo demorado e por isso, mais susceptível a erro humano durante a preparação, quando realizado manualmente. Diversos grupos de pesquisa têm utilizado *slide stainers* (tingidores de lâminas) modificados (SWISTON *et al.*, 2008; LICHTER *et al.*, 2008, LOWMAN *et al.*, 2004; NOLTE *et al.*, 2004; HE *et al.*, 2003), máquinas caseiras (DUBAS & SCHLENOFF, 1999; JIN *et al.*, 2003) ou robôs comercialmente construídos

(VUILLAUME *et al.*; 2003; RMAILE & SCHLENOFF, 2003; MAEHARA *et al.*, 2003; ETIENNE *et al.*, 2005) para automatizar este processo de imersão repetitiva.

O processo LbL é tipicamente realizado com máquinas de imersão estática ou em máquinas de imersão que tem a opção de agitar o substrato. A opção para agitar o substrato, enquanto imerso, é uma opção interessante, porém, a máquina disponível apresenta várias desvantagens, como, por exemplo, a necessidade de ter um cilindro de gás ou uma fonte externa de gás para operar a plataforma giratória que suporta as soluções de imersão. Por outro lado, as máquinas citadas são muito limitadas quanto ao número de posições - para acomodar as soluções de imersão - e quanto ao número de ciclos de imersão possíveis; não são fechadas para evitar contaminação externa, e não oferecem a possibilidade de instalação de filtros, para que a máquina seja auto-suficiente, sem o requerimento de uma sala limpa, caso necessário. Para evitar contaminação muitas máquinas disponíveis necessitam ser operadas dentro de uma capela ou em ambiente controlado. Outros sistemas, ainda, têm apenas uma posição onde é colocada uma única solução para lavagem tanto dos componentes positivos quanto dos negativos, podendo isso resultar na complexação indesejável dos componentes

## CAPÍTULO 3

### PEMs de BIOPOLÍMEROS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo descreve o estudo de filmes nanoestruturados de polímeros naturais de quitosana (CHI), ácido hialurônico (HA), alginato de sódio (ALG) e carboximetil celulose (CMC). Filmes de PEMs compostos de CHI, HA, CMC e ALG são interessantes para uma grande variedade de aplicações biotecnológicas devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. A influência de parâmetros, inerentes ao processo de adsorção sequencial na deposição e formação dos filmes, tais como pH, concentração de solução, força iônica (concentração de NaCl), e tempo de deposição, foram estudados. Estudou-se também a preparação de filmes constituídos pelos polímeros sintéticos poliestireno sulfonato de sódio (SPS) e o poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC) como pré-camada, na tentativa de se promover uma deposição mais uniforme dos biopolímeros subsequentes, utilizados neste trabalho.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos *Department of Materials Science and Engineering*, *Department of Chemical Engineering*, e *Center for Materials Science and Engineering* (CMSE) no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) sob co-orientação do Prof. Dr. Michael Rubner e supervisão do Prof. Dr. Robert E. Cohen. Graças à colaboração entre os laboratórios do MIT e o LEQUIP da Unicamp, coordenado pela Profa. Marisa Beppu e orientadora deste trabalho, foi possível desenvolver o programa de doutorado sanduíche, financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de julho/2008 a agosto/2009.

A análise dos resultados experimentais, a elaboração dos gráficos, a redação do artigo publicado - descrevendo os resultados principais - assim como a composição da tese de doutoramento e experimentos adicionais, foram realizados no LEQUIP/Unicamp, no período de setembro/2009 a março/2011.

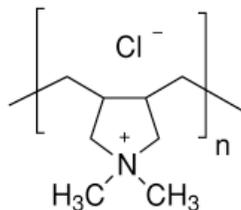
Na primeira parte do trabalho, o objetivo foi a produção e a caracterização de PEMs de quitosana/ácido hialurônico, quitosana/alginato e quitosana/carboximetil celulose com vistas a aplicações biotecnológicas. Esse objetivo incluiu as seguintes etapas:

1. Preparação das soluções de quitosana, ácido hialurônico, alginato de sódio e carboximetilcelulose.
2. Preparação da montagem do experimento para a execução das deposições consecutivas das multicamadas.
3. Produção de PEMs de CHI/HA, CHI/ALG e CHI/CMC.
4. Análise e caracterização dos filmes de PEMs obtidos, com a aplicação das seguintes técnicas de análise: Perfilometria, Elipsometria, Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopia de Força Atômica (MFA), Goniometria, e Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação (*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation*) (QCM-D).
5. Variação de parâmetros, durante a deposição dos filmes finos, tais como pH e concentração iônica (NaCl) das soluções de biopolímeros - tendo como base a análise realizada nos ensaios preliminares - com objetivo de produzir PEMs com características desejáveis para aplicações específicas.

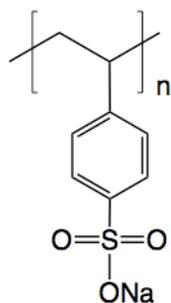
## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Materiais

O ácido hialurônico (HA, de *Streptococcus equi sp*, massa molecular  $\approx 1,6 \times 10^6$  g/mol), quitosana (CHI, baixa massa molecular  $\approx 5 \times 10^4$  g/mol, 75 - 85 % desacetilada), alginato (ALG, na forma de alginato de sódio, baixa massa molecular  $\approx 12 - 19 \times 10^4$  g/mol), carboximetilcelulose (CMC, baixa massa molecular  $\approx 9 \times 10^5$  g/mol), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC,  $(C_8H_{16}ClN)_n$ , massa molecular média  $\approx 1 - 2 \times 10^5$  g/mol, 20% massa em solução aquosa), e o poliestireno sulfonato de sódio (SPS,  $(C_8H_7NaO_3S)_n$ , massa molecular  $\approx 7 \times 10^4$  g/mol) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (USA). O PDAC é um polieletrólito catiônico, e sua estrutura molecular está representada na Figura 3.1. O SPS é um polieletrólito aniônico e sua estrutura molecular está representada na Figura 3.2.



**Figura 3.1.** Representação da estrutura química do poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC).



**Figura 3.2.** Representação da estrutura química do poliestireno sulfonato de sódio (SPS).

Todos os polieletrólitos foram utilizados sem purificação prévia. O pH das soluções de polieletrólitos foi ajustado com 1,0 M HCl ou 1,0 M NaOH. Todos os reagentes eram de grau analítico. Lâminas de vidro pré-limpas e de *wafer* de silício Si(100) de grau *clean-room* foram utilizados como substratos. Para análises dos filmes com espectroscopia no infravermelho, lâminas de seleneto de zinco (ZnSe) foram utilizados. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore) com uma resistividade de 18,2 M $\Omega$ ·cm.

### 3.2.2 Métodos de Preparação e Caracterização de PEMs

Os métodos de preparação e caracterização das PEMs estão descritos a seguir.

#### 3.2.2.1 Preparação de Substratos para Deposição LbL

Substratos de lâminas de vidro foram limpas com uma solução 3% de detergente (Micro 90) e imersas, em um banho de ultrassom, por 15 min. Em seguida, as lâminas de vidro foram imersas em uma solução de NaOH 1 M e imersas em banho de ultrassom durante 10 min. Para a remoção do NaOH residual, os substratos foram lavados duas vezes em um banho ultrassom com água Milli-Q 18,2 M $\Omega$ ·cm durante 5 min. Finalmente, estes foram secos com N<sub>2</sub>. Antes de serem utilizados, substratos de *wafer* de silício (Si(100)) foram limpos com etanol, secos com N<sub>2</sub> e expostos a um plasma de O<sub>2</sub>, (*high setting*: 720 V DC, 25 mA DC, 18 W), sob vácuo de 100 mTorr durante 15 min, utilizando-se o equipamento *Harrick Plasma Cleaner*, modelo PDC-32G.

#### 3.2.2.2 Preparação de Soluções de Polieletrólitos

Soluções de CHI, HA, ALG e CMC foram preparadas nas concentrações de 1% (m/v) em água Milli-Q 18,2 M $\Omega$ ·cm dissolvendo a respectiva quantidade de polímero em água durante 24 horas sob leve agitação mecânica. A solução de CHI foi preparada com 100 mM de ácido acético glacial (HAc, 60,05 g/mol). Soluções de CHI, HA, ALG, e CMC foram preparadas com

0 mM e 100 mM NaCl (58,44 g/mol). As soluções de PDAC e SPS foram preparadas para se obter concentrações de  $10^{-2}$  M (baseado na massa molecular da unidade de repetição) destes polímeros dissolvidos em água Milli-Q 18,2 M $\Omega$ ·cm com 100 mM de NaCl. Soluções de água para lavagem durante o processo de deposição *layer-by-layer* foram ajustadas para pH 3,0 e pH 5,0 para a preparação de multicamadas de CHI/HA e CHI/ALG, e pH 4,0 para multicamadas de CHI/CMC. Normalmente, a água Milli-Q utilizada no laboratório (MIT) registrava um pH = 5,7. Todas as soluções acima mencionadas foram ajustadas para pH  $3,0 \pm 0,2$ , pH  $4,0 \pm 0,2$  ou pH  $5,0 \pm 0,2$  com soluções de 1 M HCl ou 1 M NaOH. A utilização simultânea das soluções de HCl e NaOH para o ajuste do pH foi evitada, para que não houvesse acréscimo de íons de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, o que corresponderia à adição de NaCl à solução, que influenciaria a força iônica final.

Soluções de CHI, HA, ALG, CMC, PDAC e SPS foram preparadas com concentrações relativamente altas destes componentes, para garantir que não houvesse diluição apreciável das soluções durante o procedimento de formação das multicamadas. Isto se torna necessário para garantir uma deposição uniforme das multicamadas.

### 3.2.2.3 Preparação das Multicamadas de Polieletrólitos (PEMs)

A técnica de deposição *layer-by-layer* (LbL) para a formação de filmes finos foi baseada nos procedimentos descritos por Decher, Yoo *et al.* e Mendelsohn *et al.* (DECHER, 1997; YOO *et al.*, 1998; MENDELSON *et al.*, 2000). Os dois equipamentos automatizados de imersão utilizados neste estudo foram o Zeiss HMS<sup>TM</sup> Series Programmable Slide Stainer, da Carl-Zeiss (USA), para imersões estáticas (*static dipping*), e o StratoSequence VI, da nanoStrata Inc. (USA), para imersões rotativas (*spin dipping*).

Substratos de vidro ou de *wafer* de silício, limpos, foram imersos na solução do polieletrólito catiônico (PDAC ou quitosana, primeiro) e, em seguida, submetidos a lavagens com água Milli-Q sob leve agitação. Os substratos foram subsequentemente imersos na solução do polieletrólito de carga oposta (SPS, ácido hialurônico, alginato de sódio, ou carboximetilcelulose) e enxaguados com água Milli-Q. Após a repetição consecutiva desse processo e a deposição com o número de bicamadas desejado, os substratos contendo os filmes foram secos com corrente de N<sub>2</sub> à temperatura ambiente.

A notação utilizada para cada bicamada de polímeros complementares é: (Poly<sub>1x</sub>/Poly<sub>2y</sub>)<sub>n</sub>. Poly1 e Poly2 se referem aos polímeros 1 e 2, x e y se referem aos pHs das soluções poliméricas, e n é o número de bicamadas depositadas. Uma “meia bicamada” adicional é representada como  $n = n,5$ , onde n é um número inteiro de bicamadas.

A pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> foi depositada nos substratos utilizando-se o procedimento de imersão automática com o equipamento Zeiss HMS<sup>TM</sup> Series Programmable Slide Stainer. Lâminas limpas de vidro ou de *wafer* de silício foram alternadamente imersos em soluções de PDAC (pH 4, 100 mM NaCl) e SPS (pH 4, 100 mM NaCl) durante 10 min, cada uma destas etapas era seguida por duas outras consecutivas de lavagem com água Milli-Q (pH~5,7), durante 2 e 1 min, respectivamente.

As bicamadas dos biopolímeros foram depositadas utilizando-se o *StratoSequence VI* (*spin dipper*) com *software StratoSmart v6.2* da *nanoStrata Inc.* (USA). As deposições dos biopolímeros foram realizadas durante 10 min, sem rotação do porta-amostra. Três etapas de lavagem consecutivas (2, 1, e 1 min) com água Milli-Q foram realizadas com rotação do porta-amostra e substratos dentro das soluções a uma frequência de aproximadamente 100 rpm.

É importante destacar que todos os filmes multicamadas de polieletrólitos deste estudo foram preparados à temperatura ambiente e à pressão atmosférica.

### 3.2.3 Caracterizações das PEMs

Os métodos utilizados e as medidas efetuadas para a caracterização dos filmes PEMs nesta fase do trabalho incluem: a caracterização visual dos filmes produzidos; a perfilometria e a elipsometria para medidas de espessura e rugosidade (*rms*) (*root mean squared* - valor quadrático médio) dos filmes; medidas de ângulos de contato com um goniômetro visando avaliar a hidroflicidade/hidrofobicidade dos filmes; espectroscopia UV-Vis para quantificação de grupos funcionais livres do HA – utilizando-se o corante catiônico azul de alciano (*alcian blue*) e espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier para quantificar os grupos de COO<sup>-</sup> e COOH do HA. Os filmes PEMs também foram caracterizados quanto a sua morfologia, utilizando-se a técnica de microscopia de força atômica (MFA).

#### 3.2.3.1 Perfilometria

A técnica de perfilometria foi utilizada para se medir o perfil da superfície, a espessura e a rugosidade das amostras secas dos filmes produzidos. O perfilômetro é um equipamento que determina e mede o perfil da superfície do filme mediante o contato e deslizamento de uma ponta de diamante (*stylus*) sobre a mesma. A ponta *stylus* é deslocada horizontalmente sobre a superfície a ser medida, provocando, também, seu deslocamento vertical devido à rugosidade da superfície. O deslocamento vertical é convertido em um valor de altura em Z correspondente à altura de passo (*step height*) da superfície. A topografia é a principal medida

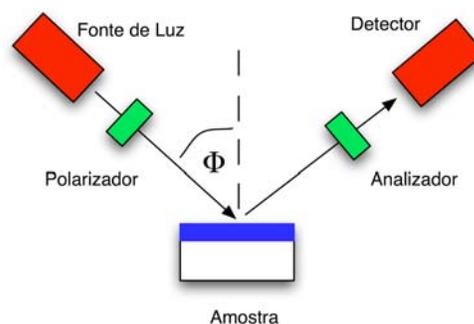
que o instrumento é capaz de fazer. Para a medida de espessura é necessário fazer uma incisão na espessura total do filme (utilizando um estilete, por exemplo), permitindo assim, medir a espessura entre o substrato e a superfície externa do filme. A amostra é colocada em uma plataforma no local X, Y,  $\theta$ , e o equipamento localiza as coordenadas do ponto de contato. Arrastando o *stylus* por cima de uma certa linha sobre a superfície, (escolhida pelo usuário), a topologia desta superfície pode ser determinada através da resposta do sensor de deslocamento correlacionado com a distância percorrida na amostra em X, Y resultando em uma leitura topográfica na linha varrida. A posição da ponta é controlada por um cristal piezoelétrico. As medidas de espessura e rugosidade da superfície são realizadas com o uso de transdutores piezoelétricos. O perfilômetro P-16+ *stylus profilometer* (KLA Tencor Corporation, USA), localizado no *Center for Materials Science and Engineering* (CMSE), MIT, foi utilizado com os seguintes parâmetros: 0,50 mg-f ( $\sim 4.9 \mu\text{N}$ ) de força aplicada (*applied force*), 200 Hz de taxa de amostragem (*sampling rate*), 50  $\mu\text{m}$ /segundos de velocidade de varredura (*scan speed*), e 131/0,0781 Å (angstroms) de faixa/resolução (*range/resolution*).

### 3.2.3.2 Elipsometria

A elipsometria é uma técnica óptica não destrutiva e de alta precisão podendo ser utilizada para caracterização da espessura, rugosidade, e índice de refração de filmes finos. A técnica se baseia na detecção da mudança do estado de polarização da luz incidente causada pela reflexão na superfície da amostra. Os valores medidos são expressos em termos de psi ( $\Psi$ ) e delta ( $\Delta$ ), e relacionados com a razão dos coeficientes de reflexão de Fresnel  $R_p$  e  $R_s$  para a luz polarizada, p e s, respectivamente, e descrito pela Eq. 3.1.

$$\frac{R_p}{R_s} = \tan(\psi)e^{i\Delta} \quad \text{Equação 3.1}$$

A Figura 3.3. mostra uma representação esquemática de uma medida de elipsometria.



**Figura 3.3.** Representação esquemática de uma medida de elipsometria.

No presente trabalho, a técnica de elipsometria foi utilizada para medir os estados de polarização ( $\Psi$  e  $\Delta$ ) em função do comprimento de onda incidente, o ângulo de incidência e o estado de polarização, para inferir os parâmetros de espessuras e rugosidades das PEMs produzidos, assim como o índice de refração dos mesmos. Para as análises, foi utilizado o elipsômetro de ângulo variável M-2000D, J. A. Woollam Co., Inc., acoplado com os equipamentos EC-400 (*overtemp*) e XLS-100 (*set-up*), localizados no *Institute for Soldier Nanotechnologies* (ISN) no MIT. Todas as análises foram realizadas no comprimento de onda de 633 nm (laser vermelho - HeNe), a um ângulo de 70 graus (posição de 29,9 mm na plataforma).

O elipsômetro espectroscópico foi inicialmente calibrado com um substrato de Si (Si wafer, *clean-room grade*) e a altura da amostra foi ajustada até se obter a maior intensidade de luz refletida atingindo o detector.

Após a etapa de calibração, o substrato de Si foi substituído pela amostra. Cada amostra foi centralizada e a aquisição espectroscópica dos dados, pelo detector do equipamento, foi feita na faixa de 200 nm – 2000 nm. A região de 600 nm - 2000 nm foi escolhida para análise, visto que abaixo de 600 nm não há informação relevante para o sistema de multicamadas dos biopolímeros.

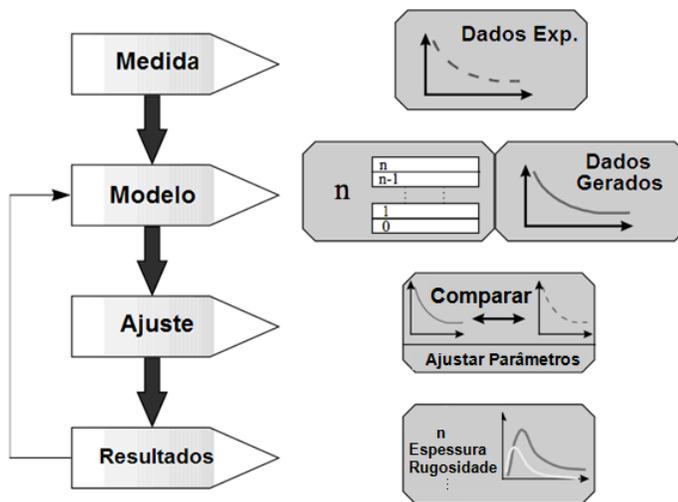
O modelo de Cauchy para o ajuste dos dados experimentais foi utilizado. A equação de Cauchy é uma relação empírica entre o índice de refração  $n$  e o coeficiente de extinção  $k$ , constantes ópticas da amostra e o comprimento da onda incidente,  $\lambda$ :

$$\begin{aligned} n(\lambda) &= A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \dots \\ k(\lambda) &= 0 \end{aligned} \quad \text{Equação 3.2}$$

Os parâmetros A, B, e C são coeficientes que podem ser determinados pelo ajuste da equação aos resultados experimentais.

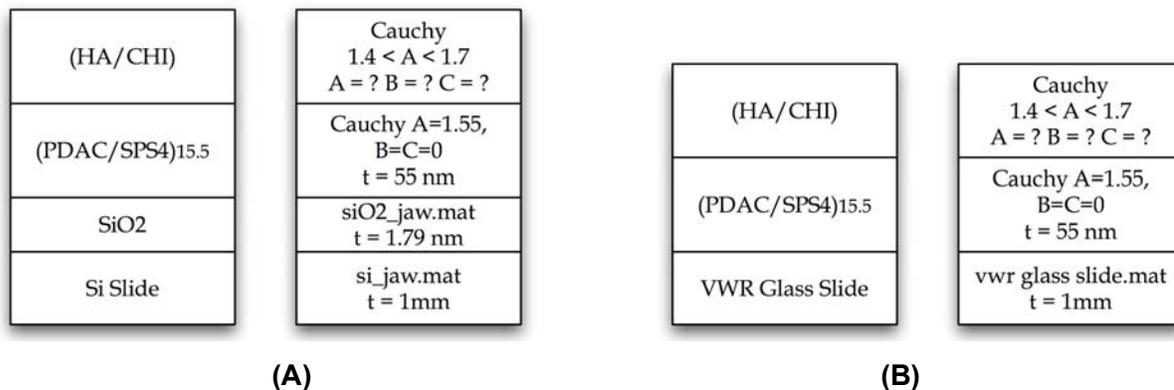
Após selecionar a região de análise, e com estimativas iniciais das constantes A, B, e C do modelo de Cauchy ( $1,4 < A < 1,7$ ,  $0 = B < 0,05$ ,  $0 = C < 0,02$ ), os valores de A, B e C foram ajustados, num processo iterativo, de modo ao modelo reproduzir os resultados experimentais. O algoritmo de Levenberg-Marquardt de regressão múltipla não-linear é utilizado para o processo de ajuste. Expressões algébricas analíticas são utilizadas para prever  $\Psi$  e  $\Delta$  em função das constantes ópticas ( $n$ ,  $k$ ) e espessura das camadas do filme, apresentadas por

AZZAM e BASHARA (AZZAM & BASHARA, 1987). Esquemáticamente, o procedimento é apresentado na Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Procedimento básico utilizado em medidas de elipsometria para determinar propriedades de materiais a partir de dados experimentais (adaptada do curso de elipsometria da J. A. Woollam Co., Inc., 2001).

O índice de refração de filmes de biopolímeros está na faixa de aproximadamente 1,4 a 1,7. Para o ajuste dos dados experimentais de elipsometria, os seguintes parâmetros de modelagem foram utilizados (Fig. 3.5):



**Figura 3.5.** Exemplo de parâmetros para análise de filmes com a técnica de elipsometria, (A) utilizando *wafer* de Si, e (B) lâmina de vidro.

Os valores de espessura registrados, correspondem às médias dos valores obtidos nas medidas individuais (mínimo de 3), realizadas em cada filme. As medidas de espessura obtidas com a técnica de elipsometria foram comparadas com as medidas de espessura obtidas com a

técnica de perfilometria. Existe a opção de incluir, teoricamente, no modelo, uma camada que represente a rugosidade da superfície, que foram realizadas, mas não aqui reportadas.

### 3.2.3.3 Ângulo de Contato

Ângulos de contato de água Milli-Q nas superfícies das PEMs produzidas foram medidos com a utilização de um goniômetro, como descrito anteriormente (YOO *et al.*, 1998). A medida de ângulo de contato avalia a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade da camada superior (externa) da superfície, na faixa de 5-10 Å (angstroms) da superfície externa das PEMs (RUBNER, 2009). Para as medidas de ângulo de contato foi utilizado o goniômetro da *Advanced Surface Technology* (AST) com câmera CCD e vídeo, localizado no laboratório do Prof. Dr. Michael Rubner, no MIT. Os ângulos de contato apresentados são ângulos de contato estáticos medidos com a técnica padrão de *sessile drop*. Uma gota de água é formada na ponta de uma seringa e colocada na superfície da amostra movimentando-se o porta-amostra verticalmente até que se tenha o contato entre a gota e a superfície da amostra. Imagens das gotas, nas superfícies das amostras, foram obtidas com uma câmera CCD, e posteriormente aumentadas para a análise. Os ângulos, esquerdo e direito, das gotas de água foram medidos com um programa de computador. O volume das gotas de água foi mantido em aproximadamente 50 µL. Sete medidas, em diferentes regiões de cada amostra, foram realizadas e uma média dos ângulos de contato foi feita para representar as características de molhabilidade das amostras.

### 3.2.3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para quantificar os grupos de COO<sup>-</sup> e COOH do ácido hialurônico presentes nas PEMs produzidas, foi utilizado um espectrofotômetro FTIR. O espectro de absorção destes filmes, na região do infravermelho, foi obtido após a deposição dos polieletrólitos em janelas de seleneto de zinco (ZnSe), seguindo o mesmo procedimento de preparação das PEMs descrito acima. Os valores de absorbância referentes aos grupos de COO<sup>-</sup> e COOH do ácido hialurônico foram estimados examinando-se as bandas de absorção em ~1550 cm<sup>-1</sup> e ~1710 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, e supondo que os coeficientes de extinção são aproximadamente iguais (MENDELSON *et al.*, 2000). A altura de cada pico foi considerada como o máximo de uma curva de absorbância Gaussiana, para cada espécie química respectiva, e as áreas sob as curvas correspondentes a cada espécie química, foram calculadas. Esta análise é importante para entender as ligações entre a quitosana e o ácido hialurônico, e sua influência nas propriedades das PEMs, tais como a disposição dos grupos funcionais presentes no interior e na superfície das multicamadas. As medidas incluem a adsorção de filmes com 25

multicamadas depositadas nas duas faces do substrato de ZnSe. O espectrofotômetro *Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR* (USA), com software OMNIC, localizado no laboratório do *Center for Materials Science and Engineering*, do MIT, foi utilizado para realizar as medidas e estimativas das áreas das curvas de absorvância.

### 3.2.3.5 Espectroscopia UV-Vis

Grupos livres de ácido carboxílico - que não tinham ligações iônicas com grupos amino de CHI - presentes no HA, foram tingidos imergindo-se as PEMs de (CHI/HA) em uma solução de azul de alciano (*alcian blue*) (0,001 M, pH 3,0) durante 15 min. Este corante foi escolhido devido a experiência de utiliza-lo em experimentos anteriores do grupo do Prof. Rubner, os quais indicam que o corante não quebra ligações eletrostáticas entre os grupos, e somente se liga a grupos funcionais livres. Supôs-se que após os 15 minutos de adsorção deste corante, existe uma difusão completa do corante em todo o filme (estado de equilíbrio). O corante azul de alciano é um corante catiônico, cuja estrutura química está representada na Figura 3.6. Posteriormente, as amostras foram extensivamente lavadas com água Milli-Q pH 3,0 durante 2 min em duas vezes consecutivas. Os filmes foram secos com N<sub>2</sub> e analisados imediatamente em um espectrofotômetro Cary 5E UV-Vis, localizado no laboratório do *Center for Materials Science and Engineering*, do MIT. Os picos do azul de alciano foram observados no comprimento de onda de 617 nm.

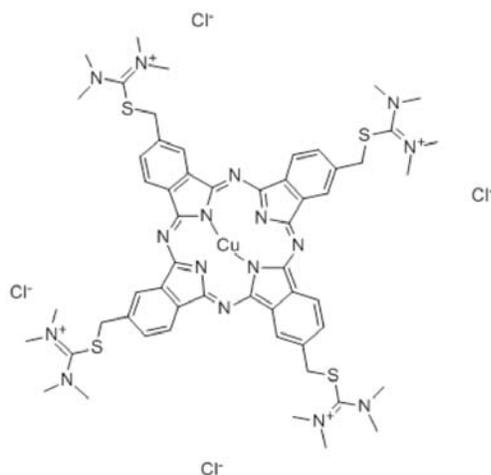


Figura 3.6. Representação da estrutura química do corante azul de alciano.

### 3.2.3.6 Microscopia de Força Atômica

A topografia e a rugosidade dos filmes multicamadas também foram analisadas através de um microscópio de força atômica NanoScope IIIA da *Digital Instruments Dimension 3000*

Scanning Probe Microscope, Santa Barbara, CA, localizado no laboratório do *Center for Materials Science and Engineering*, do MIT. As análises foram realizadas no modo de não-contato, utilizando-se uma ponta de MFA, modelo RTESP e de constante elástica de 20-80 N/m.

### 3.2.3.7 Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação (QCM-D)

A microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) fornece informações muito úteis sobre o mecanismo de construção e propriedades (*i.e.* energia de dissipação) dos filmes multicamadas depositados através do processo LbL. (MARX, 2003). O equipamento Q-Sense D300 (Q-Sense, Sweden), utilizado para todas as medidas, está apresentado na Figura 3.7, e se encontra no laboratório do *Center for Materials Science and Engineering*, do MIT.

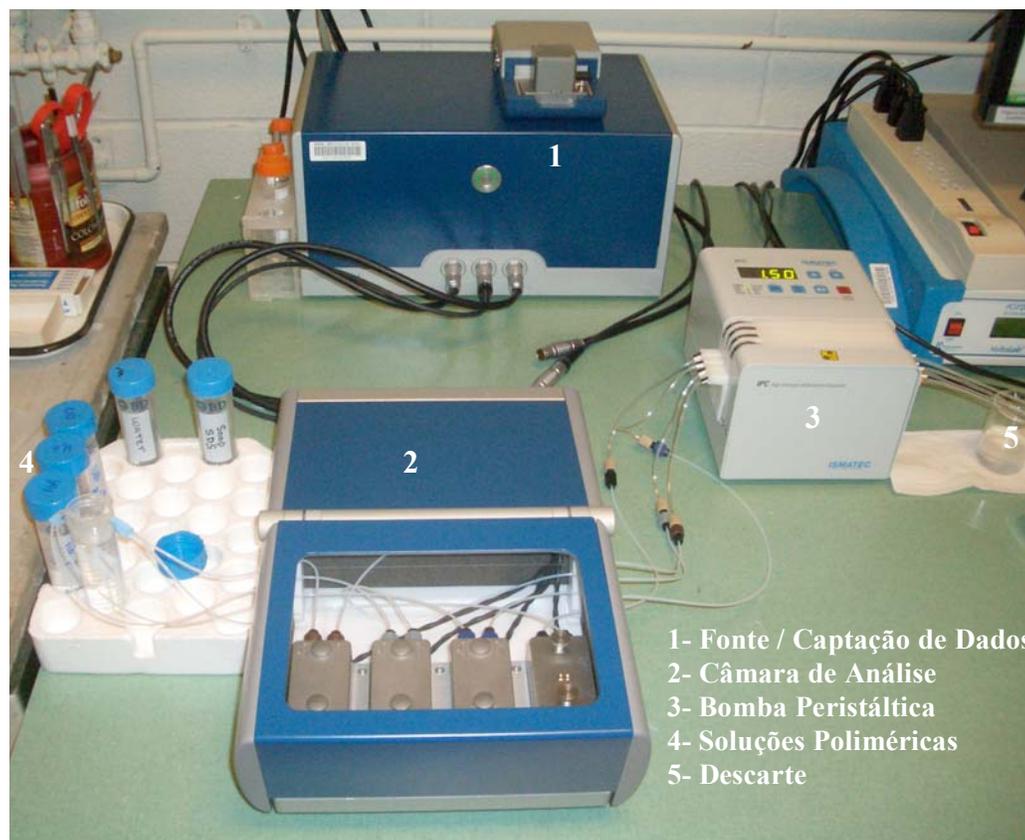


Figura 3.7. Equipamento Q-Sense D300.

A balança é equipada com sensores de cristais de quartzo de superfície circular, da ordem de décimos milímetros de espessura, onde são depositados os filmes para análise. Um campo elétrico alternado é aplicado nos eletrodos (de ouro) superior e inferior que recobrem a

superfície circular do cristal de quartzo. Uma frequência  $f$  na faixa de 5 MHz a 20 MHz, é aplicada ao cristal de quartzo. Durante a vibração, o cristal de quartzo se desloca com amplitude lateral da ordem de um a dois nanômetros.

Cada solução de polieletrólito utilizada na preparação dos filmes é escoada em fluxo sobre o cristal de quartzo. Para um aumento de massa depositada sobre o cristal de quartzo, há um correspondente decréscimo na sua frequência de oscilação e vice-versa. Num regime viscoelástico - caso do presente estudo, onde filmes de HA/CHI são altamente hidratáveis e não rígidos – o modelo Voigt foi utilizado, com o qual foi possível determinar a massa depositada.

O modelo de Voigt, utilizado para a análise das PEMs, representado esquematicamente na Figura 3.8, consiste em um amortecedor newtoniano e uma mola de Hook elástica conectados paralelamente. A relação matemática deste sistema é expressa pela seguinte equação diferencial de primeira ordem:

$$\sigma(t) = E\varepsilon(t) + \eta \frac{d\varepsilon(t)}{dt}$$

$t = \text{tempo}[s]$

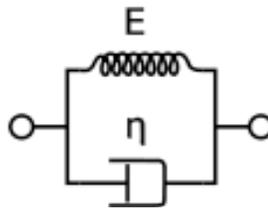
$\sigma = \text{tensão}[Pa]$

$\varepsilon = \text{deformação}$

$E = \text{módulo elástico}[Pa]$

$\eta = \text{viscosidade do material}[Pa \cdot s]$

Equação 3.2



**Figura 3.8.** Representação esquemática do modelo de Voigt.

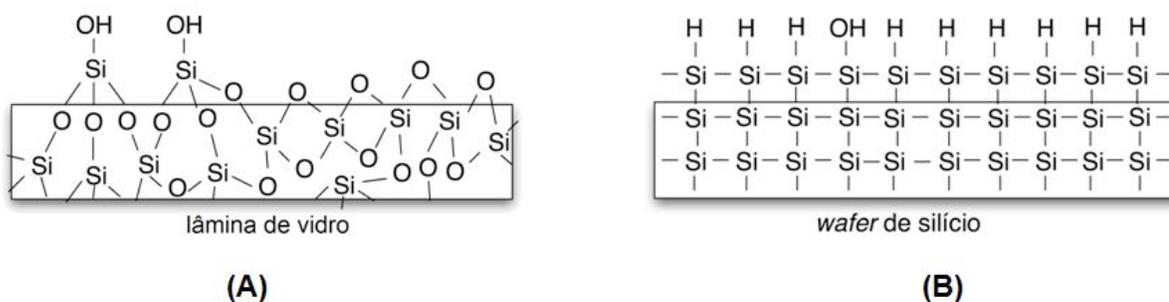
No processo, a massa recobrimo o cristal oscila com a mesma frequência e se desloca lateralmente com a mesma amplitude que o cristal de quartzo. Num processo elástico, não existe perda de energia. Se houver perda de energia durante a oscilação da massa, esse processo é viscoelástico (inelástico), que é o caso do presente estudo. Para obtenção das medidas da variação da massa depositada sobre o cristal de quartzo, os terminais dos eletrodos de ouro são ligados a um circuito elétrico oscilante e o modo de ressonância contínua é utilizado, tal que os desvios na frequência  $f$  do cristal são medidos e correlacionadas com o aumento ou perda de massa sobre o cristal de quartzo.

Preliminarmente, antes de receber a deposição dos filmes, os cristais de quartzo foram limpos em uma solução de 1 M HCl, secos com N<sub>2</sub>, e submetidos a um plasma de O<sub>2</sub> durante 30 min, com o equipamento *Harrick Plasma Cleaner*. Os cristais foram subsequentemente recobertos com um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> utilizando-se o mesmo protocolo mencionado acima. O filme depositado sobre a superfície do cristal contendo os eletrodos foi removido com HCl e água Milli Q. Os cristais foram então imersos em água Milli-Q preparada com o mesmo pH da respectiva corrida de medidas QCM-D (pH 3,0 ou pH 5,0) programada - durante um mínimo de 6 horas - com o objetivo de entrarem em equilíbrio com as condições do experimento. Após esta etapa, os cristais foram posicionados dentro da câmara de análise. Soluções de polímero e de lavagem foram escoados sobre os cristais a uma vazão de 1,50 mL/min (escoamento não-turbulento). Para cada etapa de deposição, as soluções de polímero e de lavagem foram escoadas durante 11 min e 4 min, respectivamente. Todas as frequências e medidas de dissipação foram feitas na frequência de 15 Mz, e sobre-tons (*overtone*) do cristal de quartzo,  $\nu = 3$  e 5 Mz. As análises e as modelagens da espessura dos filmes foi realizada com o software QTools. Os parâmetros utilizados na modelagem foram: densidade das PEMs 1100 kg/m<sup>3</sup>, viscosidade do fluido 0,001 kg/m s, viscosidade das PEMs entre 0,0001 e 0,005 kg/m s, cisalhamento das PEMs entre 10<sup>4</sup> - 10<sup>8</sup> Pa, e espessura das PEMs entre 10<sup>-10</sup> e 10<sup>-6</sup> m.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Formação de Filmes PEMs

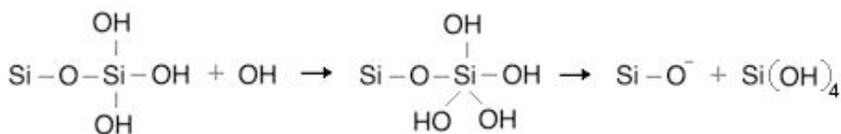
A técnica *layer-by-layer* de recobrimento para a formação de filmes PEMs não tem limitações com respeito à topografia e à área superficial dos substratos. Porém, é importante destacar que as características das superfícies dos substratos são de grande importância para a deposição de camadas poliméricas e a subsequente formação das PEMs. Os substratos utilizados neste trabalho, lâminas de vidro (constituídas de geralmente 70-74% de SiO<sub>2</sub> e possivelmente com CaO, MgO, e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – forma amorfa) e *wafers* de silício (~ 99,99% silício – forma cristalina), são negativamente carregados, devido os grupos hidroxilas (-OH) e ligações Si-O<sup>-</sup>, presentes nas suas superfícies, Figura 3.9.



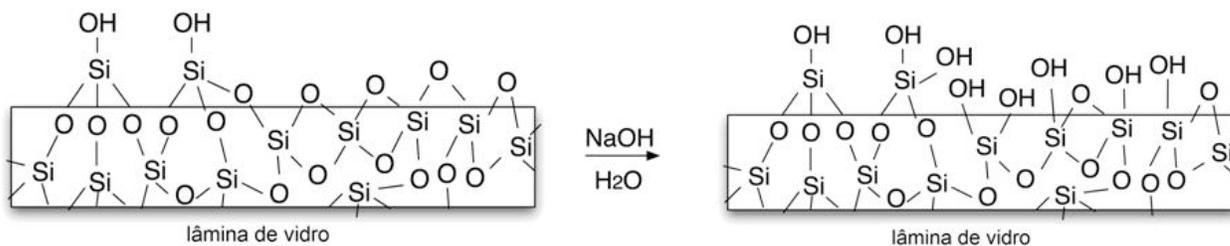
**Figura 3.9.** Representação esquemática da superfície de (A) substratos de vidro e (B) *wafer* de silício.

O pré-tratamento dos substratos de vidro com NaOH em um banho de ultrassom, ou com plasma de O<sub>2</sub>, serve para a dois propósitos: limpeza dos substratos (em particular: para a remoção de material orgânico) e para promover o aumento do número de grupos hidroxilas na superfície destes substratos, possibilitando uma ligação iônica mais eficaz entre a superfície do substrato e os polieletrólitos. No caso dos substratos de *wafer* de silício não é recomendável utilizar NaOH, uma vez que este corrói substancialmente a superfície dos *wafers* (ALLONGUE *et al.*, 1993), conseqüentemente alterando a rugosidade da superfície do *wafer* de silício, o que não é desejável. Neste caso, é recomendável utilizar apenas o tratamento com plasma de O<sub>2</sub> para limpar e acrescentar mais grupos –OH na superfície destes substratos.

Para o caso da lâmina de vidro, o tratamento com NaOH promove um aumento da densidade de cargas negativas na superfície do vidro por aumentar a disponibilidade de sítios Si-O<sup>-</sup>. Isto ocorre já que a unidade tetraédrica SiO<sub>4</sub>, formadora do vidro, está susceptível ao ataque nucleofílico da hidroxila em meio alcalino, resultando em uma estrutura intermediária penta-coordenada que se decompõe por ruptura da ligação Si-O-Si, conforme mostra a equação (BUNKER *et al.*, 1988) e representação esquemática na Figura 3.10:

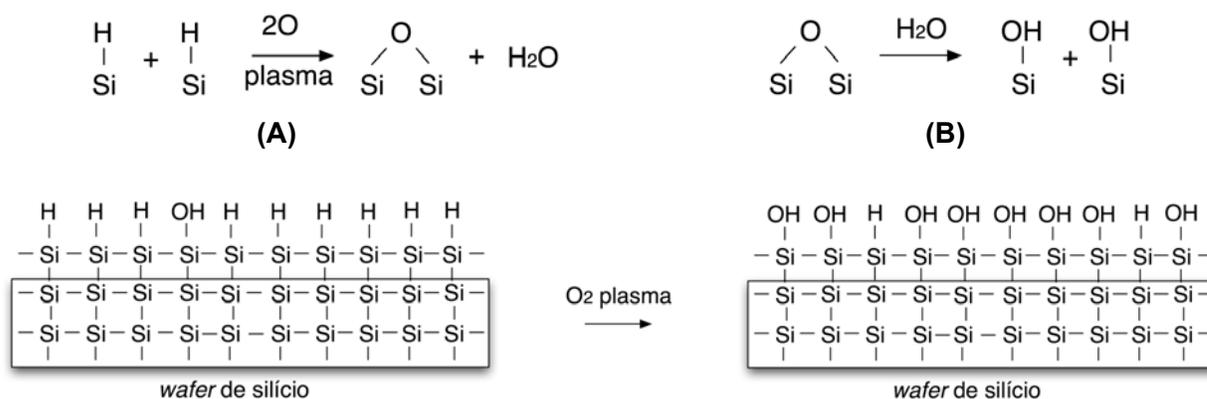


(adaptada de BUNKER *et al.*, 1988)



**Figura 3.10.** Representação esquemática da reação de substratos de vidro com NaOH.

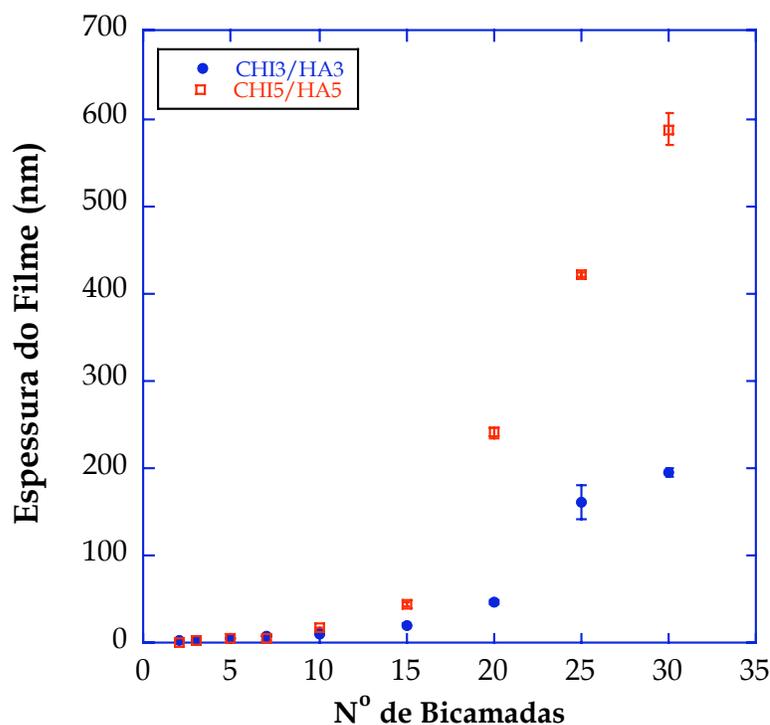
Pelo fato do *wafer* de silício (100) ter ligações terminais em hidrogênio, os átomos de oxigênio do plasma reagem com os hidretos de silício gerando água e uma superfície com ligações terminais em siloxano, Figura 3.11(A) (HABIB *et al.*, 2010). A superfície se torna hidrofílica e reage com a água, Figura 3.11(B), promovendo o aparecimento de terminais hidroxilas, de interesse para que haja uma deposição efetiva de polieletrólitos catiônicos na superfície.



**Figura 3.11.** Representação esquemática das reações de *wafers* de silício com plasma de oxigênio.

Observou-se que a formação de filmes de HA/CHI ou ALG/CHI depositados diretamente nos substratos é um processo lento, especialmente no caso do vidro, onde poucos grupos hidroxilas (-OH) estão disponíveis para a formação de ligações iônicas com o polímero catiônico CHI. Em comparação as lâminas de vidro, observou-se que a deposição de filmes em *wafers* de silício é mais eficaz. A densidade dos grupos disponíveis O- e OH delimitam o processo de deposição no início. Os resultados da formação de filmes de CHI3/HA3 e CHI5/HA5 depositados diretamente em *wafers* de silício estão apresentados a seguir.

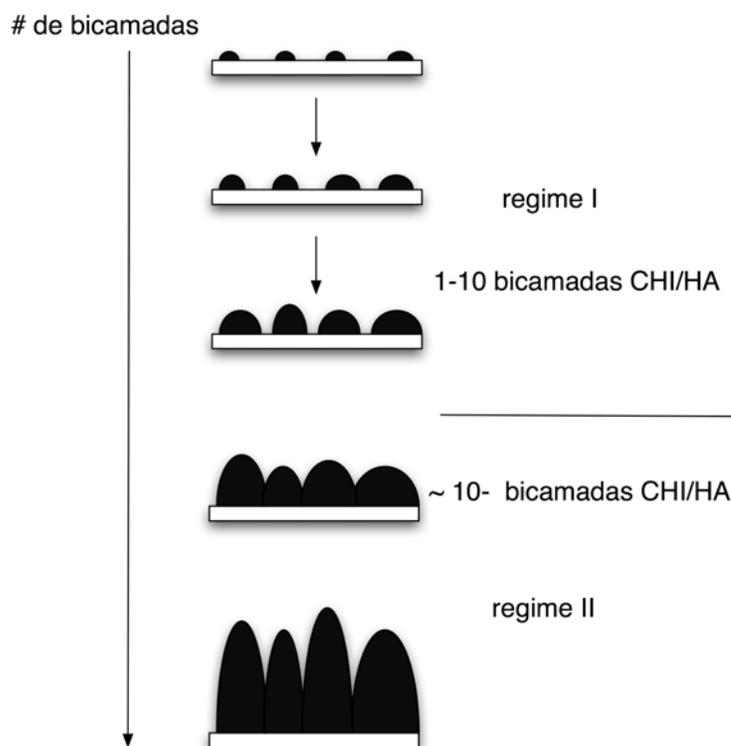
A Figura 3.12 mostra a espessura de PEMs de CHI/HA em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e 5,0, depositados sobre *wafers* de silício.



**Figura 3.12.** Espessura de PEMs de CHI/HA em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 ou pH 5,0, e 0 mM NaCl, depositados sobre *wafers* de silício. (média de 3 medidas: perfilometria)

Observa-se que, para deposição sobre os *wafers* de silício, a espessura dos filmes de CHI3/HA3 e CHI5/HA5 são da mesma ordem de grandeza até aproximadamente 10 bicamadas (11 nm, 17 nm, respectivamente). Observou-se que filmes de CHI3/HA3 não cresceram uniformemente, e em certas regiões do substrato medidas de perfilometria mostraram 0 nm de espessura, regiões nas quais aparentemente não houve deposição de filmes. Portanto, acredita-se que os filmes de multicamadas não foram depositados uniformemente na superfície durante a deposição das primeiras 10 bicamadas, e a superfície foi completamente recoberta com camadas poliméricas somente após as primeiras 10 etapas de deposição de bicamadas de CHI/HA. Acredita-se que a deposição e o crescimento de multicamadas de CHI/HA ocorrem em dois regimes de crescimento, independentemente do substrato vidro ou *wafers* de silício utilizado. O primeiro (regime I) é caracterizado pela formação de pequenas deposições de multicamadas isoladas que crescem com a deposição de polieletrólitos na sua superfície e também devido à coalescência entre estas deposições isoladas. O segundo regime (regime II) ocorre quando a superfície do substrato está completamente recoberta, com o preenchimento dos vales, entre os sítios isolados das deposições prévias, com multicamadas de CHI/HA. Estes resultados concordam com os estudos do grupo de Picart (RICHERT *et al.*, 2004 A). Neste

regime (somente após 10 bicamadas), a taxa de crescimento é mais acelerada. Os regimes I e II estão representados esquematicamente na Figura 3.13.



**Figura 3.13.** Representação esquemática dos regimes de crescimento de PEMs de CHI/HA em substratos sólidos.

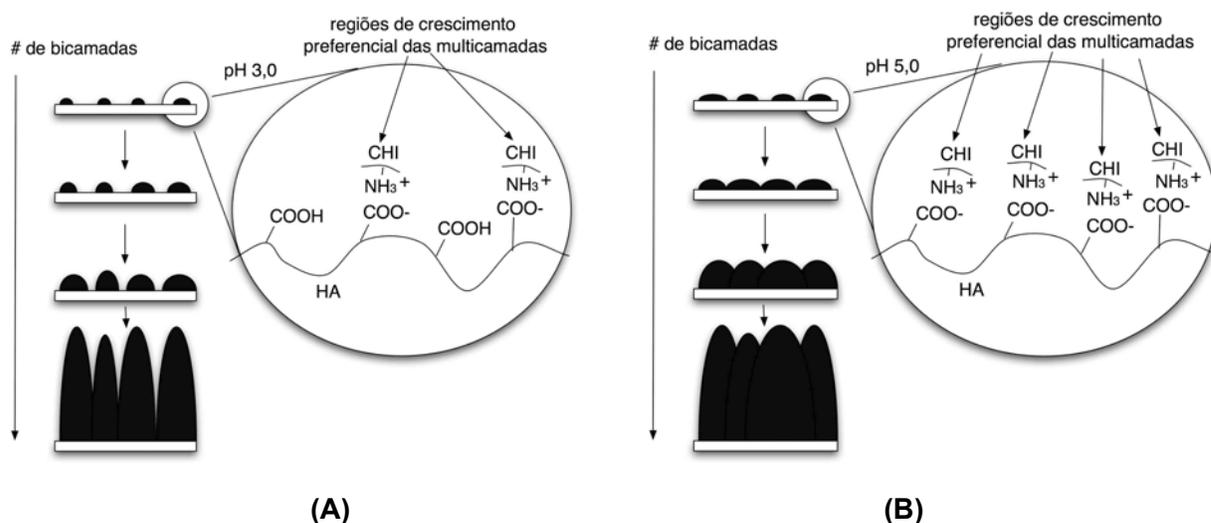
O crescimento dos filmes de PEMs de CHI/HA, depositados diretamente em *wafers* de silício, muda drasticamente após as primeiras 15 bicamadas. As curvas entre 15 e 30 bicamadas apresentam um perfil linear, porém o crescimento do filme em condições de pH 5,0 ( $y \approx 36,1x - 490$ ,  $R^2 = 0,99$ ) é aproximadamente 3 vezes maior em comparação às condições de pH 3,0 ( $y \approx 12,8x - 182$ ,  $R^2 = 0,93$ ). Na faixa entre 15 – 30 bicamadas, cada bicamada de CHI3/HA3 tem uma espessura de aproximadamente 11,64 nm, enquanto cada bicamada de CHI5/HA5 tem 36,16 nm de espessura.

O crescimento de bicamadas e a espessura de PEMs são governados pelo balanço entre as interações segmento-segumento de polieletrólitos e as interações segmento-superfície (tanto da superfície do substrato como das superfícies das camadas anteriores – interações entre camadas). Em condições onde há uma baixa carga na cadeia polimérica ou onde existe uma alta concentração iônica, a repulsão eletrostática entre diferentes segmentos de polieletrólitos é reduzida, o que favorece adsorção. Por outro lado, a atração eletrostática entre

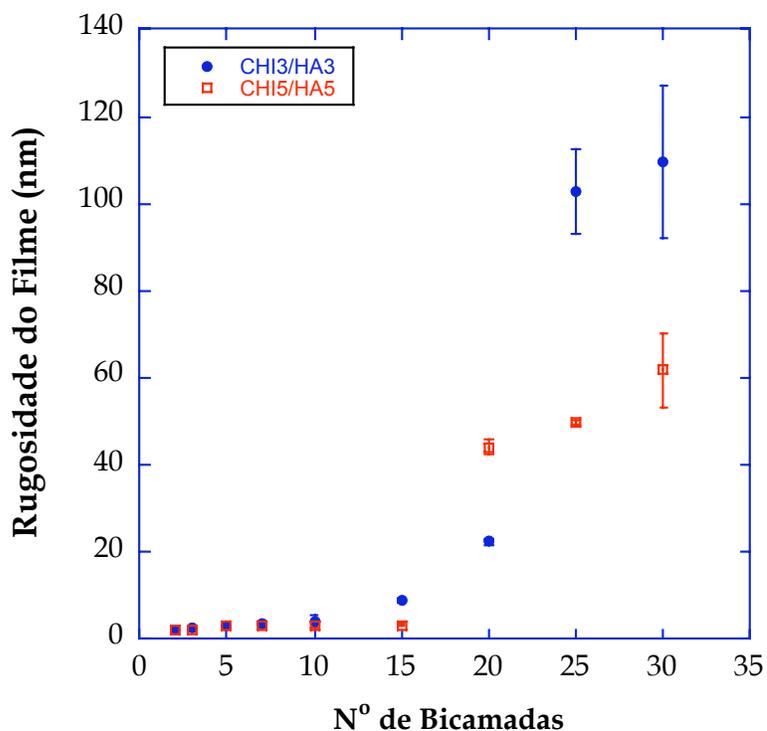
o polieletrólito e a superfície carregada com carga oposta é reduzida, o que age contra a adsorção de polieletrólitos (KURTH *et al.*, 2002).

A observação de que PEMs construídas com pH 5,0 crescem a uma taxa maior do que PEMs em condições de pH 3,0 pode ser explicada pela estrutura e conformação dos polímeros e as interações destes com a superfície da PEM nestas duas condições. As interações de segmentos de polieletrólitos-superfície são predominantes nesta situação. O polímero HA tem uma cadeia polimérica aproximadamente 32,6 vezes maior do que a cadeia da quitosana (massa molecular HA/massa molecular CHI,  $1,63 \times 10^6 \text{ g/mol} \div 5 \times 10^4 \text{ g/mol} \approx 32,6$ ). Na condição de pH 3,0, aproximadamente 50% dos grupos de ácido carboxílicos de HA ( $pK_a \approx 2,9$ ) estão desprotonados ( $-\text{COO}^-$ ) e 50% protonados ( $-\text{COOH}$ ), enquanto os grupos amino da quitosana ( $pK_b \approx 6,0$ ) estão praticamente todos protonados ( $\text{NH}_3^+$ ). Por outro lado, nas condições de pH 5,0, aproximadamente 90-100% dos grupos de ácido carboxílicos de HA estão desprotonados ( $-\text{COO}^-$ ), enquanto os grupos amino da quitosana também estão praticamente totalmente protonados ( $\text{NH}_3^+$ ). Portanto, existe uma interação segmento-superfície significativamente maior no caso de pH 5,0 em comparação com a existente nas condições de pH 3,0, como mostra esquematicamente a Figura 3.14. O crescimento das multicamadas de CHI/HA em condições de pH 3,0 é mais lento em comparação com as condições de pH 5,0, o que é corroborado pelos dados experimentais.

A Figura 3.15 mostra a rugosidade (*rms*) dos filmes de CHI/HA, obtida através de medidas de perfilometria, em função do número de bicamadas depositadas diretamente sobre *wafers* de silício. Observa-se que a rugosidade destes filmes aumenta substancialmente após as primeiras 10-15 bicamadas e, portanto, aproximadamente a partir da mesma região onde acredita-se que o recobrimento total do substrato com filmes poliméricos é alcançado. Filmes de CHI3/HA3 com 25 e 30 bicamadas apresentam rugosidades que são 260% e 300% maiores em comparação com aquelas dos respectivos filmes de CHI5/HA5, ( $162 \pm 20 \text{ nm}$  versus  $421 \pm 3 \text{ nm}$ , e  $195 \pm 6 \text{ nm}$  versus  $587 \pm 18 \text{ nm}$ , respectivamente). Estas observações estão de acordo com o modelo sugerido para explicar o crescimento das PEMs em condições de pH 3,0 e pH 5,0 esquematicamente apresentado na Figura 3.14.



**Figura 3.14.** Representações esquemáticas de crescimento de PEMs de CHI/HA em condições de (A) pH 3,0 e (B) pH 5,0, depositados sobre *wafers* de silício.

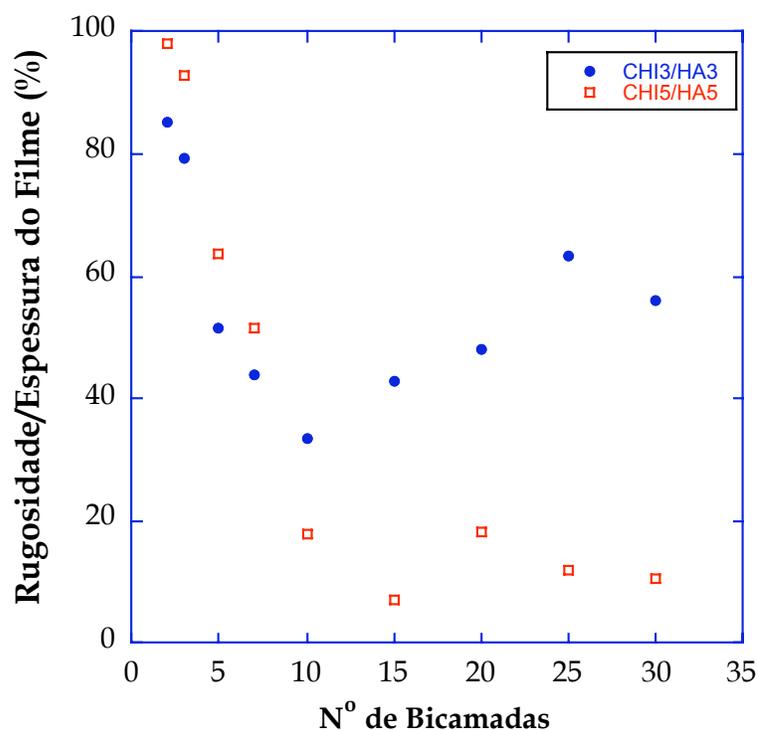


**Figura 3.15.** Rugosidade (*rms*) dos filmes de CHI/HA em função do número de bicamadas depositadas diretamente em *wafers* de silício, preparados em pH 3,0 ou pH 5,0, e 0 mM NaCl. (média de 3 medidas: perfilometria)

Para avaliar a relação entre as rugosidades (*rms*) dos filmes e suas respectivas espessuras dos filmes, um gráfico de rugosidade/espessura (%) em função do número de bicamadas foi construído, apresentado na Figura 3.16. Como se observa na Figura 3.16, a

razão rugosidade/espessura do filme diminui com o aumento do número de bicamadas até um mínimo alcançado com 10 bicamadas para filmes de CHI3/HA3, e um mínimo com 15 bicamadas para filmes de CHI5/HA5. Após este mínimo as razões para ambos os casos apresentam um aumento. As razões rugosidades/espessuras dos filmes de CHI3/HA3 com 15 ou mais bicamadas, apresentam valores na faixa de 34–63 %, que são significativamente maiores em comparação às razões observadas para filmes de CHI5/HA5 que apresentam valores na faixa de 7-18 %.

Para uma deposição de CHI/HA diretamente na superfície de *wafers* de silício, na ausência de NaCl, é preferível fazer a deposição com pH 3,0, caso a aplicação requiera que um certo número de bicamadas resulte em uma camada fina e rugosa. Por outro lado, para se obter uma maior espessura e menor rugosidade do filme, com o mesmo número de bicamadas, condições de preparo de pH 5,0 são preferíveis.

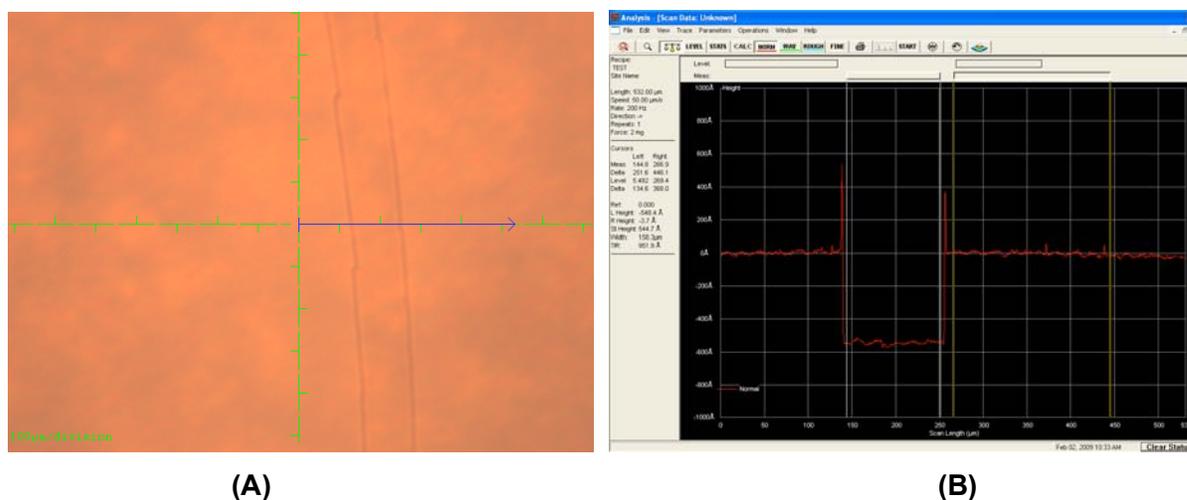


**Figure 3.16.** Percentagem da rugosidade (*rms*) dos filmes de CHI/HA normalizado pela espessura do filme respectivo, em função do número de bicamadas depositadas diretamente sobre *wafers* de silício. (média de 3 medidas: perfilometria)

Filmes de CHI e HA depositados diretamente sobre vidro tiveram uma adsorção menor em comparação com *wafers* de silício, e durante a deposição das primeiras 10-15 bicamadas, não houve um recobrimento uniforme na superfície do vidro. Portanto, para os estudos

posteriores, optou-se recobrir as superfícies dos substratos de lâminas de vidro e de *wafer* de silício com uma pré-camada de polieletrólitos de base/ácido fortes PDAC/SPS.

O processo de formação dos filmes pode ser melhorado depositando uma pré-camada de filmes de polieletrólitos de base/ácido fortes como o PDAC e SPS. O importante não é a escolha dos polieletrólitos para a pré-camada, e sim a obtenção de uma superfície altamente carregada para auxiliar na adsorção dos filmes de biopolímeros. O filme precursor de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5} + 100 \text{ mM NaCl}$  utilizado neste estudo apresentou uma espessura de aproximadamente 57 nm e uma rugosidade (*rms*) de aproximadamente 2 nm, através de medidas de perfilometria. Um exemplo da medida de perfilometria para o filme de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$  está apresentado na Figura 3.17.



**Figura 3.17.** Medida de perfilometria de filme de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$  depositados sobre lâminas de vidro, (A) imagem óptica do filme com ranhura feita com um estilete, (B) gráfico de análise da espessura e rugosidade (*rms*) do filme (em angstroms) versus a distância percorrida pela ponta de diamante (*stylus*).

O filme de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$  depositado sobre vidro é transparente e a formação deste filme é altamente reprodutível. A Figura 3.18 apresenta lâminas de vidro e de *wafer* de Si recobertos com a pré-camada de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$ .



**Figura 3.18.** Filmes de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$  depositados sobre (A) vidro e (B) *wafer* de Si.

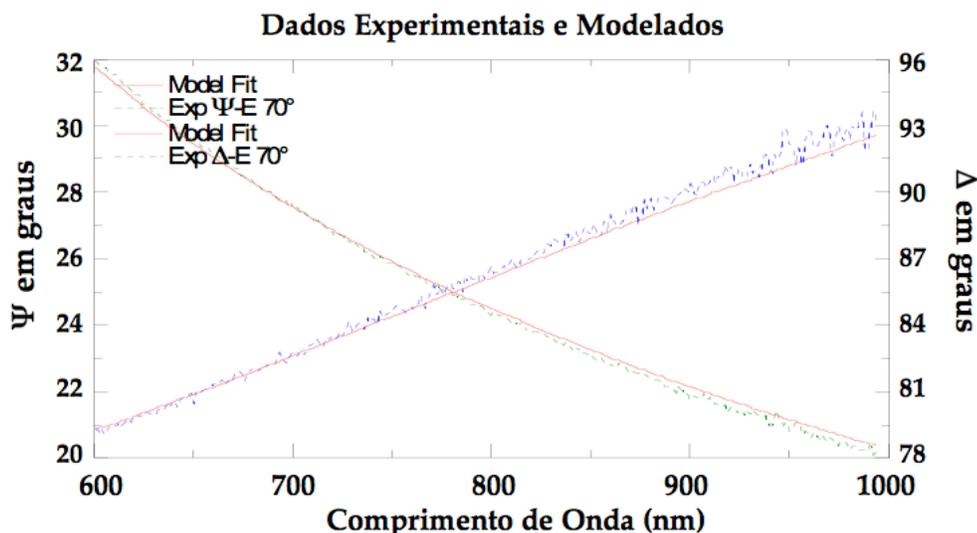
Para realizar uma comparação entre os métodos de perfilometria e elipsometria para a determinação da espessura dos filmes, foram realizadas medidas de elipsometria como descrito abaixo.

A Tabela 3.1 mostra os dados da medida de espessura de um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> através da técnica de elipsometria, tendo como resultados, espessura do *wafer* de Si igual a 1 mm e camada de SiO<sub>2</sub> igual a 10 nm. A camada *cauchy* e a variável Thick.2, na tabela, correspondem à espessura do filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, igual a 56,35 nm. O parâmetro An.2 representa o índice de refração deste mesmo filme, igual a 1,57. MSE (*mean squared error*) corresponde ao erro médio quadrado, que para este filme, foi igual a 1,335. Normalmente, em medidas de elipsometria, um modelo “razoavelmente preciso” tem um valor de MSE < 10.

**Tabela 3.1.** Exemplo de uma medida de espessura de um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> com a técnica de elipsometria.

MSE = 1,335	2 cauchy = 56,352 nm
Thick.2 = 56,352±0,0221	1 sio2_jaw = 10 nm
An.2 = 1,5731±0,000425	0 si jaw = 1 mm

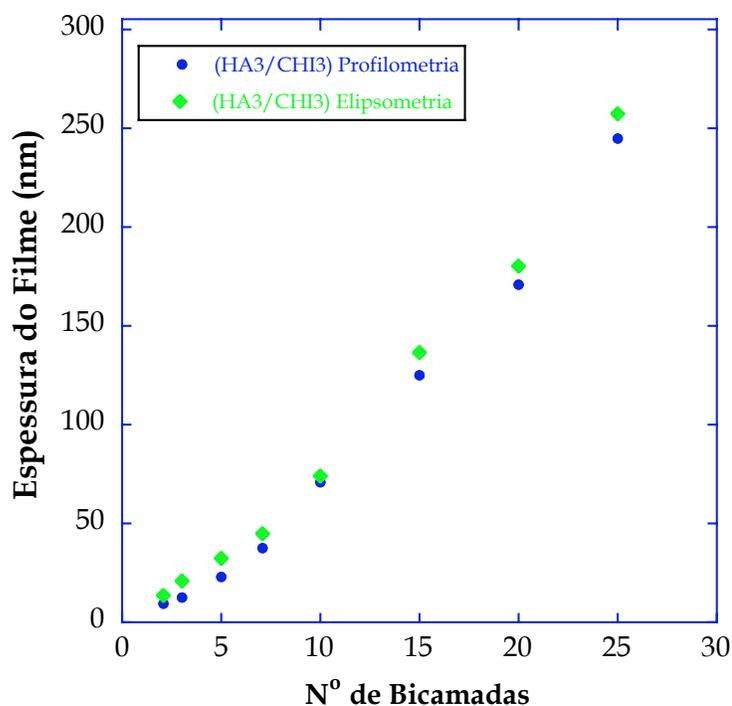
A Figura 3.19 mostra um exemplo de um gráfico de dados experimentais, no que diz respeito à espessura do filme, ajustados através da técnica de elipsometria para um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>.



**Figura 3.19.** Exemplo de um gráfico de dados experimentais e modelados de elipsometria para um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>.

Para os parâmetros dos ângulos de elipsometria  $\Psi$  e  $\Delta$ , define-se que  $0^\circ < \Psi < 90^\circ$  e  $0^\circ < \Delta < 360^\circ$ . A curva verde corresponde aos dados experimentais de  $\Psi$  à  $70^\circ$ , enquanto a curva azul corresponde aos dados experimentais de  $\Delta$ , em função do comprimento de onda,  $\lambda$  (nm). Os modelos para  $\Psi$  e  $\Delta$  são descritos pelas curvas vermelhas correspondentes a cada variável. Observa-se que o modelo utilizado conseguiu reproduzir os dados experimentais adequadamente.

Para se comparar medidas de espessura dos filmes de HA/CHI, utilizando-se as técnicas de perfilometria e elipsometria, filmes de HA/CHI com 2, 3, 5, 7, 10, 15, e 20 bicamadas foram depositados em condições de pH 3,0 e sem NaCl, sobre uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub> e analisados através destas duas técnicas. A Figura 3.20 mostra os resultados desta comparação entre as espessuras dos filmes, em função do número de bicamadas.

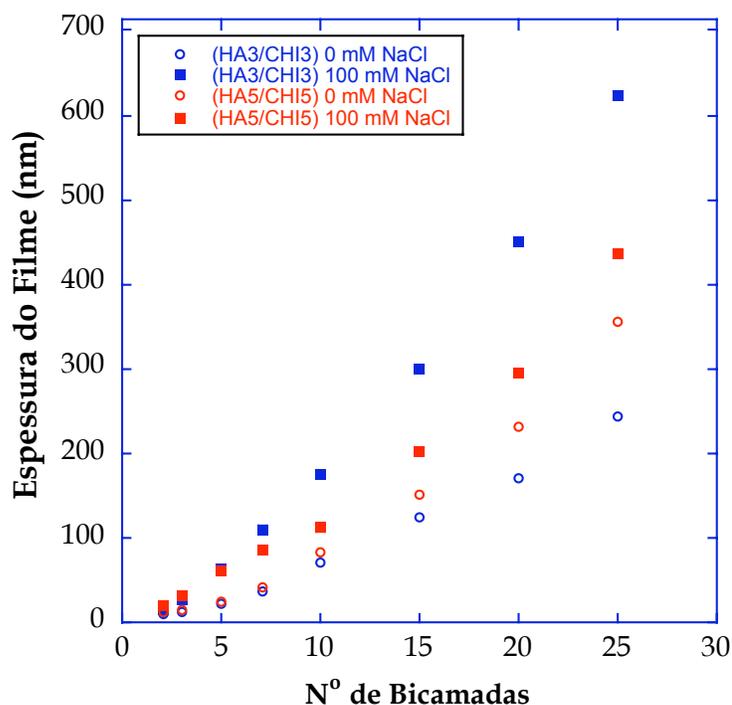


**Figura 3.20.** Comparação das curvas de crescimento de HA3/CHI3, 0 mM NaCl, através de medidas com as técnicas de perfilometria e elipsometria.

Observa-se que as duas técnicas fornecem dados de espessura bastante similares. Notou-se que a modelagem com a elipsometria resultou em espessuras sempre levemente maiores do que aquelas obtidas pela técnica de perfilometria (em média 41% maior para as primeiras sete bicamadas, e em média 6% maior na faixa de 10-25 bicamadas). A técnica de

elipsometria utiliza a luz para a medição, e portanto a espessura do filme sempre analisada não sofre alterações durante a medida. Por outro lado, a perfilometria aplica uma força com a ponta de diamante sobre a superfície do filme, que pode causar uma leve redução da espessura no momento da medida. O crescimento destes filmes aparenta ser exponencial até 10 bicamadas e linear após esse número de bicamadas. Já que a técnica de perfilometria é mais simples em termos de execução, as análises posteriores de espessura e rugosidade dos filmes produzidos foram realizadas com um perfilômetro.

O próximo passo do estudo foi avaliar o efeito do pH e da presença de NaCl na formação das PEMs de HA/CHI. Ensaios de deposição de multicamadas de HA e CHI sobre a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> foram realizados variando o pH (3,0 *versus* 5,0) e concentração de NaCl nas soluções poliméricas (0 *versus* 100 mM). A Figura 3.21 mostra curvas de crescimento para bicamadas de HA e CHI depositados sobre vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, na presença e ausência de 100 mM de NaCl nas soluções poliméricas.

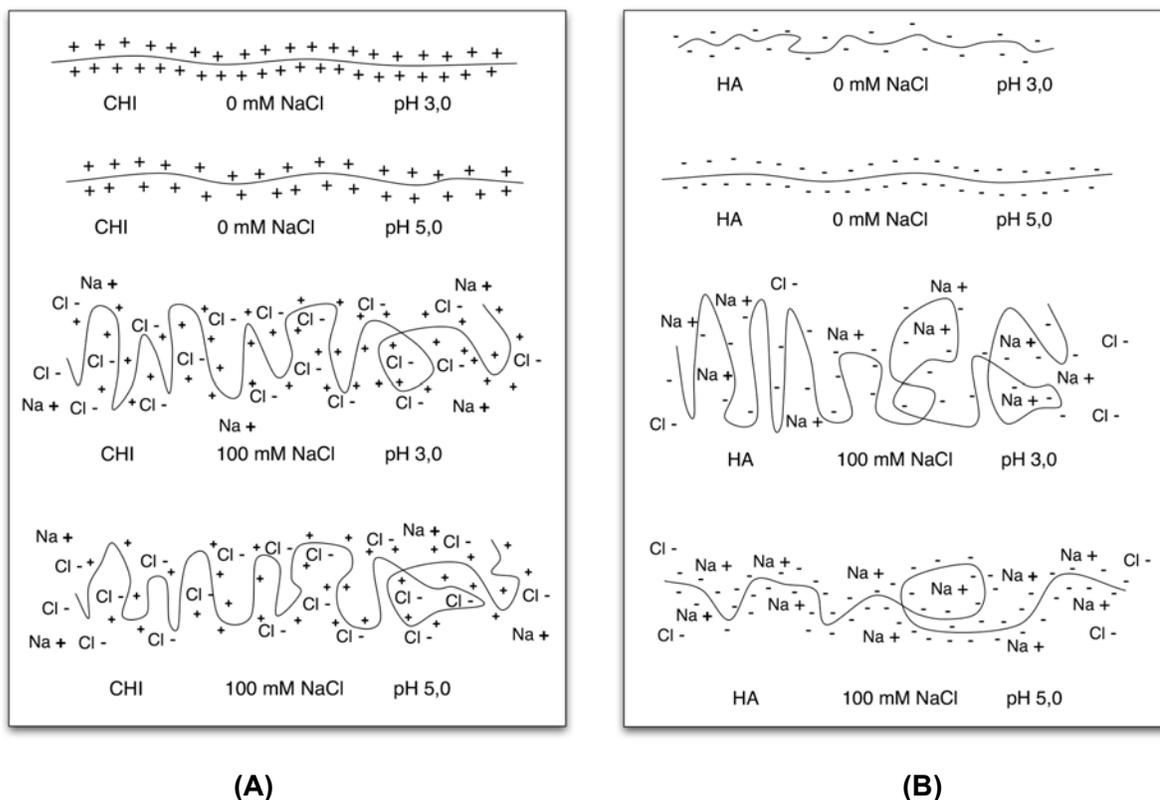


**Figura 3.21.** Espessura de PEMs de HA/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM e 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 7 medidas: perfilometria)

Filmes preparados com NaCl tiveram um crescimento maior em comparação com filmes preparados na ausência de NaCl, como esperado. Na ausência de NaCl, filmes preparados

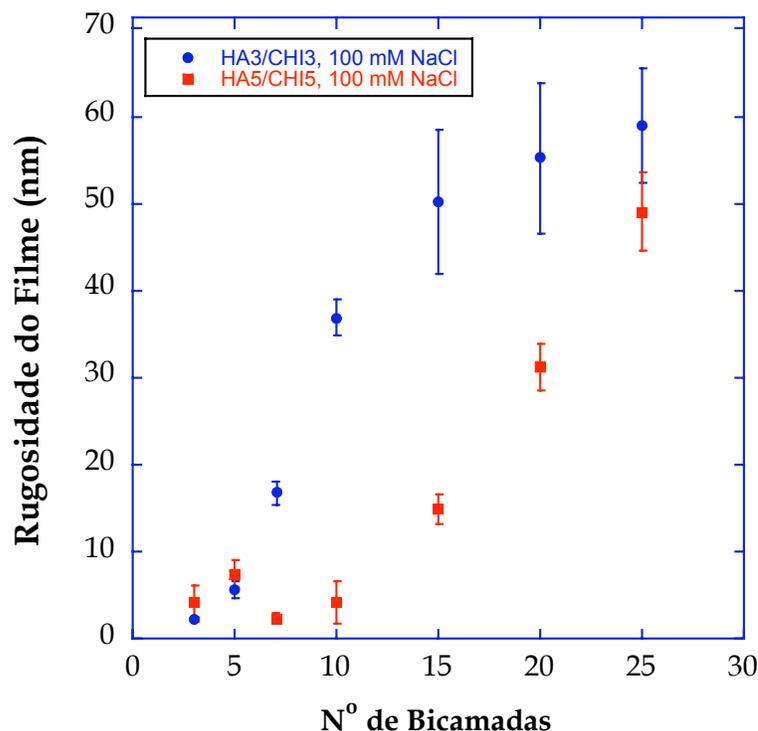
com pH 3,0 são menos espessos que aqueles preparados com pH 5,0. Interessantemente notar que, na presença de 100 mM, esse comportamento se inverte, sendo que os filmes preparados com pH 3,0 apresentam uma espessura maior em comparação aos filmes com pH 5,0.

A concentração de NaCl nas soluções de polieletrólitos tem uma grande influência na quantidade de polímero adsorvido na superfície e na taxa de adsorção. A quantidade de polieletrólito adsorvido aumenta com o aumento na concentração de sal (força iônica) (até um limite máximo da concentração de sal), o que se deve à conformação das cadeias poliméricas. Em soluções de baixa concentração de sal, as cargas ao longo da cadeia de polieletrólitos se repelem, fazendo com que a cadeia polimérica fique em uma conformação esticada. Com o aumento da concentração de sal, as cargas ao longo da cadeia de polieletrólitos são bloqueadas e o polieletrólito se torna mais flexível e com uma forma mais enovelada e, assim, com um maior raio de giro. A adsorção de cadeias enoveladas resulta em um maior número de *loops* e *tails* e, portanto, em multicamadas mais espessas (KURTH *et al.*, 2002). Esse comportamento foi observado nas multicamadas de CHI/HA. A Figura 3.22 mostra uma representação esquemática das conformações das cadeias poliméricas de CHI e HA, ilustrando esse comportamento.



**Figura 3.22.** Representação esquemática da conformação das cadeias poliméricas, de (A) CHI e (B) HA, em soluções preparadas na ausência e na presença de NaCl, e em pH 3,0 e pH 5,0.

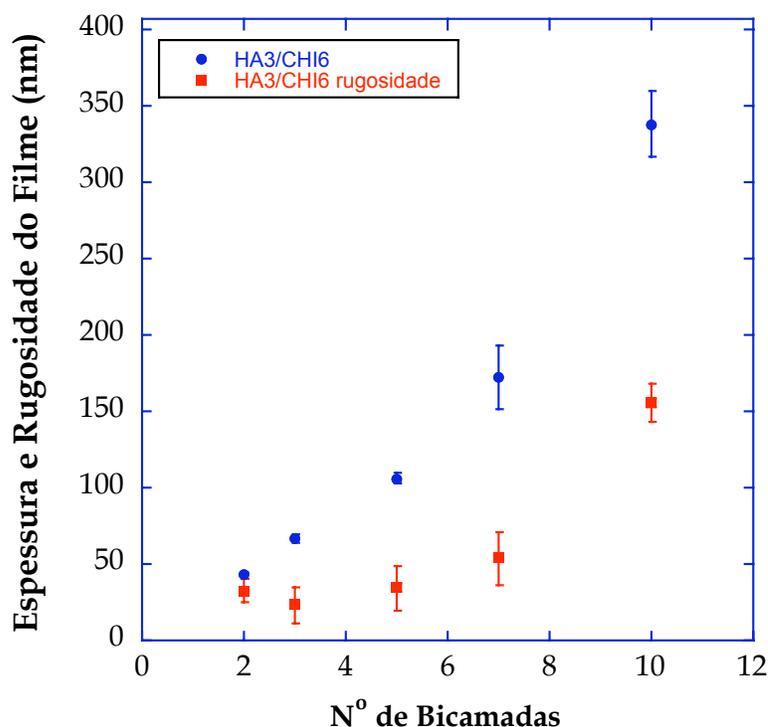
A Figura 3.23 mostra a rugosidade de filmes (nm) de (CHI3/HA3) e (HA5/CHI5) depositados em lâminas de vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, na ausência e presença de 100 mM NaCl, em função do número de bicamadas. Comparando-se os resultados apresentados na Figura 3.23 com resultados obtidos anteriormente (Figura 3.15) - nos quais os filmes depositados, na ausência de NaCl, mostravam uma rugosidade (*rms*) maior para filmes depositados em pH 3,0 em comparação aos filmes depositados em pH 5,0 - verifica-se que o comportamento se mantém também para filmes com a presença de NaCl, isto é, filmes com pH 3,0 são mais espessos que filmes com pH 5,0. A Figura 3.23 mostra que esse comportamento é, agora, mais pronunciado e que existe uma contribuição adicional devido à presença de NaCl que é evidenciada pelo distanciamento mais precoce e pronunciado, entre as espessuras, isto é, para um número de bicamadas bem menor, a espessura dos filmes em pH 3,0 já é bem maior do que para os filmes com pH 5,0, na presença de NaCl. Para o caso dos filmes (HA3/CHI3) com 100 mM NaCl, a rugosidade aparenta ter um comportamento de saturação após a deposição de 20-25 bicamadas.



**Figura 3.23.** Rugosidade (*rms*) de filmes (nm) de (CHI3/HA3) e (HA5/CHI5) na ausência e presença de 100 mM NaCl em função do número de bicamadas. (depositados em lâminas de vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>; média de 7 medidas de perfilometria)

Na tentativa de se obter filmes de HA/CHI com uma espessura ainda maior, preparados através da variação do pH das soluções poliméricas, filmes de HA3/CHI6, 0 mM NaCl, foram depositados em *wafers* de Si recobertos com a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. A Figura 3.24 mostra a espessura e rugosidade destes filmes em função do número de bicamadas.

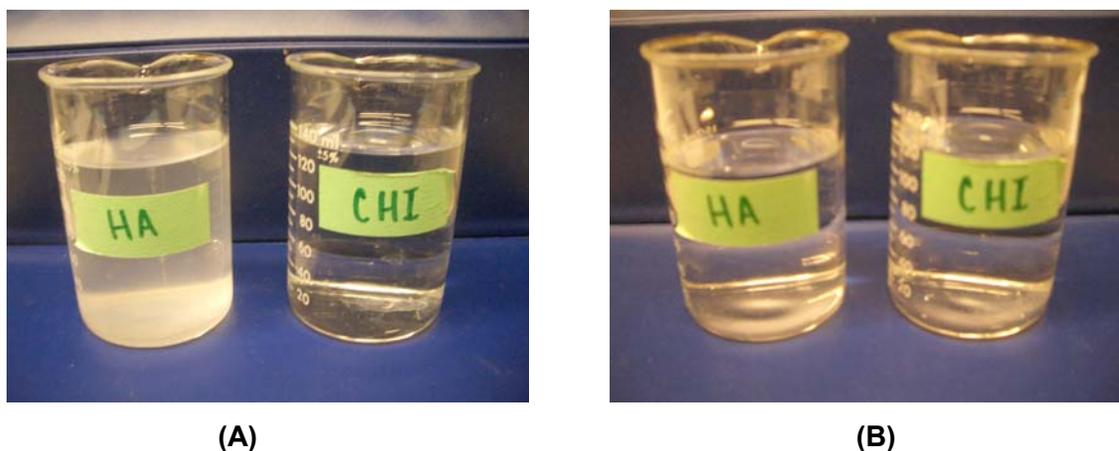
É importante destacar que pode haver uma complexação indesejável dentro dos recipientes das soluções poliméricas, gerando precipitados na solução, durante o preparo de filmes HA3/CHI6. A solubilidade da CHI em água com um pH próximo do seu  $pK_a \approx 6,0$  (em uma solução de 0,1 M ácido acético) pode ser problemática (CLELAND *et al.*, 1982, DENUZIERE *et al.*, 1996, LAČPÍK *et al.*, 1998). Isso foi observado quando as soluções de lavagem foram preparadas com o mesmo pH das soluções de polímeros. Em vista disso, as três soluções de lavagem para HA tiveram o pH ajustado para 3,0, e as soluções de lavagem para CHI tiveram o pH ajustado para 6,0.



**Figura 3.24.** Espessura e rugosidade de filmes de HA3/CHI6, 0 mM NaCl, depositados em *wafers* de Si recobertos com a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> em função do número de bicamadas. (média de 3 medidas: perfilometria)

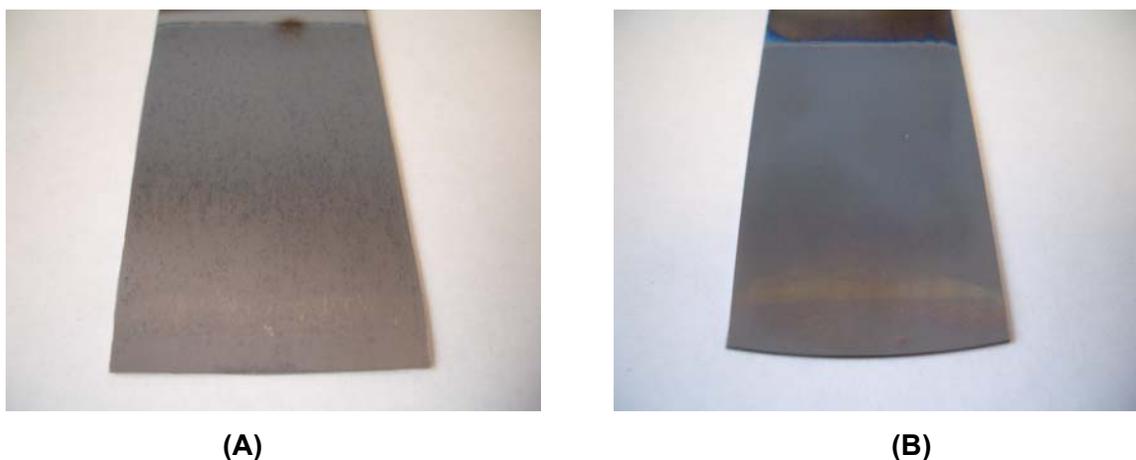
De fato, houve complexação na solução de HA, que pode ser observada na Figura 3.25(A), que mostra os béqueres contendo as soluções de HA e CHI após a deposição de 20 bicamadas. Os filmes produzidos nestas condições não apresentaram uniformidade devido à esta complexação. Já a Figura 3.25(B) mostra as soluções de HA e CHI após a deposição de

20 bicamadas, onde o pH das três soluções consecutivas de lavagem para CHI foram modificados para valores iguais à 6,0, 3,0, e 3,0, respectivamente. A contaminação/complexação na solução de HA não foi observada quando se utilizou pHs diferentes nas soluções de lavagem. Os filmes preparados foram significativamente mais uniformes, em comparação aos filmes da primeira tentativa, os quais foram analisados (Figura 3.26).



**Figura 3.25.** Béqueres contendo soluções de HA3 e CHI6 para a formação de PEMs, após a deposição de 20 bicamadas: (A) HA3 com três soluções de lavagem com pH 3,0, e CHI6 com todas as soluções de lavagem com pH 6,0; (A) HA3 com três soluções de lavagem com pH 3,0, e CHI6 com três lavagens consecutivas com pH 6,0, pH 3,0, e pH 3,0, respectivamente.

A Figura 3.26 mostra filmes de HA/CHI preparados com a escolha de parâmetros de deposição, como descrito acima.

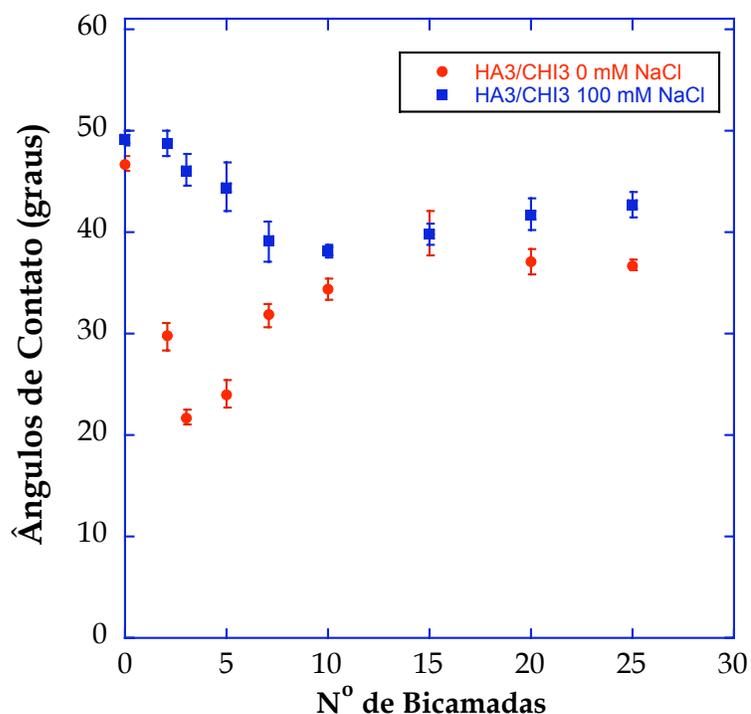


**Figura 3.26.** Filmes de  $(\text{HA3/CHI6})_{20}$  preparados com (A) todas as soluções de lavagem de CHI com pH 6,0, e (B) com uma solução de lavagem com pH 6,0, seguida de duas soluções de lavagem com pH 3,0 para CHI.

Observa-se, nitidamente, a olho nú, que o filme apresentado na Figura 3.26(B) é mais uniforme em comparação com filme apresentado na Figura 3.26(A).

### 3.3.2 Ângulo de Contato das PEMs de HA/CHI

A influência da presença de NaCl nas soluções poliméricas, para a produção das PEMs, também foi avaliada. Escolheu-se preparar as multicamadas com pH 3,0 para avaliar este efeito. A Figura 3.27 mostra ângulos de contato estáticos de água Milli-Q (pH 5,7) em função do número de bicamadas dos filmes de CHI3/HA3 depositados (na ausência e na presença de 100 mM NaCl) em lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>.



**Figura 3.27.** Ângulos de contato estáticos de água Milli-Q (pH 5,7) em filmes de CHI3/HA3 depositados (na ausência e na presença de 100 mM NaCl) em lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 7 medidas: goniômetro)

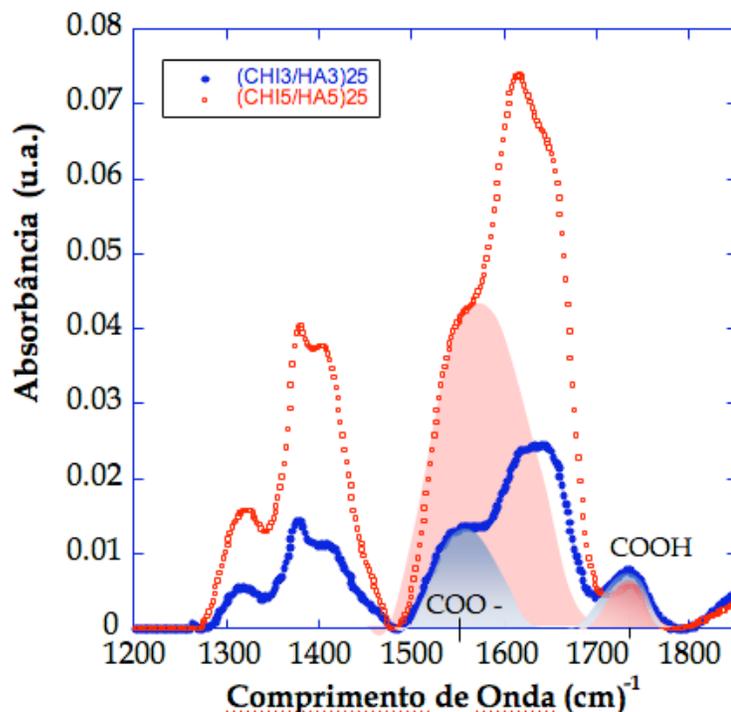
Observa-se que no caso da ausência do NaCl (curva vermelha), o ângulo de contato estático com água na superfície de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> decresce do valor aproximado, inicial, de 46°, para aproximadamente 22° após a deposição de 3 bicamadas de (HA3/CHI3). A partir desse ponto há uma reversão do processo, isto é, o ângulo de contato cresce em função do aumento do número de camadas depositadas, atingindo um patamar de saturação de aproximadamente 40° em 15 camadas, valor que decresce para aproximadamente 38° com 25

camadas. Nota-se que o valor dos ângulos de contato no intervalo entre 10 e 25 camadas depositadas, não difere muito. Acredita-se que a queda do ângulo de contato com a deposição de algumas bicamadas (i.e. 2, 3, 5, 7) é provavelmente devido à estrutura local dos filmes, com crescente hidrofiliçidade, no início da deposição, quando o crescimento da espessura do filme apresenta um comportamento exponencial. Quando o crescimento do filme passa a ser linear (após 10 bicamadas), os ângulos de contato se estabilizam. Ao contrário do que foi observado para PEMs de (HA3/CHI3) sem NaCl, as multicamadas de (HA3/CHI3) com 100 mM NaCl mostram um decréscimo menos pronunciado no valor do ângulo de contato em função do número de camadas depositadas. O valor aproximado de  $49^\circ$  - obtido na superfície de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> - decresce para  $38^\circ$  com a deposição de 10 bicamadas, onde atinge seu valor mínimo, passando a partir daí a crescer levemente atingindo um patamar de aproximadamente  $42^\circ$  em 25 camadas. Já que o ângulo de contato reflete a hidrofiliçidade de uma superfície, observa-se que filmes de (HA3/CHI3) preparados na ausência de sal são mais hidrofílicos em comparação aos filmes com NaCl. Esse comportamento é, provavelmente, também um reflexo das conformações dos polieletrólitos, nessas duas condições. Sabe-se que as PEMs depositadas são mais espessas e que apresentam um número maior de *loops* e *tails*, o que resulta em uma área superficial maior do filme, criando, conseqüentemente, uma maior exposição das partes hidrofóbicas das cadeias poliméricas, em particular do HA. Esse comportamento se deve à blindagem de cargas dos polieletrólitos pelo sal, resultando em uma redução da força de adesão entre os polímeros, da mesma forma em que a blindagem das cargas positivas da CHI, resulta em filmes mais hidrofóbicos em comparação aos filmes preparados na ausência de sal. Observações similares de comportamento de ângulos de contato também foram constatadas para filmes de (HA5/CHI5) sem e com NaCl, depositados em superfícies de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. Aparentemente, o ponto mínimo observado em medidas de ângulos de contato sugere a mudança do regime de crescimento do exponencial para o linear (10 bicamadas para este para ambos os casos HA3/CHI3 ou HA5/CHI5).

### 3.3.3 FTIR das PEMs de HA/CHI

As características dos filmes, tais como a apresentação de seus grupos funcionais no seu interior e na sua superfície, são importantes para se obter funcionalidades específicas, como interações com células, apresentação de propriedades hidrofílicas, hidrofóbicas, ou oleofóbicas, etc. Para se obter uma estimativa dos grupos de ácido carboxílicos protonados e desprotonados (COOH, COO<sup>-</sup>), presentes nas cadeias poliméricas do HA, assim como avaliação da influência do pH de deposição nas multicamadas resultantes, foi realizado um

estudo de FTIR dos filmes de (HA3/CHI3) e (HA5/CHI5) depositados em janelas de ZnSe, cujos resultados estão apresentados na Figura 3.28. Após a aquisição dos dados, as curvas do gráfico foram desconvoluídas, e as áreas das gaussianas relativas aos picos representativos dos grupos COOH (usualmente  $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ ; deslocada no gráfico para  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{COO}^-$  ( $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ ) foram calculadas e comparadas.



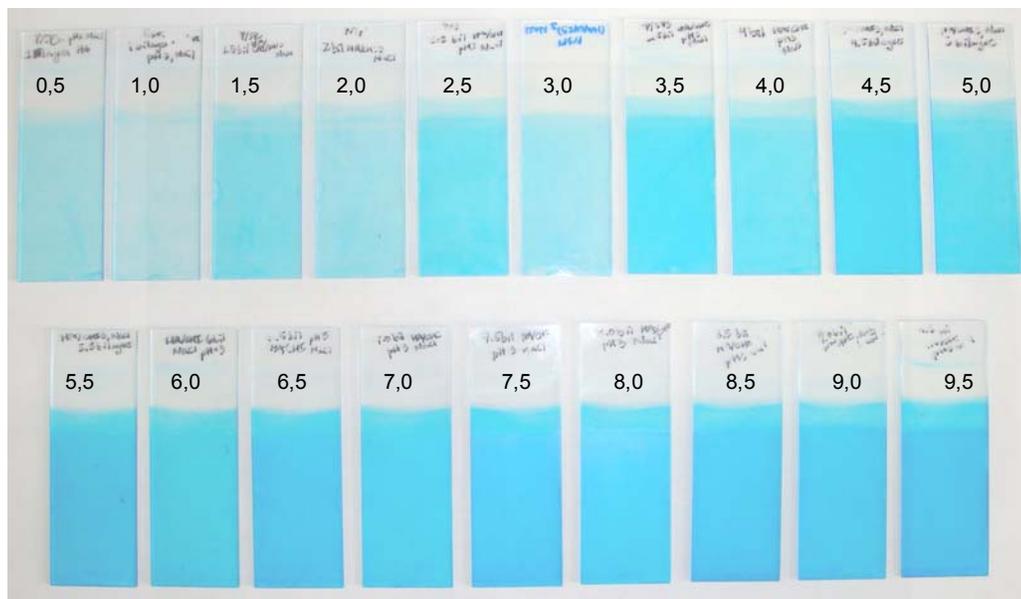
**Figura 3.28.** Absorbância (unidades arbitrárias) versus comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para filmes de  $(\text{CHI3/HA3})_{25}$  e  $(\text{CHI5/HA5})_{25}$  depositados sobre janelas de ZnSe.

O gráfico da Figura 3.28, mostra que as medidas de FTIR para filmes de  $(\text{HA3/CHI3})_{25}$  e  $(\text{HA5/CHI5})_{25}$ , depositados em substratos de ZnSe, indicam que aproximadamente 21% e 7% dos grupos de ácidos carboxílicos, presentes no HA (respectivamente para  $(\text{HA3/CHI3})_{25}$  e  $(\text{HA5/CHI5})_{25}$ ), estavam protonados. Isso sugere que existem mais segmentos de HA disponíveis, para interagir com outras biomacromoléculas, nas condições de preparo com pH 3,0.

### 3.3.4 Adsorção de Corantes e UV-Vis das PEMs de HA/CHI

Para uma avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais amino (da CHI) e de grupos ácidos carboxílicos livres (do HA), nas multicamadas, foram realizados testes com

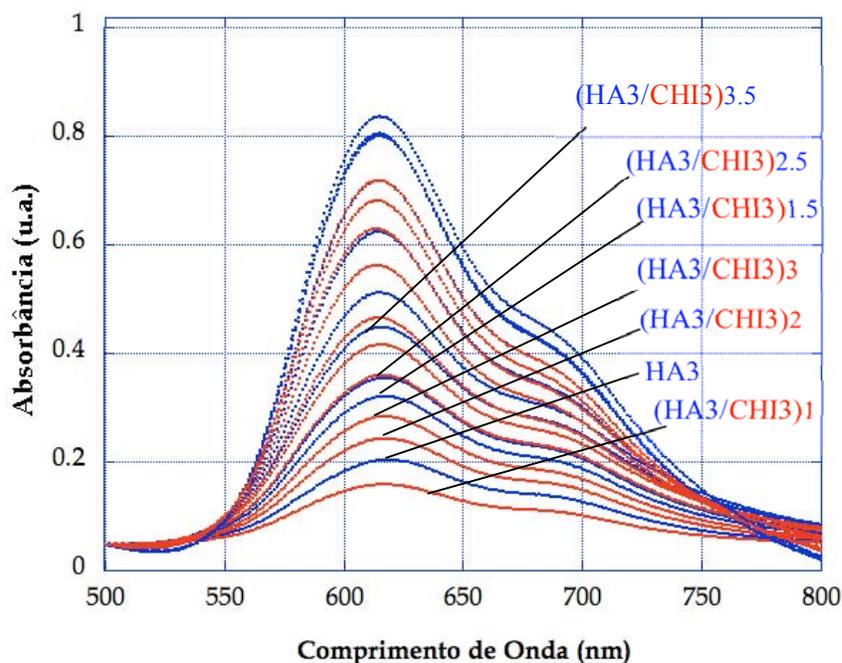
corantes específicos, juntamente com análises de espectroscopia UV-Vis. A Figura 3.29 mostra exemplos da incorporação do corante azul de alciano (específico para se ligar aos grupos ácidos carboxílicos desprotonados, presentes no HA), durante 15 min para todas as amostras de PEMs, em filmes de HA/CHI com 100 mM NaCl e a Figura 3.30 (normalizada no comprimento de onda = 500 nm) mostra as respectivas absorbâncias em função do número de camadas depositadas.



**Figura 3.29.** Imagens de lâminas de vidro contendo filmes de HA/CHI3, 100 mM NaCl, com a incorporação do corante azul de alciano em função do número de bicamadas (0,5 - 9,5) depositadas.

É importante destacar a alternância da intensidade do corante nos filmes de HA/CHI em função da última camada depositada, CHI versus HA, observado na Figura 3.29.

Como se observa na Fig. 3.30, o pico da absorbância do azul de alciano ( $\lambda = 617$  nm) é de aproximadamente 0,2 u.a. para uma única camada de ácido hialurônico depositado na pré-camada de PDAC/SPS. Com a deposição de uma camada de quitosana, observa-se que o pico se reduz para aproximadamente 0,15, o que significa que há também uma diminuição do número de ácidos carboxílicos livres no filme. A diminuição da cor azul com a deposição de uma camada adicional de CHI, sobre a camada de HA, é aparente como pode ser observado na Fig. 3.29.



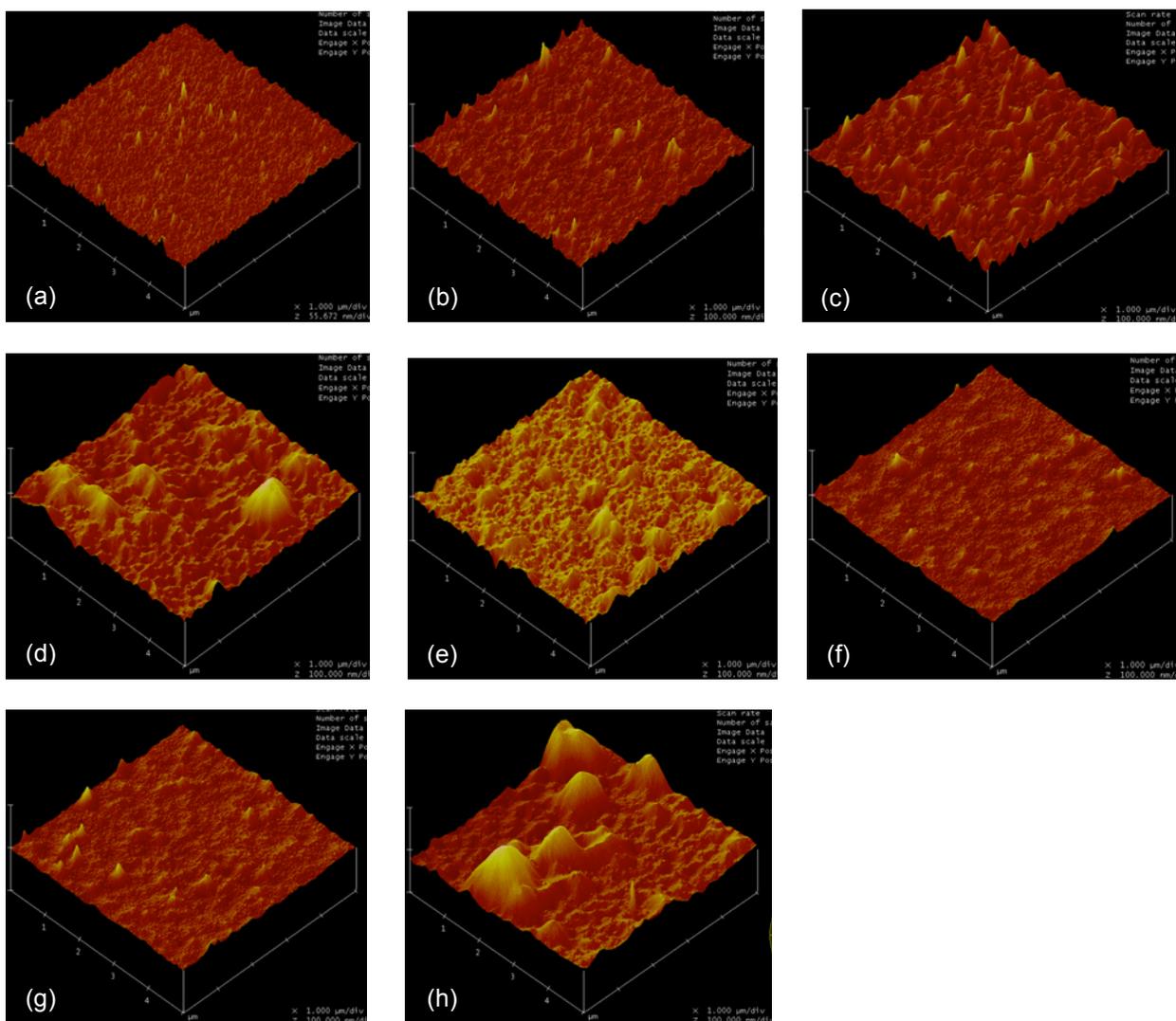
**Figura 3.30.** Absorbâncias de lâminas de vidro contendo filmes de HA3/CHI3, 100 mM NaCl, com a incorporação do corante azul de alciano, em função do número de bicamadas (0,5 - 9,5) depositadas.

Este comportamento - de uma maior absorbância de azul de alciano como consequência de uma camada adicional de HA (adição de grupos de ácidos carboxílicos) e de uma redução na intensidade da absorbância como consequência de uma camada adicional de CHI, (complexando e assim reduzindo o número de ácidos carboxílicos com a interação de grupos amino da CHI como camada final) - foi observado para todas as multicamadas preparadas. As curvas não identificadas na Figura 3.30 seguem a mesma escolha de notação daquelas identificadas, isto é, curvas vermelhas significando terminação com CHI e curvas azuis com terminação em HA, para as camadas subsequentes.

Uma parte complementar deste estudo está descrita no Capítulo 4, onde foram avaliadas as absorbâncias de corantes para grupos de ácidos carboxílicos (azul de alciano) e para grupos amino (rosa de bengala), para filmes de HA/CHI em diferentes condições de pH (3,0 versus 5,0) e de concentração de NaCl ( 0 mM versus 100 mM).

### 3.3.5 Microscopia de Força Atômica (MFA) das PEMs de HA/CHI

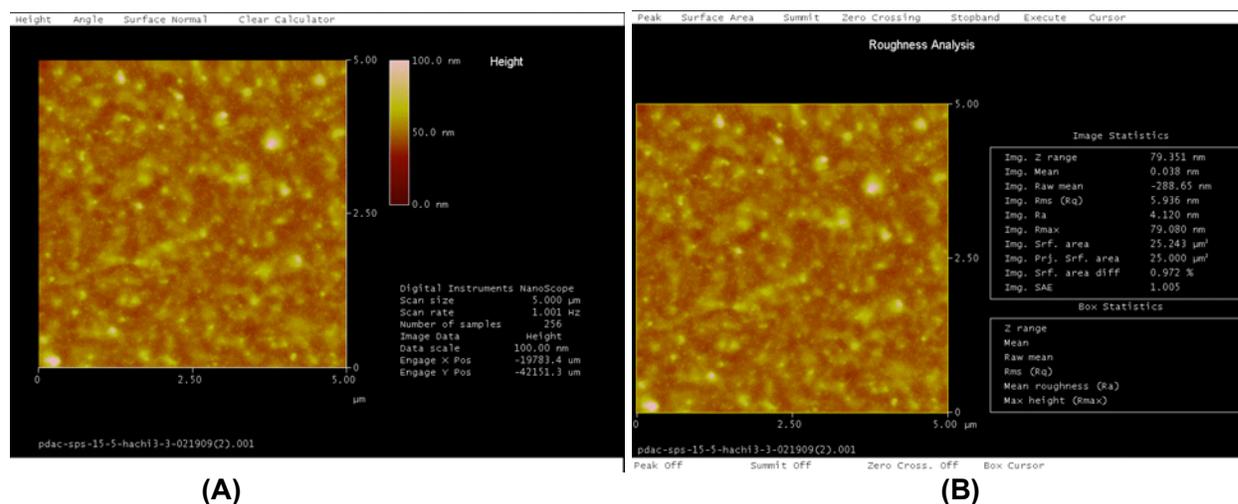
Filmes de HA/CHI, preparados com pH 3,0 ou 5,0, na ausência ou na presença de 100 mM NaCl, foram depositados na superfície da pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> e analisados com medidas de MFA. As análises foram realizadas em filmes secos. A Figura 3.31 apresenta imagens de MFA dos filmes analisados.



**Figura 3.31.** Imagens MFA (5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ ) de filmes de (a) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, (b) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, (c) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, (d) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, 100 mM NaCl, (e) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, 100 mM NaCl, (f) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3</sub>, (g) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3,5</sub>, (h) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3</sub>, 100 mM NaCl.

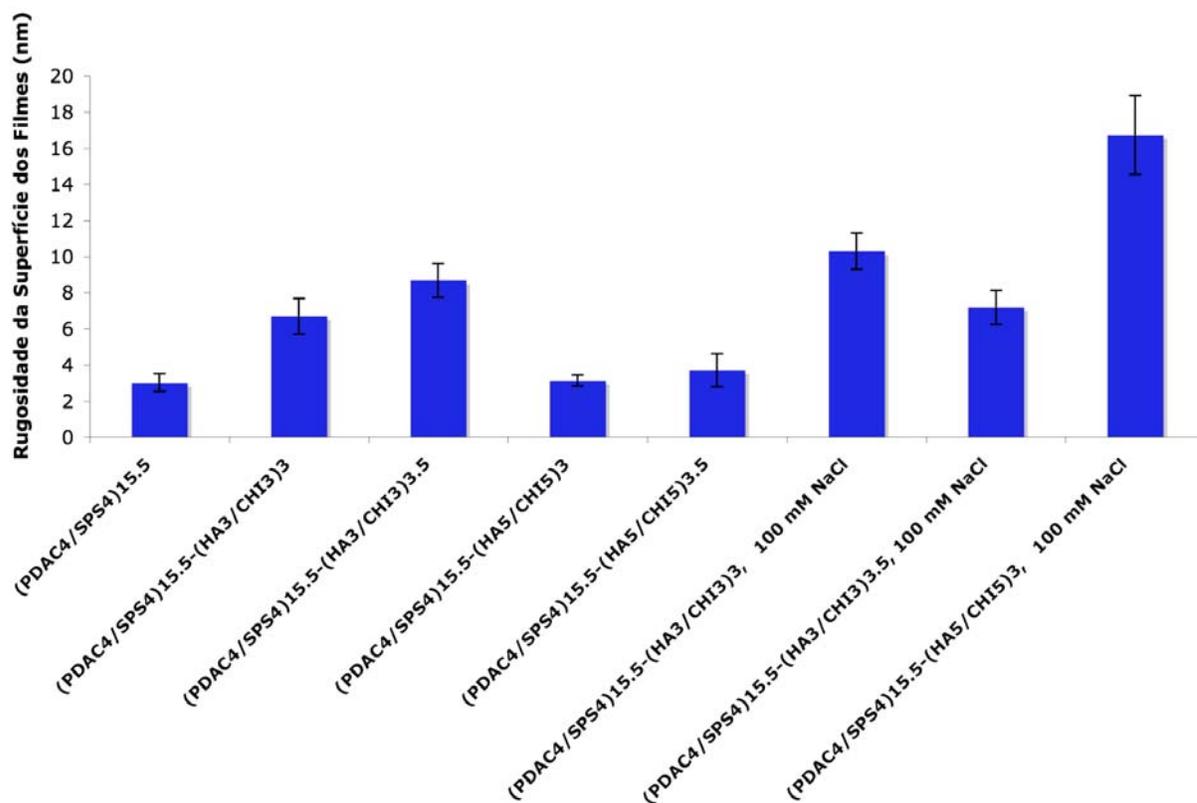
A pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> é caracterizada por uma superfície contendo um grande número de picos finos, baixos e alongados, resultando em uma rugosidade (*rms*) de aproximadamente 2 nm. A deposição das multicamadas de (HA3/CHI3)<sub>3</sub> e depois (HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, reduz o número de picos na superfície, porém aumenta a rugosidade (picos com tamanhos maiores). A presença de NaCl durante o processo de deposição tem grande influência na superfície resultante das PEMs, onde ocorre um aumento da rugosidade e um alisamento da superfície, com picos de formas mais arredondadas. A mudança de pH, de 3,0 para 5,0, também muda a superfície das PEMs. Filmes preparados com pH 5,0, na ausência de NaCl, apresentam superfícies mais lisas e com rugosidade comparável ou menor àquela observada nos filmes produzidos com pH 3,0. A presença de NaCl nas preparações com pH 5,0 aumenta consideravelmente o tamanho dos picos arredondados.

Imagens de MFA, contendo a altura e rugosidade para todas as amostras, foram exportadas em formato TIFF com o objetivo de realizar análises mais detalhadas. Como exemplo, a Figura 3.32 apresenta essa análise para o filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>.



**Figura 3.32.** Análise de MFA contendo (A) a altura e (B) a rugosidade para um filme de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>.

A rugosidade dos filmes, medida através de MFA, está apresentada na Figura 3.33.



**Figura 3.33.** Rugosidade dos filmes de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> e HA/CHI preparados com pH 3,0 e pH 5,0, com ou na ausência de 100 mM NaCl, nas soluções poliméricas (medidas efetuadas através de MFA).

Como se observa no gráfico da Figura 3.33, a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> apresentou uma rugosidade de aproximadamente  $3,0 \pm 0,5$  nm. A deposição de 3 bicamadas de HA3/CHI3 resultou em uma rugosidade de  $6,7 \pm 0,9$  nm, que corresponde a uma rugosidade 2,2 vezes maior em comparação com a rugosidade inicial da camada de (PDAC/SPS)<sub>15,5</sub>. A deposição de uma camada adicional de HA, no sistema (HA3/CHI3)<sub>3</sub>, aumentou a rugosidade da superfície em aproximadamente 1,96 nm, resultando em uma rugosidade de  $8,7 \pm 0,9$  nm. Observou-se que a rugosidade para filmes HA/CHI depositados com pH 5,0 foi significativamente menor em comparação aos filmes preparados com pH 3,0, onde filmes de HA5/CHI5 com 3 e 3,5 bicamadas apresentaram rugosidades de  $3,1 \pm 0,3$  and  $3,7 \pm 0,9$ , respectivamente. Em geral, a presença de 100 mM NaCl nas soluções de preparo resultou em filmes com uma rugosidade maior, em comparação aos filmes preparados na ausência de NaCl, exceto para o caso de pH 3,0, em que a rugosidade diminuiu cerca de 28% quando foi adicionada uma última camada HA, indo de  $10 \pm 1$  nm para  $7,2 \pm 0,9$  nm. Existe a possibilidade de que polímeros presentes dentro do filme de multicamadas possam estar difundindo para fora

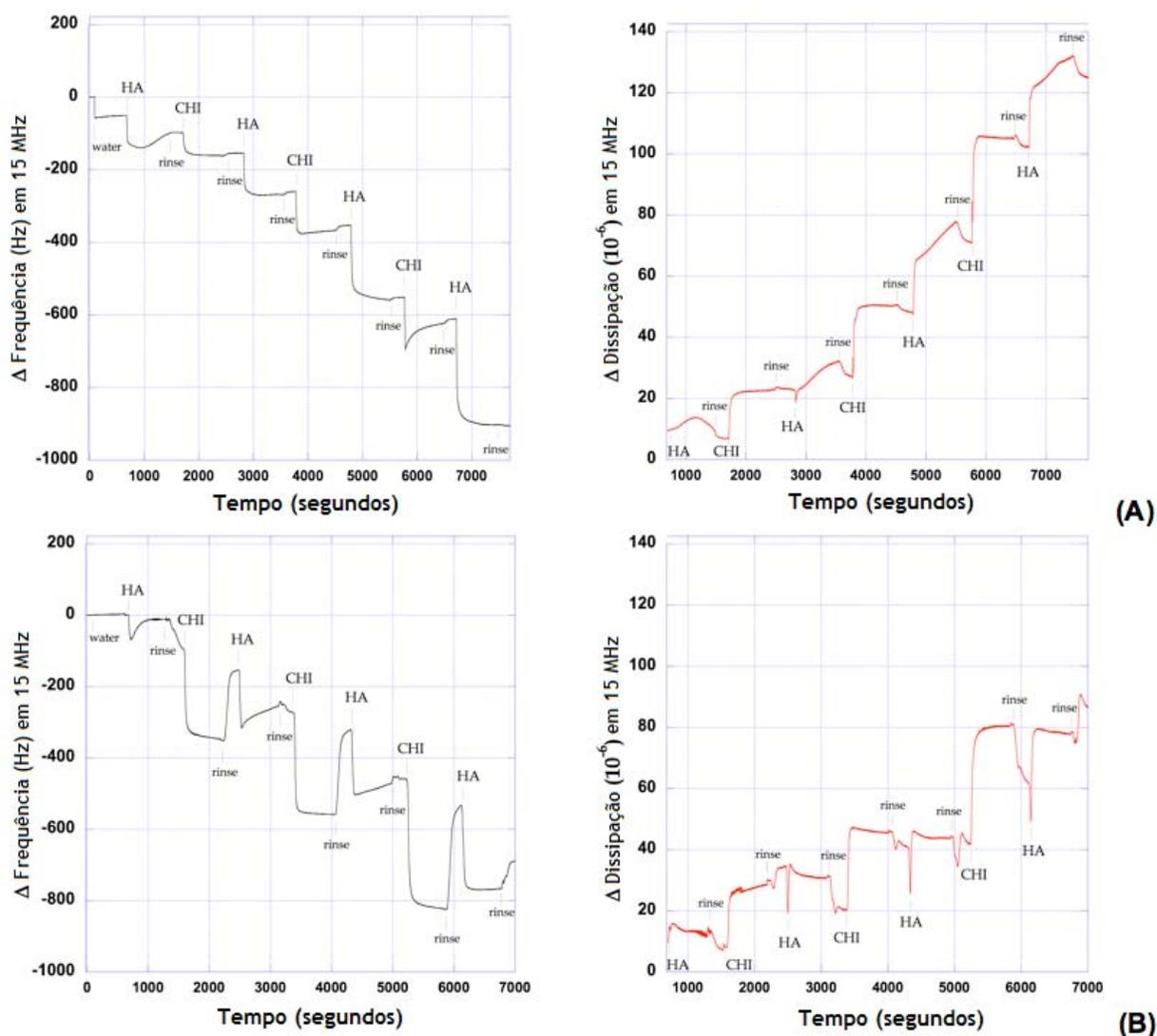
do filme, com a subsequente perda dos polímeros CHI e HA, como observado por Richert *et al.* (RICHERT *et al.*, 2004 A). Análises de perfilometria também apresentaram uma redução da espessura total do filme com a adição de uma camada de HA. Os filmes (HA3/CHI3)<sub>3</sub> com 100 mM NaCl apresentaram rugosidades de aproximadamente 54 % maiores, comparadas às dos filmes sem NaCl. Os filmes de (HA5/CHI5)<sub>3</sub> com 100 mM NaCl apresentaram os maiores valores de rugosidade dentre os filmes estudados (16,7 ± 2,2 nm). Estes filmes eram aproximadamente 62% mais rugosos do que os filmes preparados com pH 3,0.

### 3.3.6 QCM-D das PEMs de HA/CHI

A construção do filme de HA/CHI foi monitorada com uma microbalança de quartzo com dissipação (QCM-D) *in situ*. Para as medidas de QCM-D, uma redução na frequência é proporcional à massa depositada sobre a superfície, e um aumento na energia de dissipação indica uma redução do módulo elástico de cisalhamento do filme.

A Figura 3.34 mostra os dados de QCM-D para os filmes de HA/CHI depositados na ausência e na presença de 100 mM NaCl. As anotações de HA e CHI nos gráficos mostram o momento de adsorção destes polímeros - onde ocorre uma redução na frequência (o que indica um aumento de massa) - seguidos das etapas de lavagem (*rinse*).

A presença de NaCl tem uma grande influência no comportamento de deposição dos filmes de CHI/HA. A quantidade de polímero, adsorvida e removida, em cada etapa, aparenta ser maior para o processo que contém sal comparado com o que não contém. Aparentemente, uma quantidade maior de polímero adsorve sobre o mesmo número de bicamadas quando sal é utilizado - resultado da blindagem dos grupos iônicos dos polímeros, pelo sal. Quanto à parte mecânica dos filmes produzidos na presença de NaCl, esta parece não sofrer influência do HA, exibindo uma redução no módulo elástico somente quando em contato com a CHI. Filmes construídos sem sal mostram uma redução no módulo, em cada etapa de adsorção. Para a adsorção de HA existem, aparentemente, duas taxas de redução no módulo, enquanto que para CHI parece haver apenas uma redução, única e rápida. Em ambos os casos, sem e com sal, após as primeiras três bicamadas, cada deposição adicional resulta em uma variação de frequência maior, indicando uma crescente adsorção dos polímeros com o aumento do número de multicamadas. Estes resultados corroboram estudos, apresentados na literatura, para multicamadas de HA/CHI (KOVACEVIC *et al.*, 2002; RICHERT *et al.*, 2004 B).

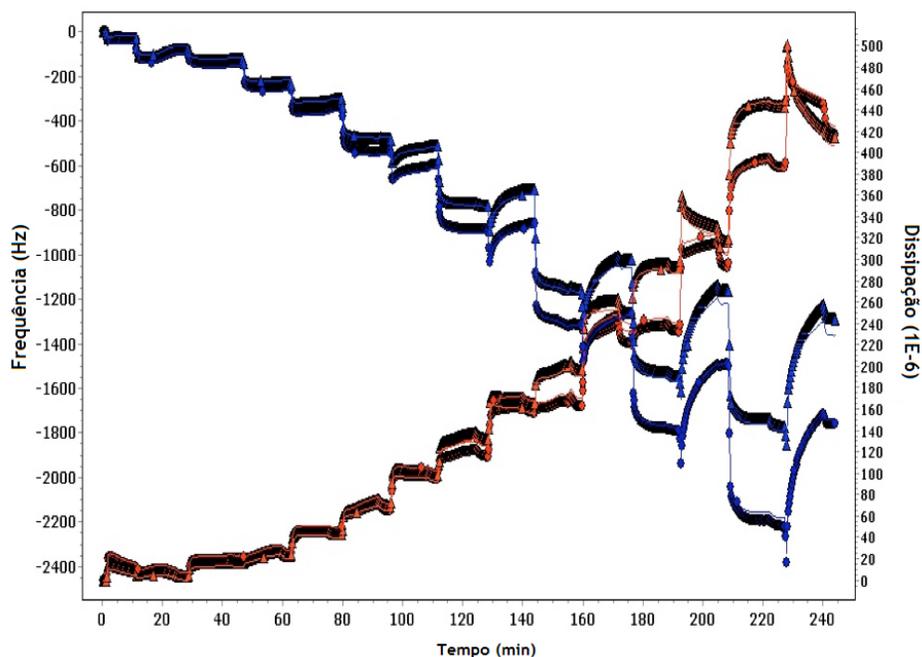


**Figura 3.34.** Dados de QCM-D (Frequência e Dissipação em função do tempo e número de camadas depositadas) de filmes de (HA3/CHI3) depositados com (A) 0 mM NaCl e, (B) 100 mM NaCl nas soluções poliméricas.

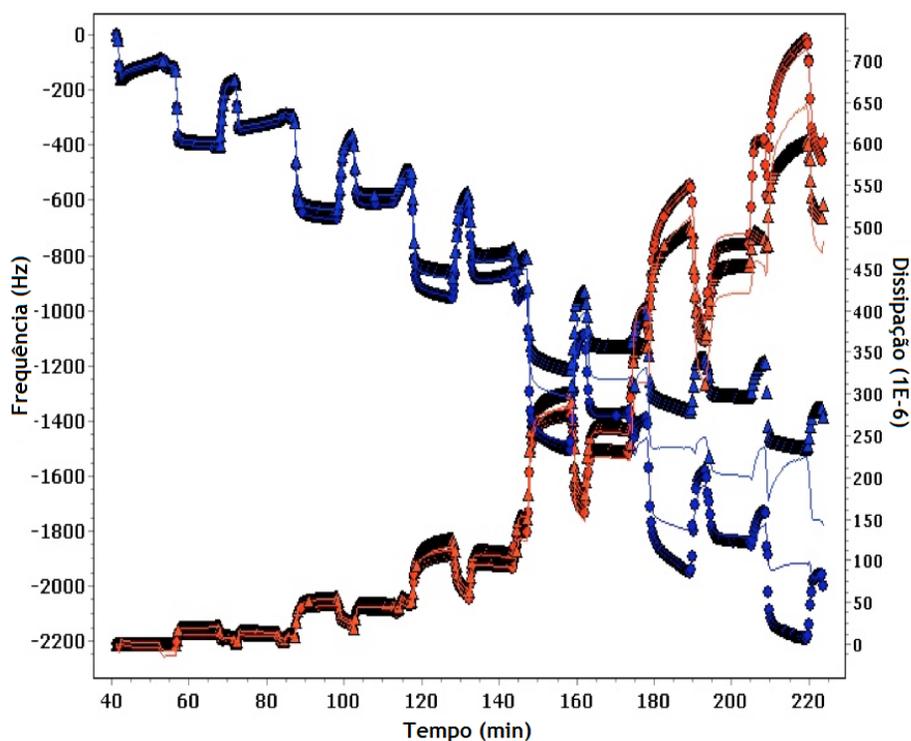
As medidas de dissipação de energia também mostram resultados significativamente diferentes para filmes construídos sem ou com 100 mM NaCl. Observa-se que para os filmes sem NaCl, após a primeira deposição de HA, todas as adsorções subsequentes de HA mostram um aumento na dissipação durante a etapa de adsorção, o qual acredita-se esteja relacionado com a hidratação da nova camada de HA sobre a superfície. Por outro lado, na adsorção de HA, para filmes com NaCl, observa-se um aumento rápido da dissipação, seguido por um decréscimo que eventualmente se estabiliza. A adsorção de CHI é similar na ausência e na presença de NaCl – a dissipação aumenta e rapidamente atinge um estado estacionário.

Durante as etapas de lavagem, os filmes preparados com NaCl apresentam um comportamento mais complexo na variação da energia de dissipação, onde grandes diminuições no parâmetro de dissipação indicam que existe a possibilidade da ocorrência de desidratação com subsequente enrijecimento de todo o filme (um colapso do filme). Dados de dissipação, para filmes preparados na ausência de NaCl, mostram que uma camada polimérica adicional resulta em um filme mais rígido. Esse comportamento não é sempre observado para os filmes na presença de NaCl, onde uma camada adicional de HA pode resultar em um filme ligeiramente menos rígido.

A modelagem dos parâmetros QCM-D para a deposição de sete bicamadas dos sistemas HA3/CHI3 – 0 mM NaCl e HA3/CHI3 – 100 mM NaCl, utilizando o 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> *overtones*, está representada nas Figuras 3.35 e 3.36, respectivamente.

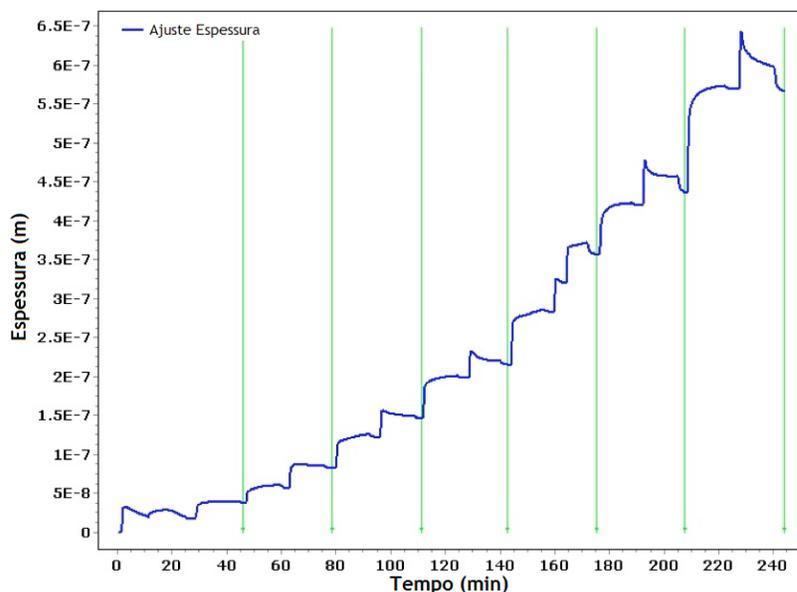


**Figura 3.35.** Modelagem (pontos pretos) das curvas de frequência (curva azul) e dissipação (curva vermelha) para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) sem NaCl.



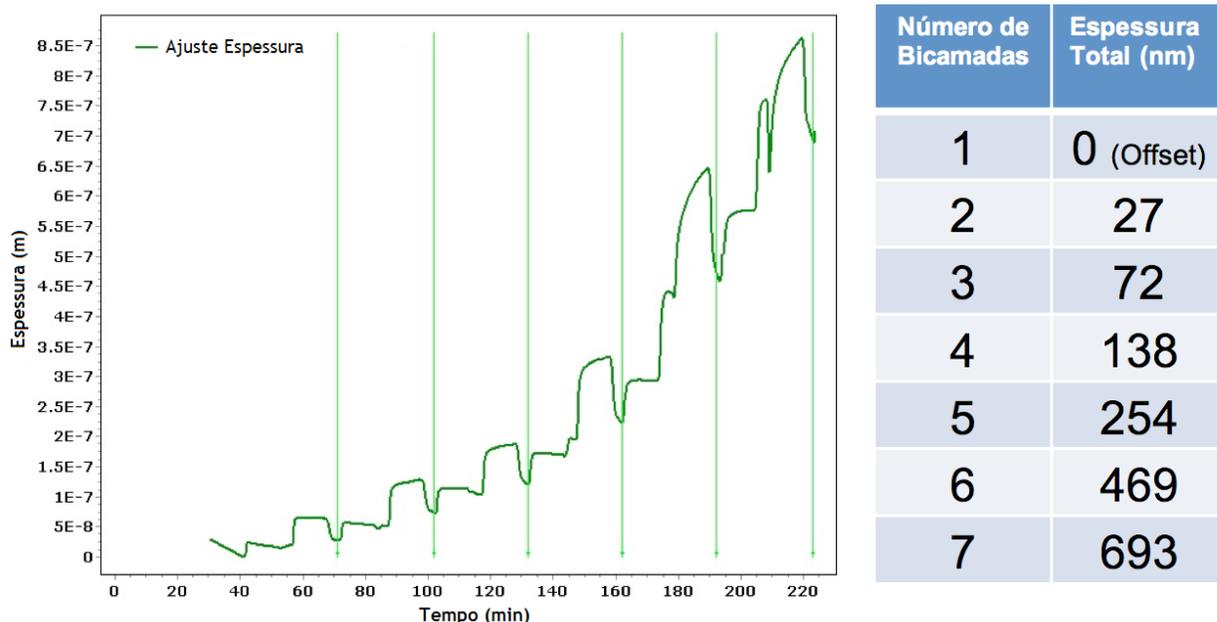
**Figura 3.36.** Modelagem (pontos pretos) das curvas de frequência (curva azul) e dissipação (curva vermelha) para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) com 100 mM NaCl.

A modelagem da espessura, através do modelo de Voigt, para o sistema de HA3/CHI3 – 0 mM NaCl e HA3/CHI3 – 100 mM NaCl está apresentada nas Figuras 3.37 e 3.38, respectivamente.



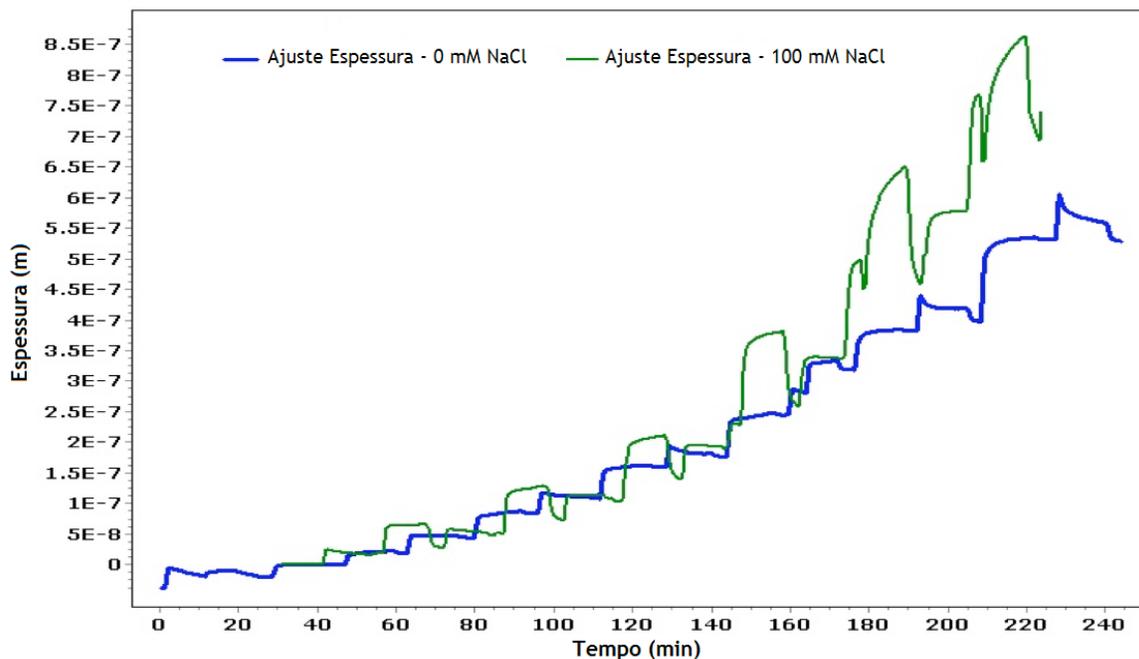
Número de Bicamadas	Espessura Total (nm)
1	38
2	83
3	146
4	215
5	357
6	436
7	566

**Figura 3.37.** Modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) sem NaCl.



**Figura 3.38.** Modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de 7 bicamadas de (HA3/CHI3) com 100 mM de NaCl.

A Figura 3.39 mostra a comparação das espessuras modeladas para os sistemas HA3/CHI3 sem e com 100 mM NaCl.



**Figura 3.39.** Comparação da modelagem de espessura para medidas de QCM-D para a deposição de sete bicamadas de (HA3/CHI3) com 100mM de NaCl (curva verde) e sem NaCl (curva azul).

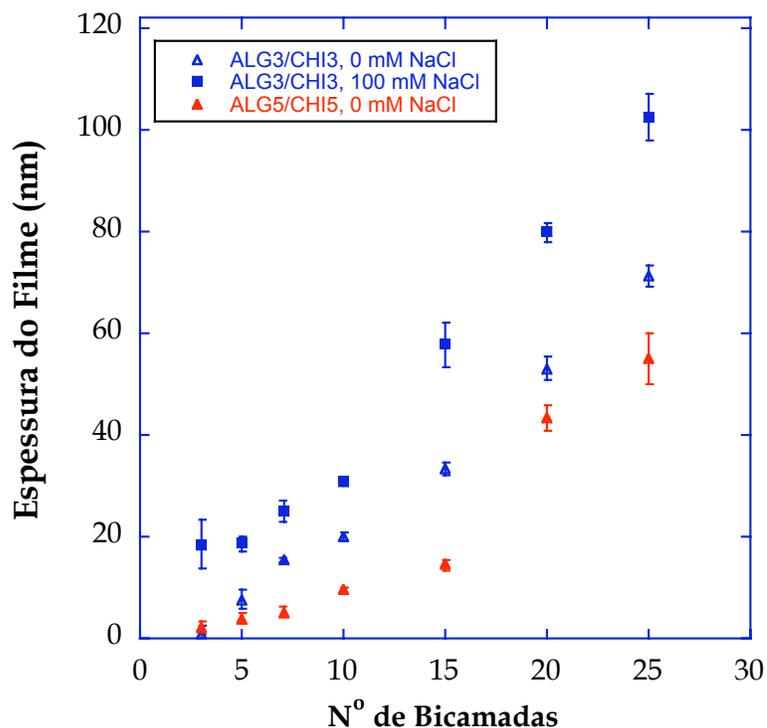
As estimativas feitas através do modelo de Voigt dão as espessuras médias do filme inteiro, incluindo qualquer líquido que esteja incorporado dentro do filme. Portanto, a massa analisada é a massa total (massa seca + líquido incorporado).

Especificamente, para as etapas subsequentes da adsorção de CHI, nas condições com 100 mM NaCl, a frequência aumenta durante a etapa de lavagem, indicando perda de massa ou perda de água. Este fenômeno pode ser devido a uma combinação de fatores. Possivelmente devido a efeitos do meio contínuo da solução (*bulk*), que significa que tanto a frequência, quanto a dissipação mudam devido à diferença das propriedades do meio contínuo da solução (*bulk*), e nesse caso, seriam semelhantes para os dois tipos de solução, onde a influência ocorre na superfície. Essa constatação poderia ser verificada fazendo uma corrida sobre um cristal sem recobrimentos, onde soluções de pH 3,0, sem e com NaCl (na ausência de polímeros) fossem analisadas no sistema QCM-D, uma após a outra. Caso houvesse uma mudança nos valores de frequência e dissipação alternando as soluções, isso indicaria que as duas soluções apresentam viscosidades e densidades diferentes que afetam os valores de frequência e dissipação. Esse comportamento também pode ser explicado pelo rearranjo das camadas poliméricas durante a etapa de lavagem. As cadeias poliméricas podem estar se rearranjando para encontrar a conformação mais favorável, e de mínima energia, quando estas são enxaguadas com uma solução sem a presença de NaCl. Esse processo também pode envolver a perda do líquido, presentes no interior do filme. Aparentemente as camadas poliméricas ficam com uma estrutura mais rígida durante o processo de lavagem, indicado pela diminuição dos valores da dissipação, assim como pela diminuição da separação entre várias curvas de *overtone*. Como último fator, pode estar havendo perda de polímeros que estão levemente adsorvidos no filme durante a etapa de enxágue, especialmente CHI, que é um polímero que tem a possibilidade de difusão dentro das PEMs. Estes experimentos também demonstram que a presença de NaCl promove o crescimento das PEMs.

### 3.3.7 Sistemas ALG/CHI e CMC/CHI

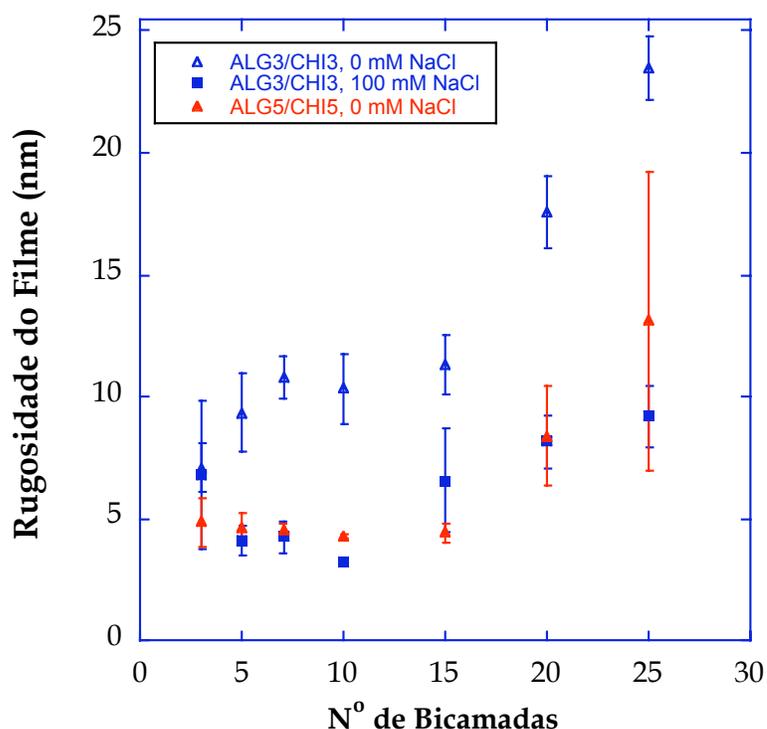
Além do sistema HA/CHI, dois outros sistemas de polímeros foram estudados, sendo eles os sistemas de ALG/CHI e CMC/CHI. A Figura 3.39 mostra curvas de crescimento para bicamadas de ALG e CHI depositadas sobre vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, nas condições de pH 3,0, na presença e ausência de 100 mM de NaCl nas soluções poliméricas, e de pH 5,0 na ausência de NaCl.

Observa-se que filmes de ALG3/CHI3 apresentam uma espessura maior em relação aos filmes preparados com pH 5. Como esperado, a presença de 100 mM NaCl resultou no aumento da espessuras dos filmes de ALG3/CHI3, repetindo o comportamento observado no sistema HA/CHI. Como comparação, é importante destacar que a espessura de um filme de  $(\text{ALG3/CHI3})_{25}$  + 100 mM NaCl (espessura de ~ 100 nm) é seis vezes menor do que a espessura de um filme de  $(\text{HA3/CHI3})_{25}$  + 100 mM NaCl (espessura de ~ 620 nm). Esse resultado é esperado pela diferença de tamanho dos polieletrólitos HA e ALG.



**Figura 3.40.** Espessura de PEMs de ALG/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM NaCl e com 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$ . (média de 3 medidas: perfilometria)

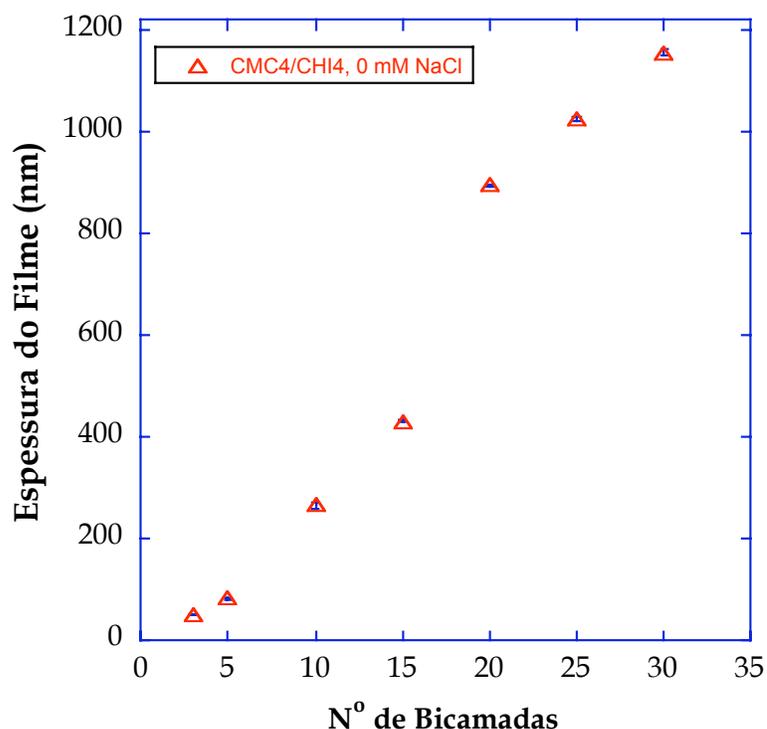
A Figura 3.41 mostra rugosidades para os filmes de ALG e CHI depositados sobre vidro- $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$  nas condições de pH 3,0 na ausência e na presença de 100 mM de NaCl nas soluções poliméricas, e de pH 5,0 na ausência de NaCl. Observa-se que filmes preparados com pH 3,0 apresentam uma maior rugosidade em comparação aos filmes preparados com pH 5,0. A presença de 100mM de NaCl na preparação de PEMs com pH 3,0 resultou na diminuição da rugosidade dos filmes de ALG3/CHI3.



**Figura 3.41.** Rugosidade de PEMs de ALG/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 3,0 e pH 5,0, 0 mM NaCl e 100 mM NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 3 medidas: perfilometria)

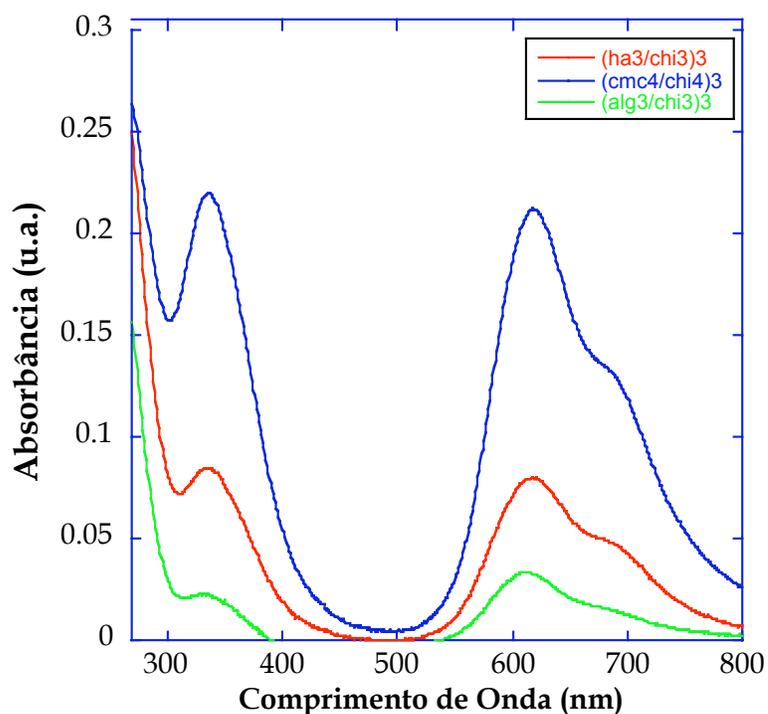
Filmes de CMC4/CHI4 também foram estudados. A Figura 3.42 mostra a curva de crescimento para bicamadas de CMC e CHI depositadas sobre vidro-(PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> nas condições de pH 4,0, na ausência de NaCl. Filmes de CMC4/CHI4 mostraram a menor variação de espessura em função do número de camadas depositadas.

Os filmes de CMC/CHI apresentam os menores valores de rugosidade dentre todos os filmes de PEMs estudados neste trabalho. Como exemplo, um filme de (CMC4/CHI4)<sub>5</sub>, com uma espessura de  $122,72 \pm 0,04$  nm apresentou uma rugosidade de apenas  $0,6 \pm 0,1$  nm (média de experimentos em triplicata), quando todos os demais filmes, estudados neste trabalho, apresentaram rugosidade na faixa de 3 a 17 nm, aproximadamente.



**Figura 3.42.** Espessura de PEMs de CMC/CHI em função do número de bicamadas, nas condições de pH 4,0, 0 NaCl, depositados sobre lâminas de vidro com uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. (média de 3 medidas: perfilometria)

Para se avaliar qualitativamente a quantidade de grupos de ácido carboxílicos livres presentes nos diferentes sistemas de PEMs, filmes de HA3/CHI3, CMC4/CHI4, e ALG3/CHI3, todos com 3 bicamadas, foram corados com azul de alciano e analisados espectroscopicamente. Todos os filmes foram imersos durante 15 minutos na solução de corante azul de alciano - tempo considerado suficiente para que os sistemas entrassem em equilíbrio - enxaguados com água Milli-Q, secos com nitrogênio, e analisados. A Figura 3.43 mostra, a absorvância na faixa de 300 a 800nm do azul de alciano. Observa-se que o filme que contém o maior número de grupos de ácido carboxílicos livres é o sistema de CMC4/CHI4, seguindo dos sistemas HA3/CHI3 e ALG3/CHI3. Este exemplo demonstra que a escolha dos componentes, assim como parâmetros de deposição, tal como variação no pH, pode ser utilizada para se obter uma propriedade específica das PEMs de interesse, neste caso, de disponibilidade de ácido carboxílicos livres e disponíveis para subsequentes reações.



**Figura 3.43.** Absorvância de azul de alciano (*alcian blue*) em filmes de  $(HA3/CHI3)_3$ ,  $(CMC4/CHI4)_3$  e  $(ALG3/CHI3)_3$ .

### 3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os testes acima descritos quanto à preparação e à caracterização de PEMs dos biopolímeros CHI, HA, ALG, e CMC foram fundamentais para planejar a fabricação de filmes com multicamadas, para aplicações específicas. A primeira aplicação envolveu a preparação de multicamadas de HA/CHI para adesão de linfócitos B, descrita no Capítulo 4. A segunda aplicação tratou da preparação de superfícies antibacterianas, também com multicamadas HA/CHI descrita no Capítulo 5. Ficou demonstrado que as características das superfícies receptoras da deposição das multicamadas são de grande importância, como observado na obtenção de PEMs mais uniformes quando depositados sobre uma pré-camada de PDAC/SPS. Foi observado que a presença de NaCl promove um maior crescimento das PEMs e que as PEMs de HA/CHI tem maior rugosidade em comparação aos PEMs de ALG/CHI e CMC/CHI. Observou-se que filmes de CMC/CHI apresentam uma presença maior de grupos funcionais de ácidos carboxílicos livres e disponíveis em comparação aos outros sistemas de ALG/CHI e HA/CHI.

## CAPÍTULO 4

### MULTICAMADAS DE POLIELETRÓLITOS PARA PROMOVER A IMOBILIZAÇÃO DE LINFÓCITOS B

Esse capítulo foi em parte adaptado do trabalho publicado: VASCONCELLOS *et al.*, 2010, intitulado “*Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: Hyaluronic Acid Mediated B Lymphocyte Adhesion*”, *Biomacromolecules*, 2010; 11(9): 2407-2414.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Estratégias para imobilizar células não-aderentes do sistema imune, em superfícies, são de grande interesse para estudos imunológicos fundamentais, fabricação de biossensores a base de células e aplicações de engenharia para o sistema imune. Poucos métodos de imobilização de células do sistema imune têm sido descritos na literatura (KIM *et al.*, 2004 A; KIM *et al.*, 2006). Kim e colaboradores apresentaram um método não-litográfico para se obter padrões de células B utilizando uma padronização microscópica de polímeros sintéticos, e utilizando interações específicas com anticorpos ou biotina-estreptavidina para a adesão das células B (KIM *et al.*, 2004 A). Esse método de imobilização foi estendido em um trabalho posterior onde micropoços de hidrogel padronizados, funcionalizados com anticorpos, foram fabricados para imobilizar células T para a detecção sensível de fragmentos de peptídeos e monitoramento de interações de células de linfócitos B e T (KIM *et al.*, 2006).

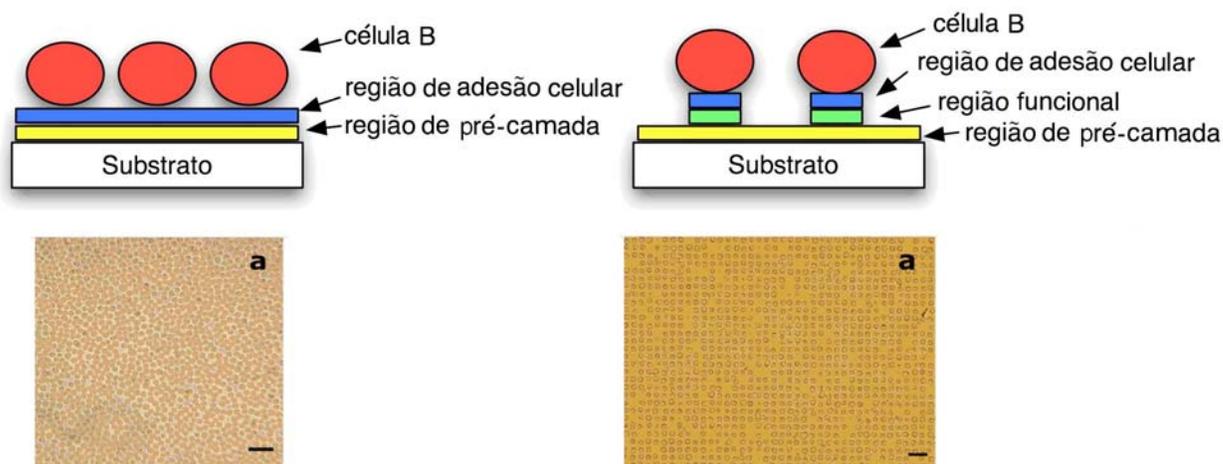
Resultados prévios de nosso grupo têm mostrado uma aplicação particular das multicamadas de polieletrólitos (PEMs) de biopolímeros, onde células B e T foram funcionalizadas com *patches* (espécie de “mochilas” à base de PEMs) celulares (SWISTON *et al.*, 2008). A adesão destes *patches* envolveu a interação mediada pelo receptor celular CD44 do linfócito com o ácido hialurônico, que foi depositado como a camada superior, exterior, da montagem do filme multicamadas. Esse estudo descreve filmes multicamadas de biopolímeros que promovem a adesão de linfócitos tipicamente não-aderentes às superfícies.

Estes filmes de PEMs foram preparados através da técnica de deposição *layer-by-layer* (LbL) – um método simples, versátil e economicamente viável para criar, modificar, e funcionalizar uma variedade de superfícies (DECHER, 1997). Polieletrólitos de biopolímeros

fracos são fortes candidatos para a preparação de PEMs devido a sua versatilidade em mudar suas propriedades de acordo com as condições externas (*tunability*) - obtida através da escolha das condições de preparo - e as suas propriedades de hidrofiliicidade, baixa toxicidade, bioatividade, biocompatibilidade, e biodegradabilidade (RICHERT *et al.*, 2004 A; ELBERT *et al.*, 1999; DENUZIERE *et al.*, 1998). A quitosana (CHI) e o ácido hialurônico (HA) são polissacarídeos naturais que apresentam estas propriedades desejáveis. CHI, um polícatión derivado do polímero natural quitina, tem sido utilizado em engenharia tecidual, liberação de fármacos, e aplicações antibacterianas (KUMAR *et al.*, 2004). HA, um poliânion natural de alta massa molecular, é também um ligante natural do CD44 - um receptor celular de superfície encontrado em vários tipos de células do sistema imunológico (UNDERHILL, 1992).

Vários estudos têm se preocupado em estudar a influência de condições de deposição como a presença de sais (DUBAS & SHLENOFF, 1999) e o pH das soluções de componentes e de lavagem (SHIRATORI & RUBNER, 2000) mudam a morfologia e características biológicas de filmes de PEMs para encapsulação (HILLBERG & TABRIZIAN, 2006; KROL *et al.*, 2005) ou adesão de células aderentes (ELBERT *et al.*, 1999; RICHERT *et al.*, 2004 A, 2002; KROL *et al.*, 2005; THIERRY *et al.*, 2003; CROLL *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2007 C; CHUA *et al.*, 2008; BERG *et al.*, 2004; MENDELSON *et al.*, 2002; KIDAMBI *et al.*, 2007). Diferentemente destes estudos - com células aderentes - o grupo de Rubner parece ter sido o único a estudar PEMs de CHI/HA para a adesão de células não-aderentes (SWISTON *et al.*, 2008, VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Nestes trabalhos ficou demonstrado que PEMs de HA/CHI podem ser utilizados para imobilizar linfócitos B não-aderentes, em uma superfície, utilizando-se o processo *layer-by-layer* de recobrimento versátil e uniforme dessa superfície com esses polieletrólitos.

A Figura 4.1 mostra desenhos esquemáticos da adesão de linfócitos B à superfície dos filmes, incluindo imagens ópticas uniformes e padronizadas desses filmes.



**Figura 4.1.** Desenhos esquemáticos e imagens ópticas da adesão de linfócitos B em filmes uniformes e padronizados (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010).

Parâmetros de deposição, tais como sal (0 mM ou 100 mM), pH (3,0 ou 5,0) e última camada polimérica depositada (HA versus CHI) foram sistematicamente ajustados para otimizar a eficiência de adesão via as interações CD44-HA.

O presente trabalho mostra duas condições importantes para uma adesão eficaz de células B em filmes de PEMs contendo HA. A primeira condição é que HA é necessário para a adesão proposta via o receptor CD44. A segunda, é que condições de deposição de HA, que favorecem *loops* e *tails* da cadeia polimérica de HA, tais como baixo pH e presença de sal NaCl nas soluções poliméricas do HA, resultam em um maior número de ligantes para a adesão de CD44, e portanto, contribuem para uma maior adesão das células B. Estas duas condições enfatizam que os fatores mais importantes, que afetam o potencial de adesão celular, são a apresentação e a configuração do HA em uma superfície, condições que são controladas durante a construção dos filmes PEMs, através da variação dos parâmetros das soluções de deposição (tais como a força iônica e o pH). Em outras palavras, a concepção destes filmes variando-se parâmetros das soluções utilizadas na deposição, permite que a eficiência de ligação *ex-vivo* seja modulada.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Materiais

O ácido hialurônico (HA, de *Streptococcus equi sp*, massa molecular  $\approx 1,63 \times 10^6$  g/mol), quitosana (CHI, baixo massa molecular  $M_w \approx 5 \times 10^4$  g/mol, 75-85 % desacetilada), alginato

(ALG, na forma de alginato de sódio, baixo massa molecular  $M_w \approx 12-19 \times 10^4$  g/mol), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC, fórmula molecular  $(C_8H_{16}ClN)_n$  médio massa molecular, 20% massa em solução aquosa), poliestireno sulfonato de sódio (SPS, fórmula molecular  $(C_8H_7NaO_3S)_n$ , massa molecular  $M_w \approx 7 \times 10^4$  g/mol), o hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH, fórmula molecular  $(C_3H_7N-HCl)_n$ , formulação em pó, massa molecular  $M_w \approx 56000$  g/mol com o marcador isotiocianato de fluoresceína (FITC, fórmula molecular  $C_{21}H_{11}NO_5S$ , massa molecular  $M_w \approx 389,4$  g/mol), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Os polímeros polimetil metacrilato (PMAA, fórmula molecular  $[-CH_2C(CH_3)(CO_2CH_3)-]_n$ , formulação em pó, massa molecular  $M_w \approx 100000$  g/mol) e o polímero poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm,  $C_6H_{11}NO$ , formulação em pó, massa molecular  $M_w \approx 258000$  g/mol) foram adquiridos da *PolySciences Inc.* (USA). Todos os polieletrólitos foram utilizados sem purificação prévia ao uso. As nanopartículas aniônicas superparamagnéticas (MNPs  $Fe_3O_4$  EMG 705, diâmetros de 13 nm, recobertas com uma camada lipídica para estabilização das nanopartículas em água) foram adquiridas da FerroTec (USA). O meio de cultura RPMI-1640 e a estreptomicina/penicilina (S/P, 5000 U.I./mL) foram adquiridos da CellGro Inc. (USA). O soro fetal bovino (FCS) foi adquirido da Hyclone (USA). A solução *Hank's balanced salt solution* (HBSS) foi adquirida da Gibco, Invitrogen (USA). A resina foto-resistente positiva S-1813 e a solução reveladora MF-319 foram adquiridas da MicroChem (Rohm & Hass, USA). Todos os reagentes eram de grau analítico e utilizados sem purificação. Linfócitos B CH27 foram gentilmente fornecidos pelo laboratório do Prof. Darrell J. Irvine, do Departamento de Ciência dos Materiais e Engenharia do MIT. Lâminas de vidro e *wafers* de silício <100> foram utilizados como substratos. Água de grau Milli-Q (Millipore) com uma resistividade de 18,2  $M\Omega \cdot cm$  foi utilizada para todas as soluções.

#### 4.2.2 Preparação de Substratos para Deposição LbL

A preparação dos substratos para a deposição LbL seguiu o procedimento descrito no *item 3.2.2.1*.

#### 4.2.3 Preparação de Soluções de Polieletrólitos e Nanopartículas

A preparação das soluções de PDAC, SPS, ALG, CHI, e HA seguiu o procedimento descrito no *item 3.2.2.2*. As soluções de PMAA e PNIPAAm foram preparadas com uma concentração de 0,01 M e pH 3,0. Soluções de nanopartículas superparamagnéticas (MNPs) foram preparadas com uma concentração de 0,005% p/v e pH 4,0.

#### 4.2.4 Montagem das PEMs

A preparação das multicamadas dos polieletrólitos de PDAC/SPS, ALG/CHI e HA/CHI seguiu o mesmo procedimento descrito no item 2.7.2.3. As regiões funcional ((MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>) e de descolamento ((PNIPAAm3/PMAA3)<sub>80,5</sub>), das PEMs, foram construídas com imersões estáticas utilizando um Zeiss HMS<sup>TM</sup> Series Programmable Slide Stainer (USA) (*static dipper*). As deposição de MNP e FITC-PAH foram realizadas durante 10 min, seguidas de três etapas de lavagem, consecutivas (2, 1, e 1 min), com água Milli-Q com pH 3,0. Para o sistema de (PNIPAAm/PMAA) as primeiras 20 bicamadas foram depositadas com a imersão dos substratos durante 10 min, seguida de duas lavagens com água Milli-Q com durações de 2 e 1 min, respectivamente. Após a deposição das primeiras 20 bicamadas de PNIPAAm/PMAA, as deposições subseqüentes destes polieletrólitos foram realizadas durante 2 min, seguidas de duas lavagens de 2 e 1 min, respectivamente.

#### 4.2.5 PEMs de HA/CHI para Adesão de Linfócitos

PEMs de HA/CHI para a adesão de linfócitos foram produzidas utilizando o equipamento *StratoSequence VI (spin dipper)* com *software StratoSmart v6.2* da *nanoStrata Inc.* (USA), para a deposição das camadas. As deposições de HA e CHI foram realizadas durante 10 min, sem rotação do porta-amostra. As três etapas de lavagens consecutivas (2, 1, e 1 min), com água Milli-Q, foram realizadas com rotação do porta-amostra a uma frequência de aproximadamente 100 rpm, mantendo os substratos imersos nas soluções.

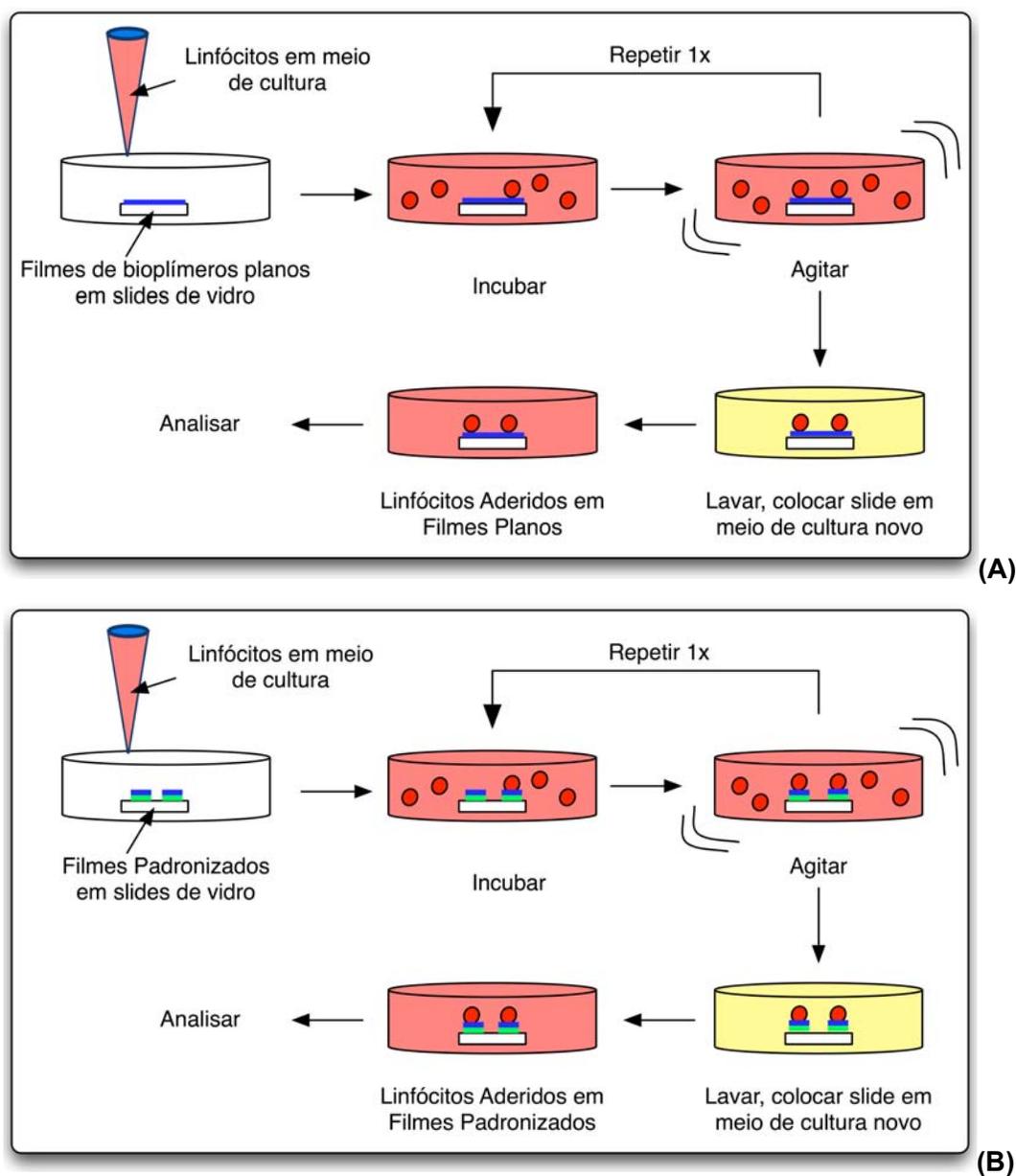
#### 4.2.6 Cultura de Linfócitos B CH27

Linfócitos B CH27 foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 com 10 % soro fetal bovino (FCS) e 1 % estreptomicina/penicilina (P/S), com passagens (diluições) de 1:10 (cultura de linfócitos : meio de cultura), a cada 3 dias. As culturas das células foram incubadas e mantidas a uma temperatura de 37°C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub>. Os experimentos de adesão foram realizados com alíquotas de células de 10<sup>6</sup> células/mL. As células foram lavadas em HBSS, três vezes, antes da etapa de adesão.

#### 4.2.7 Adesão de Linfócitos nas PEMs

Suspensões de linfócitos B (2 mL) foram cuidadosamente pipetados diretamente sobre as superfícies multicamadas de HA/CHI, ALG/CHI, ou PDAC/SPS, em placas Petri. As placas foram colocadas em uma plataforma vibratória (IKA Vibrax), dentro de uma incubadora. As

amostras foram incubadas durante 15 min e, em seguida, sujeitas a uma leve agitação durante 15 min. Esse procedimento foi repetido duas ou quatro vezes (durante 1 ou 2 horas), para promover a adesão celular. Imediatamente após as etapas de incubação/agitação, as amostras foram gentilmente lavadas com uma solução nova de HBSS, para remover células não aderidas à superfície. Após esta lavagem, as amostras foram colocadas em soluções completas de cultivo RPMI-1640 e imediatamente analisadas. Desenhos esquemáticos, ilustrando a adesão de linfócitos em filmes planos e em filmes padronizados, estão apresentados na Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Desenhos esquemáticos ilustrando a adesão de linfócitos em filmes de PEMs planos (A) e filmes padronizados (B) (esquemas ilustrativos adaptados de Swiston, 2009).

#### 4.2.8 Espessura e Rugosidade das PEMs

As espessuras e rugosidades de filmes secos foram medidas com um perfilômetro P-16+ (KLA Tencor Corporation, USA) utilizando-se os seguintes parâmetros: força aplicada 0,50 mg, taxa de amostragem 200 Hz, velocidade de varredura 50  $\mu\text{m/s}$ , e faixa/resolução de 131/0,0781 Å (angstroms).

#### 4.2.9 Espectroscopia UV-Visível

Grupos livres de ácidos carboxílicos de HA, presentes nas PEMs, foram tingidos através da imersão dos filmes em uma solução de azul de alciano (0,001 M, pH 3,0) durante 15 min. Após esta etapa, as lâminas foram enxaguadas extensivamente com água Milli-Q, pH 3,0, duas vezes, durante 2 min de cada vez. Os filmes foram secos com  $\text{N}_2$  e imediatamente analisados em um espectrofotômetro Cary 5E UV-Vis. Os picos de absorção do azul de alciano foram observados no comprimento de onda de 617 nm. Grupos livres de amônio presentes na CHI foram tingidos através da imersão das PEMs em uma solução de rosa de bengala (0,001 M, pH 7,0) em meio de cultura RPMI (com 25 mM HEPES, sem FCS, vermelho de fenol, ou S/P), durante 15 min. Após esta etapa, as lâminas foram enxaguadas extensivamente com água Milli-Q, pH 7,0, duas vezes, durante 2 min de cada vez. Os filmes foram secos com  $\text{N}_2$  e imediatamente analisados. Os picos de absorção para a rosa de bengala foram observados no comprimento de onda de 567 nm. Os filmes foram, também, imersos em água Milli-Q com o mesmo pH das suas respectivas soluções de deposição (pH 3,0 e pH 7,0), permanecendo imersos durante a noite, após o que, foram secos com  $\text{N}_2$  e medidos novamente. As medidas correspondem à absorção dos filmes depositados nas duas faces do substrato. As condições de pH, para os experimentos com os corantes, foram escolhidas para produzir efeitos de tingimento mais confiáveis e reproduzíveis para este sistema de multicamadas.

#### 4.2.10 Adesão de Linfócitos B

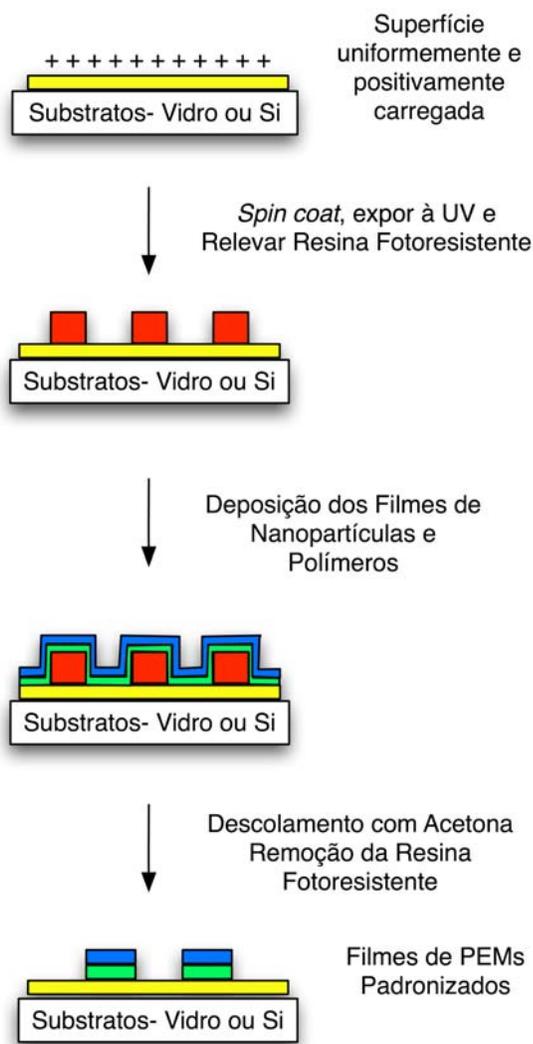
Filmes planos e filmes padronizados, com linfócitos B CH27 aderidos em suas superfícies, foram analisados com um microscópio óptico invertido Olympus IX-81. No mínimo, sete imagens, de cada amostra, foram analisadas. Foram determinados, o número total de células aderidas por unidade de área (# células/ $\text{cm}^2$ ) para os filmes planos e a percentagem dos sítios dos filmes padronizados ocupados com células.

#### 4.2.11 Filmes de PEMs Padronizados

O método de padronização de McShane e colaboradores (SHAIKH MOHAMMED *et al.*, 2006; 2004) e de Swiston *et al.* (SWISTON *et al.*, 2008) foi utilizado para criar multicamadas heteroestruturadas padronizadas. Esse processo utiliza uma abordagem foto-litográfica tradicional, de descolamento, para padronizar filmes poliméricos ultrafinos, como ilustrado esquematicamente na Figura 4.3. Lâminas de vidro ou de silício recobertos com (PDAC/SPS4)<sub>15,5</sub> foram utilizados como substrato catiônico.

Após a primeira etapa de lavagem, o substrato é recoberto com a resina foto-resistente S1813 (Rohm & Haas, MicroChem) – utilizando-se o equipamento *Headway spin coater* - enquanto está sendo rotacionado a uma frequência de 4000 rpm, durante 10 segundos, através de procedimento giratório (*spin coating*). Para a remoção do solvente presente na resina S1813, os substratos contendo a resina são colocados sobre uma placa quente e aquecidos a uma temperatura de 120°C, durante sete minutos. Em seguida, os substratos são expostos a raios UV (em um comprimento de onda de 365 nm e intensidade de ~7 mW/cm<sup>2</sup>), durante quatro minutos, utilizando-se a foto-máscara personalizada (foto-máscara de cromo em vidro) # 4 (*Advanced Reproductions*, USA). Foi utilizado um aparato de vácuo personalizado para colocar as lâminas recobertas com a resina foto-resistente, em contato direto com a foto-máscara. A revelação da resina foto-resistente foi realizada agitando levemente o substrato imerso em solução reveladora MF319, durante exatamente 40 segundos, seguida de enxágues extensos com água Milli-Q<sup>®</sup>. Após os enxágues, os substratos foram secos com um leve fluxo de nitrogênio.

As estruturas descritas acima foram fabricadas com uma região de (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub> situada entre a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> e as regiões de CHI/HA destinadas à adesão celular, ou com uma região adicional de (PMAA3/PNIPAAm3)<sub>80,5</sub> entre a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> e as regiões de (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub> – CHI/HA. As deposições das regiões de (PMAA3/PNIPAAm3)<sub>80,5</sub> e (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub> sobre a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, foram realizadas com um equipamento de imersão estático (*static dipper*) HMS da Zeiss. Duas etapas consecutivas de lavagem com água Milli-Q com pH 3,0, foram realizadas após cada etapa de deposição das regiões de (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub> e (PMAA3/PNIPAAm3)<sub>80,5</sub>. Após a deposição das 80,5 e/ou 9,5 bicamadas, dos respectivos filmes, as amostras foram secas em condições ambiente e estocadas ao abrigo da luz.



**Figura 4.3.** Ilustração esquemática do processo que utiliza uma abordagem tradicional foto-litográfica de descolamento para padronizar filmes poliméricos ultrafinos (adaptado de SWISTON *et. al.*, 2008)

Para construir a região de adesão dos linfócitos, a CHI foi depositada inicialmente na superfície de MNP negativamente carregada. As mesmas variações de pH, NaCl, e camada superior, utilizadas no estudo dos filmes planos, foram implementadas para avaliar a adesão dos linfócitos B aos filmes padronizados. A produção destes filmes de (CHI/HA) seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após a deposição das PEMs de interesse, a acetona foi utilizada para remover a foto-resina e obter filmes padronizados.

#### 4.2.12 Imagens e Nanoindentação com MFA

Medidas da topologia de superfície, rugosidade e módulo elástico efetivo de Young  $E$ , das multicamadas, foram determinadas com respostas de força-deslocamento adquiridas com

um microscópio de força atômica (3D *Molecular Force Probe*, Asylum Research, Santa Barbara, CA). Pontas de MFA (*cantilevers*) de nitreto de silício (MLCT-AUHW, Veeco Metrology Group, Sunnyvale, CA) foram utilizadas para endentar filmes de PEMs hidratados de HA3/CHI3, com um filtro limite, para manter as cargas iguais em cada endentação. O raio de curvatura da sonda  $R_p$  foi de  $\sim 20$  nm; constante de mola da ponta  $k$  foi nominalmente de 41,60 pN/nm. A nanoendentação foi realizada dentro de uma estrutura de isolamento acústico (*Herzan*, Inc.) à temperatura ambiente, em meio de cultura RPMI com 20 mM HEPES, sem fenol vermelho, FCS ou S/P. Os dados de força-profundidade de nanoendentação (média de 100 medidas independentes) foram analisadas com um programa *Matlab* (*MathWorks*) desenvolvido pelo grupo da Profa. Van Vliet e o módulo de Young  $E$  foi determinado de acordo com um modelo de contato Hertziano modificado. A aquisição da imagem no modo contato, com as mesmas pontas, foi realizada para comparar, qualitativamente, as morfologias de superfície em função das condições de montagem. Esta parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o aluno de doutorado, Adam S. Zieger, do grupo de pesquisa da Profa. Krystyn Van Vliet, do *Department of Materials Science and Engineering* do MIT.

#### 4.2.13 Descolamento das PEMs com Linfócitos B

O descolamento das PEMs com os linfócitos B foi realizado com a desintegração das camadas (PMAA3/PNIPAAm<sub>3</sub>)<sub>80,5</sub> com um aumento do pH do sistema (acima do pH crítico de aproximadamente 6,2), e uma redução de temperatura do sistema de 37°C para 4°C, seguindo-se o procedimento descrito por Swiston *et al.*, 2008. As multicamadas de (PMAA3/PNIPAAm<sub>3</sub>)<sub>80,5</sub> são construídas com ligações de hidrogênio, e como o PNIPAAm tem uma temperatura crítica inferior de solubilização (LCST) de 32°C, em água pura, abaixo desta temperatura o PNIPAAm prefere fazer ligações de hidrogênio com a água, e as multicamadas se dissolvem (SWISTON *et al.*, 2008).

#### 4.2.14 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM)

A técnica de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) permite a localização tridimensional de estruturas marcadas com fluoróforos (moléculas que absorvem e emitem luz), e fornece imagens de alta resolução.

Após o descolamento das PEMs dos substratos, os linfócitos B aderidos em multicamadas de (MNP4/FITC-PAH3)<sub>9,5</sub>-(CHI3/HA3)<sub>3</sub> + 100 mM NaCl, foram observados com microscopia confocal de varredura a laser. O microscópio utilizado para as análises foi o modelo

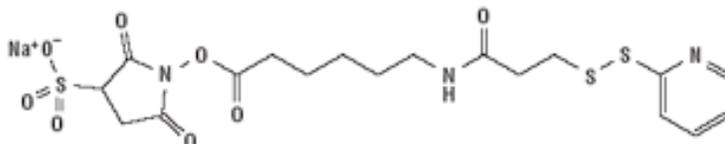
LSM-510, da *Carl Zeiss*, localizado no laboratório do Prof. Darrell J. Irvine, do *Department of Materials Science and Engineering* do MIT. Este microscópio é equipado com três canhões de laser: hélio/neônio 543 nm, hélio/neônio 633 nm, e argônio 458, 477, 488, e 514 nm.

#### 4.2.15 Viabilidade dos Linfócitos B

A viabilidade de linfócitos B foi observada com o tingimento dos linfócitos com uma solução de azul de tripano após serem mantidos incubados (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) em intervalos de 24, 48 e 72 horas. A expectativa de vida dos linfócitos, deste trabalho, era de três dias (72 horas).

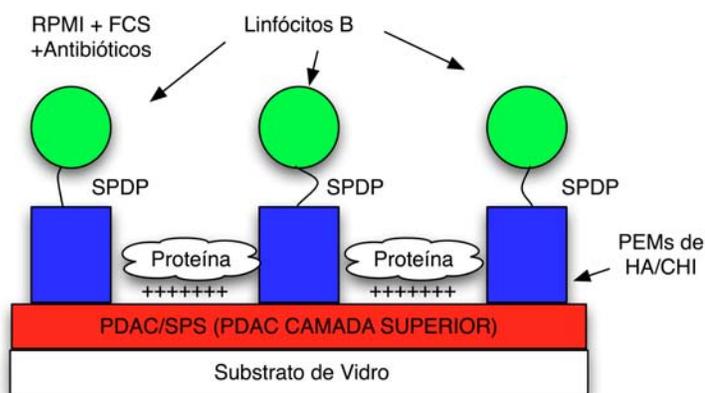
#### 4.2.16 Reação de PEMs com SPDP para Adesão de Linfócitos

O composto sulfo-LC-SPDP (agente reticulante heterobifuncional), Figura 4.4, utilizado para fazer uma ligação entre os filmes de PEMs de CHI/HA e os linfócitos, solúvel em água, foi preparado na concentração de 10 mM com água Milli-Q. A solução foi pipetada sobre as amostras das PEMs e o tempo de reação foi de 30 minutos.



**Figura 4.4.** Estrutura molecular do reticulante heterobifuncional sulfo-LC-SPDP.

A Figura 4.5 mostra esquematicamente a ligação entre os filmes de PEMs e os linfócitos, mediada pelo agente reticulante SPDP.



**Figura 4.5.** Desenho esquemático da ligação entre PEMs de HA/CHI e linfócitos B com SPDP – agente quelante.

Para verificar se a reação tinha sido efetiva, utilizou-se um marcador *SAMSA Fluorescein* (A-685), ((5-((2-(e-3)-S-(mercapto-acetil)succinil)amino) fluoresceína, massa molecular  $M_w \sim 521$  g/mol) da *Molecular Probes*. Dissolveu-se 10 mg do *SAMSA Fluorescein* em uma solução de 1 mL de 0,1 M NaOH à temperatura ambiente durante 15 min para remover o grupo protetor acetil, resultando em um composto de fluoresceína com um grupo tiol. Após a ativação do *SAMSA Fluorescein*, a solução foi neutralizada com uma solução de HCl concentrada (aproximadamente 14  $\mu$ L de uma solução de 6 M HCl) e com 0,2 mL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0. Esta solução contendo *SAMSA Fluorescein* foi pipetada sobre as amostras de PEMs-SPDP e reagidas durante 30 min, antes de serem lavadas com tampão fosfato pH 7,0 e imediatamente analisadas com microscopia óptica fluorescente.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Construção das PEMs para Adesão de Linfócitos

Dada a natureza de polieletrólito fraco (polieletrólitos onde a ionização dos grupos funcionais são altamente dependentes do pH) para ambos polímeros HA e CHI, é importante considerar os pHs das soluções utilizadas na preparação das multicamadas. O  $pK_a$  do HA em uma solução sem sal é aproximadamente 2,9, enquanto o  $pK_b$  da CHI é aproximadamente 6,0, quando dissolvida em uma solução aquosa com 0,1 M de ácido acético (DENUZIERE *et al.*, 1996; RINAUDO *et al.*, 1999; LACPÍK *et al.*, 1998; CLELAND *et al.*, 1982). Acima do pH 6,0, a solubilidade da CHI em água se torna problemática. Portanto, foram escolhidos os valores de pH 3,0 e 5,0 para as soluções. Para se promover a deposição uniforme das multicamadas, os substratos de vidro e de silício foram recobertos com uma pré-camada de um filme multicamada dos polieletrólitos fortes PDAC e SPS. A deposição das PEMs de biopolímeros foi iniciada com a adsorção do HA na superfície positivamente carregada do PDAC, seguida por deposições alternadas de CHI e HA. Adicionalmente às variações de pH das soluções (pH 3,0 versus pH 5,0), a concentração iônica das soluções de deposição também foi variada (0 mM versus 100 mM NaCl). Em geral, a espessura dos filmes aumentou com o aumento do número de etapas de deposição, segundo um comportamento não-linear, levemente exponencial (Figura 3.21, capítulo 3). Esse resultado corrobora observações de Picart e colaboradores (RICHERT *et al.*, 2004 A), que atribuíram esse mecanismo de crescimento exponencial com a capacidade de CHI penetrar e difundir-se para dentro e para fora do filme inteiro de HA/CHI, durante cada etapa de deposição. Estes autores também reportaram que HA é uma espécie que não se difunde

durante o processo de construção LbL de PEMs. Estudos recentes e detalhados sobre a construção de filmes de sistemas comparáveis aos dos filmes de HA/CHI também foram descritos por Porcel *et al.* (PORCEL *et al.*, 2006; PORCEL *et al.*, 2007).

A Tabela 4.1 apresenta os valores de espessura e rugosidade para PEMs de HA/CHI com 3,0 e 3,5 bicamadas depositadas sobre a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, nas diferentes condições de deposição examinadas neste trabalho. Quanto aos filmes construídos nas pré-camadas, observou-se que os filmes depositados diretamente em superfícies de vidro necessitavam de dez ou mais bicamadas para se tornarem uniformes. Filmes com 3,0 e 3,5 bicamadas têm, respectivamente, CHI e HA como última camada depositada. Como esperado (DUBAS & SCHLENOFF, 1999), a adição de 100 mM de NaCl, nas soluções de imersão, geralmente resultou em um aumento da espessura do filme. Além dos efeitos de *screening* (blindagem) de cargas, a presença do sal promove a inter-difusão e mobilidade de polímeros com cargas opostas, presentes no interior de um filme (RICHERT *et al.*, 2004 B; DUBAS & SCHLENOFF, 2001), o que resulta em filmes mais espessos, segundo o modelo de crescimento adotado pelos autores (RICHERT *et al.*, 2004 A).

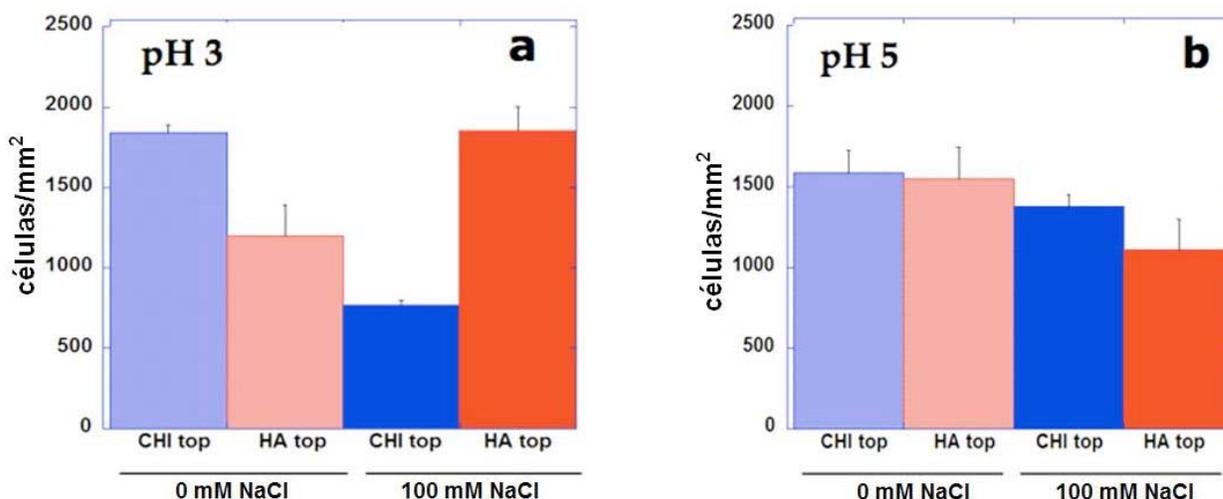
**Tabela 4.1.** Valores de espessura e rugosidade de filmes de HA/CHI com 3,0 e 3,5 camadas depositados sobre uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>. A média foi obtida com sete medidas, cada uma delas, realizada em sete replicatas.

Filmes de PEMs de Biopolímeros	Concentração de Sal (mM NaCl)	Espessura (nm)	Rugosidade RMS (nm)	Última camada de polímero
(HA3/CHI3)3	0	17 ± 2	1,9 ± 0,3	Quitosana
(HA3/CHI3)3,5	0	37 ± 1	3,6 ± 0,6	Ácido hialurônico
(HA3/CHI3)3	100	27 ± 2	2,3 ± 0,3	Quitosana
(HA3/CHI3)3,5	100	42 ± 2	3,3 ± 0,3	Ácido hialurônico
(HA5/CHI5)3	0	42 ± 3	7 ± 1	Quitosana
(HA5/CHI5)3,5	0	43 ± 3	8 ± 1	Ácido hialurônico
(HA5/CHI5)3	100	39 ± 4	4,9 ± 0,7	Quitosana
(HA5/CHI5)3,5	100	49 ± 3	10 ± 1	Ácido hialurônico

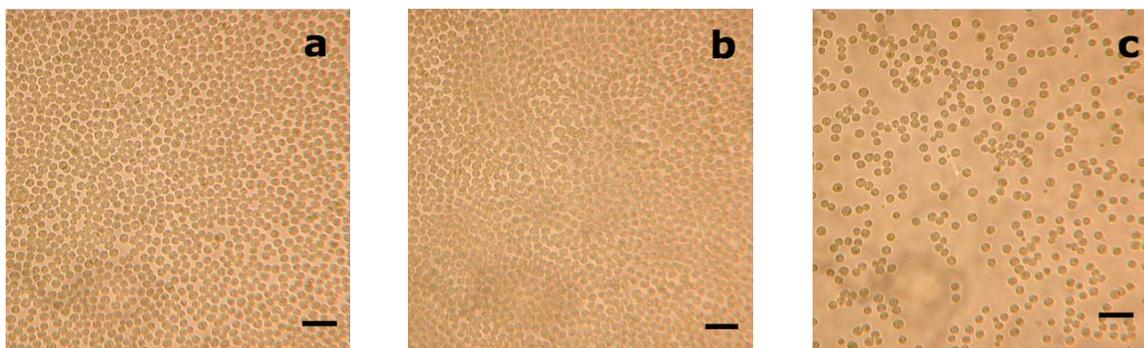
#### 4.3.2 Adesão de Linfócitos B CH27

A Figura 4.6 resume as tendências de adesão dos linfócitos B em filmes planos de HA/CHI preparados com as condições de pH (3,0 ou 5,0) e de sal (0 mM ou 100 mM NaCl).

Micrografias ópticas de células B aderindo em filmes de PEMs estão apresentadas na Figura 4.7. Para as PEMs preparados com pH 3,0, a concentração de NaCl e o polímero depositado por último modulam a adesão dos linfócitos B, em uma faixa relativamente grande. Entretanto, filmes multicamadas construídos com pH 5,0 exibiram, de maneira geral, uma eficiência de adesão menos sensível ao pH, ao NaCl, e ao polímero da última camada depositada. Altas eficiências de adesão foram observadas para filmes construídos com pH 3,0, para ambos os casos, isto é, quando a camada final foi de HA (com  $1850 \pm 150$  células/mm<sup>2</sup>) e quando a camada final foi de CHI (com  $1840 \pm 50$  células/mm<sup>2</sup>). Isso significa que mesmo no caso em que CHI é depositada por último, existe uma quantidade suficiente de ligantes para promover a adesão dos linfócitos na superfície do filme. Os dois filmes com a menor eficiência de adesão celular, (HA3/CHI3)<sub>3,5</sub> depositado na ausência de NaCl e (HA3/CHI3)<sub>3</sub> depositado com 100 mM NaCl, aderem células nas razões de  $1200 \pm 200$  células/mm<sup>2</sup> and  $770 \pm 25$  células/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Estes resultados demonstram que variações significativas na taxa de adesão dos linfócitos B em multicamadas de CHI/HA podem ser realizadas através de mudanças, facilmente controladas, dos parâmetros de processamento das multicamadas, tais como: pH, sal, e última camada polimérica do filme.



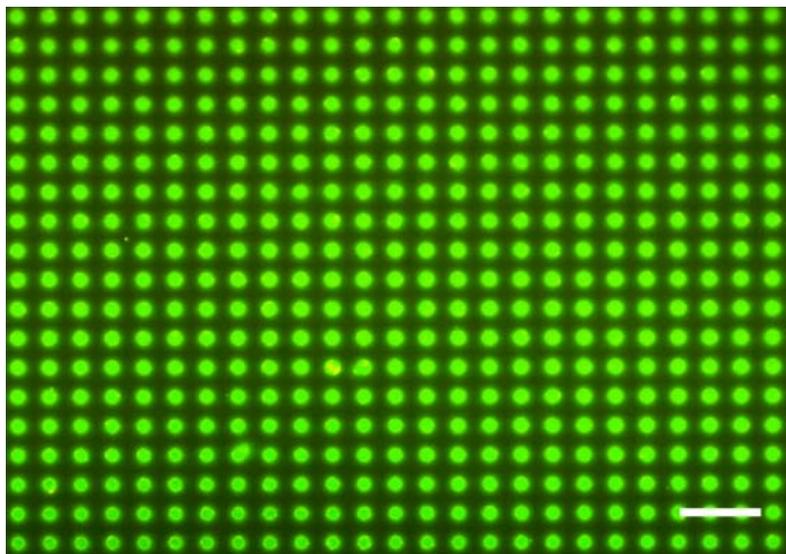
**Figura 4.6.** Adesão de linfócitos B em filmes de (a) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,x</sub> e (b) (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA5/CHI5)<sub>3,x</sub>, para x=0 ou 5. Barras de erro correspondem ao erro padrão da média da amostra, para 7 medidas independentes em 7 replicatas. (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)



**Figura 4.7.** Micrografias ópticas de linfócitos B aderidos em filmes de (a)  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}-(HA3/CHI3)_{3,5}$  construído com 100 mM NaCl (a PEM com a maior adesão de linfócitos), (b)  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}-(HA3/CHI3)_3$  construído sem NaCl (o segundo melhor sistema de adesão), e (c)  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}-(HA3/CHI3)_3$  construído com 100 mM NaCl (PEM com a menos eficiente adesão). Escala = 50  $\mu$ m. (adaptada de Vasconcellos *et al.*, 2010)

#### 4.3.3 Adesão de Linfócitos em Filmes de PEMs Padronizados

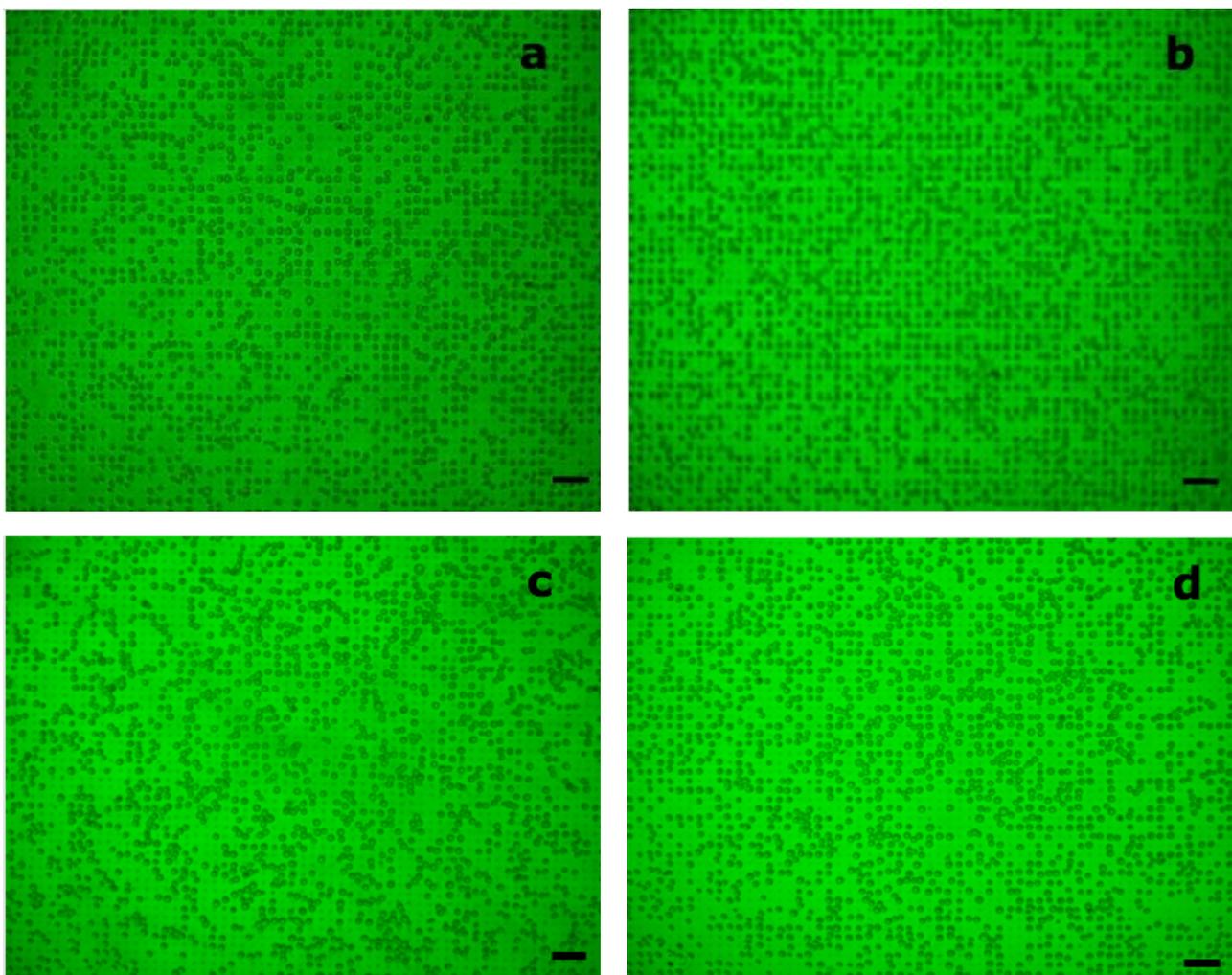
Além dos filmes de PEMs planos, filmes de PEMs padronizados, depositados na forma cilíndrica (*posts*) de 7  $\mu$ m de diâmetro (Figura 4.8), foram fabricados usando a técnica fotolitográfica de descolamento (SWISTON *et al.*, 2008; SHAIKH MOHAMMED *et al.*, 2004; SHAIKH MOHAMMED *et al.*, 2006). Os experimentos com filmes padronizados foram utilizados para quantificar, de uma maneira mais controlada, o número de células aderidas em um sistema específico de multicamadas. As composições destes filmes foram:  $(MNP4/FITC-PAH3)_{9,5}(CHI3/HA3)_x$  para  $x = 3$  ou 3,5. É importante destacar que para 3 bicamadas o ácido hialurônico é depositado por último, e para 3,5 bicamadas, a quitosana é depositada por último, o que corresponde ao inverso da notação utilizada para os filmes não-padronizados mencionados acima. As duas regiões de  $(MNP4/FITC-PAH3)_{9,5}$  e  $(CHI3/HA3)_x$  se mantiveram intactas durante a etapa de descolamento da resina foto-resistente e ambas as partes mantiveram as suas funcionalidades após a fabricação. A região de  $(MNP4/FITC-PAH3)_{9,5}$  foi escolhida devido a sua utilidade para a visualização, facilitada pelas partículas fluorescentes e à experiência do grupo em padronizar este sistema de filmes (SWISTON *et al.*, 2008).



**Figura 4.8.** Imagem fluorescente de um filme padronizado de  $(MNP4/FITC-PAH3)_{9,5}(CHI3/HA3)_3$  construído com 100 mM NaCl. Escala = 50  $\mu\text{m}$ . (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)

Linfócitos B, dispersos no meio de cultura RPMI, à temperatura de 37°C, foram pipetados sobre lâminas padronizadas com PEMs em forma de cilindros e incubados durante 1 ou 2 horas, com uma leve agitação intermitente. Após a etapa de adesão das células e a etapa de incubação, as lâminas foram lavadas com uma solução de *Hank's balanced salt solution* (HBSS). A Figura 4.9 apresenta exemplos típicos dos linfócitos B aderidos aos filmes multicamadas padronizados, com terminação de HA e CHI, depositados na ausência de NaCl e com NaCl.

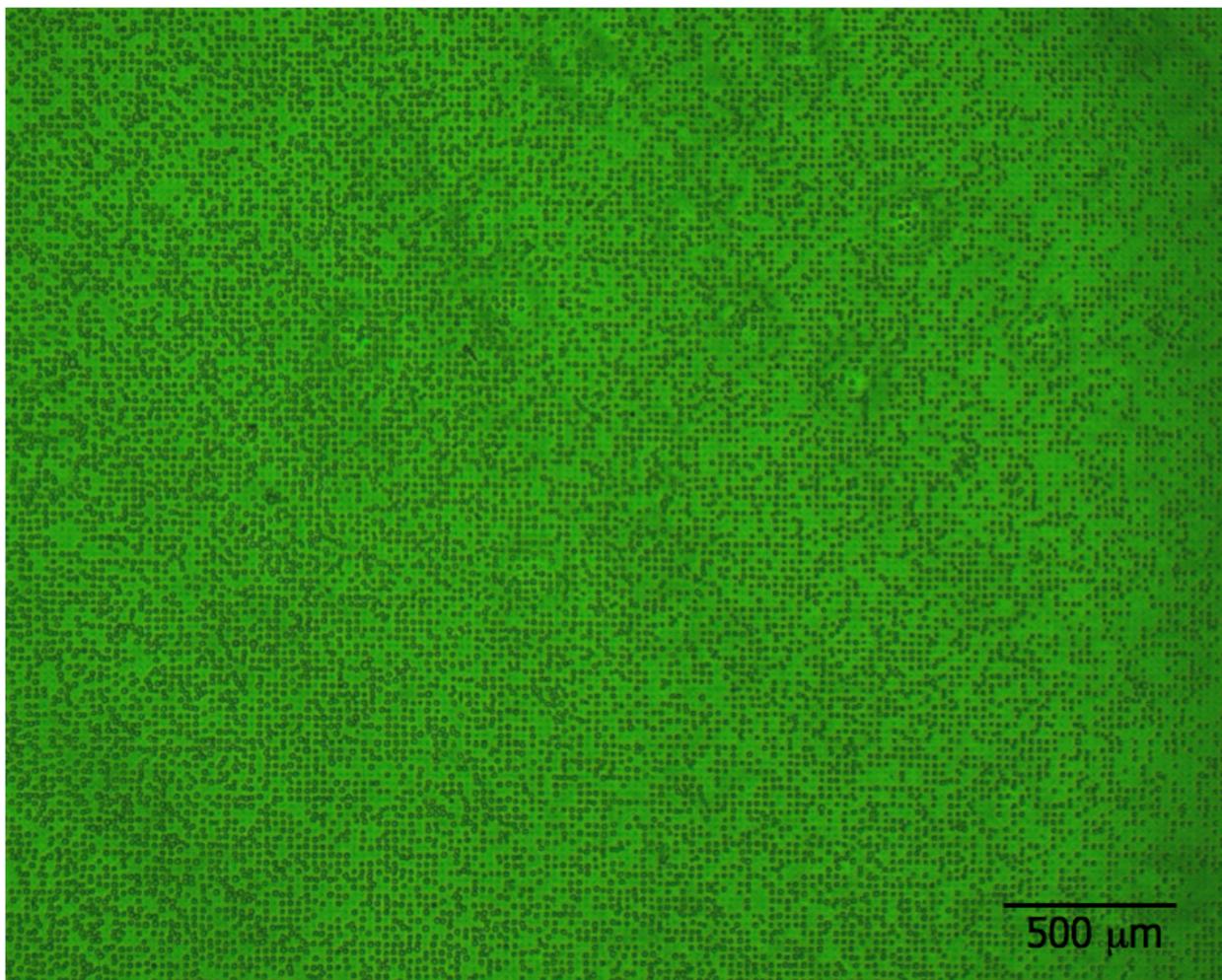
A Figura 4.9 mostra filmes padronizados com, aproximadamente, a mesma taxa de ocupação (~55%), exceto para o filme de  $(CHI3/HA3)_3$  fabricado com 100 mM NaCl, onde ~71% dos sítios do filme padronizado estavam ocupados com linfócitos (Figura 4.9b). A taxa de ocupação dos linfócitos nos filmes padronizados foi determinada contando manualmente o número de linfócitos aderidos nos ~ 3000 cilindros de PEMs - disponíveis para a imobilização dos linfócitos - em cada imagem de microscópio (mínimo sete imagens). A Figura 4.10 mostra uma imagem óptica, de um filme padronizado de  $(CHI3/HA3)_3$ , fabricado com 100 mM NaCl, sobre um substrato de área superficial maior do que as demais, mostrando a adesão dos linfócitos B.



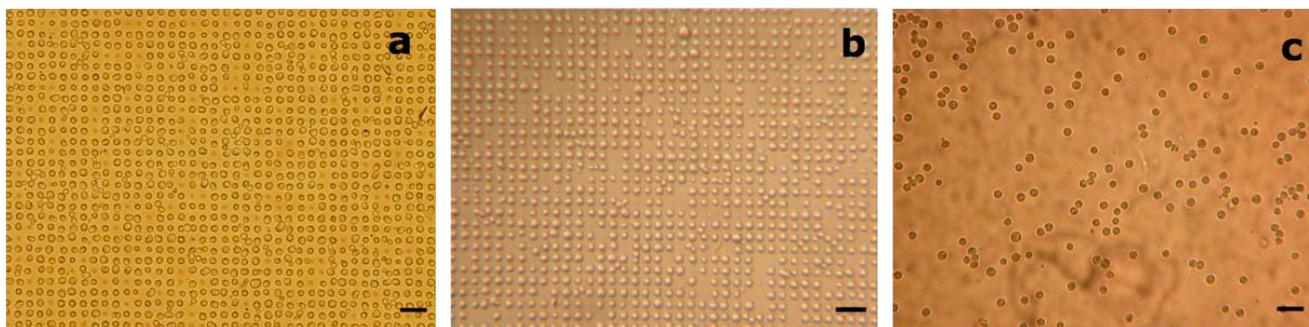
**Figura 4.9.** Linfócitos B aderidos em filmes padronizados de (a)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_3$  (ocupação de ~57%), (b)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_3$  construído com 100 mM NaCl (ocupação ~71%), (c)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_{3,5}$  (ocupação ~54%), e (d)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_{3,5}$  construído com 100 mM NaCl (ocupação de ~56%) após 1 hora de agitação e incubação. Escala = 50  $\mu\text{m}$ . (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)

Para todas as multicamadas testadas, é possível ser alcançada uma taxa de ocupação ainda maior, se o tempo de incubação das células com as lâminas for aumentado de 1 para 2 horas, como observado nas Figuras 4.11a e 4.11b. Além da adesão bem organizada, dos linfócitos B, observada nos filmes padronizados, outros arranjos também foram observados: linfócitos agregados em espaços intersticiais, mais de uma célula em um mesmo sítio (cilindro de PEM) do filme padronizado, e sítios de PEMs vazios. O espaço intersticial é uma superfície catiônica com uma camada superior de PDAC. Linfócitos B situados nas partes intersticiais

entre os cilindros, e portanto, expostos à superfície uniforme de  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}$ , mostraram uma densidade de adesão de aproximadamente 310 células/mm<sup>2</sup>, o que explica a existência de adesão não específica e limitada, entre os linfócitos B e a pré-camada  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}$  (Figura 4.11c). É importante destacar que a adesão de células na pré-camada de PDAC/SPS foi de 60%-83% em comparação com os sistemas planos de HA/CHI.



**Figura 4.10.** Imagem óptica de um filme padronizado de  $(PDAC4/SPS4)_{15,5}-(MNP4/FITC-PAH3)_{9,5}(CHI3/HA3)_3$  fabricado com 100 mM NaCl, mostrando a adesão de linfócitos B. Escala = 500 μm.



**Figura 4.11.** Filmes padronizados com linfócitos B após 2 horas de agitação e incubação em filmes de (a)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_3$  construídos com 100 mM NaCl (ocupação ~ 97%) e (b)  $(\text{MNP4/FITC-PAH3})_{9,5}-(\text{CHI3/HA3})_{3,5}$  sem NaCl (ocupação ~ 90%); (c) linfócitos B aderidos não especificamente em um filme de  $(\text{PDAC4/SPS4})_{15,5}$ , (representativo da superfície intersticial dos filmes padronizados). Escala = 50  $\mu\text{m}$ . (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)

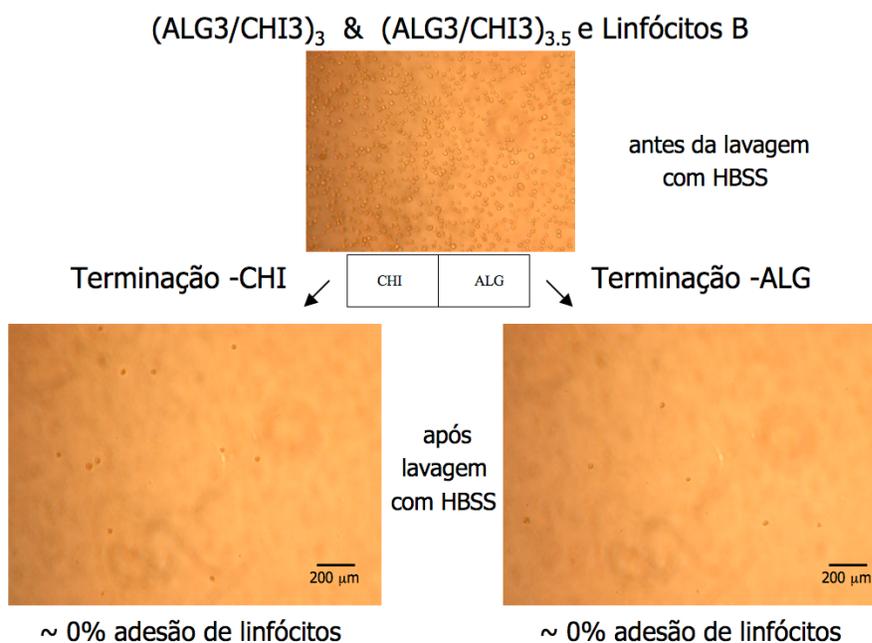
A partir dos experimentos com os filmes padronizados descritos acima, diferentes parâmetros da adesão celular foram quantificados, incluindo o número de sítios dos filmes ocupados com células B, o número de sítios ocupados por duas células, e o número de células aderidas intersticialmente, isto é, fora dos sítios do filme padronizado. A Tabela 4.2 apresenta estes resultados.

**Tabela 4.2.** Quantificação dos diferentes cenários da adesão de linfócitos B em função das condições de deposição e tempos de incubação. Todos os filmes foram construídos com pH 3,0. A ocupação total dos filmes padronizados aumenta com o tempo de incubação, mas o número de células fora das PEMs em forma de cilindros é constante, indicando que a adesão fora das PEMs em forma de cilindros não é específica.

	terminação-HA (sem NaCl) (Figura 4.9a)	terminação-HA (com NaCl) (Figura 4.9b)	terminação-HA (com NaCl) (Figura 4.11a)	terminação-CHI (sem NaCl) (Figura 4.11b)
	células incubadas durante 1h		células incubadas durante 2h	
sítios (bastões) ocupados (%)	56,9	71,1	96,7	90,6
2 células dividindo 1 poste (%)	0,7	0,9	1,9	1,1
células fora dos bastões (%)	2,2	2,7	2,5	2,0

Partindo-se da suposição que a adesão de linfócitos B em multicamadas de CHI/HA é facilitada pela interação do receptor CD44 com segmentos da cadeia polimérica de HA (UNDERHILL, 1992) - referido previamente - os resultados da Tabela 4.2 apontam para a existência de condições específicas de montagem que enriquecem a superfície das

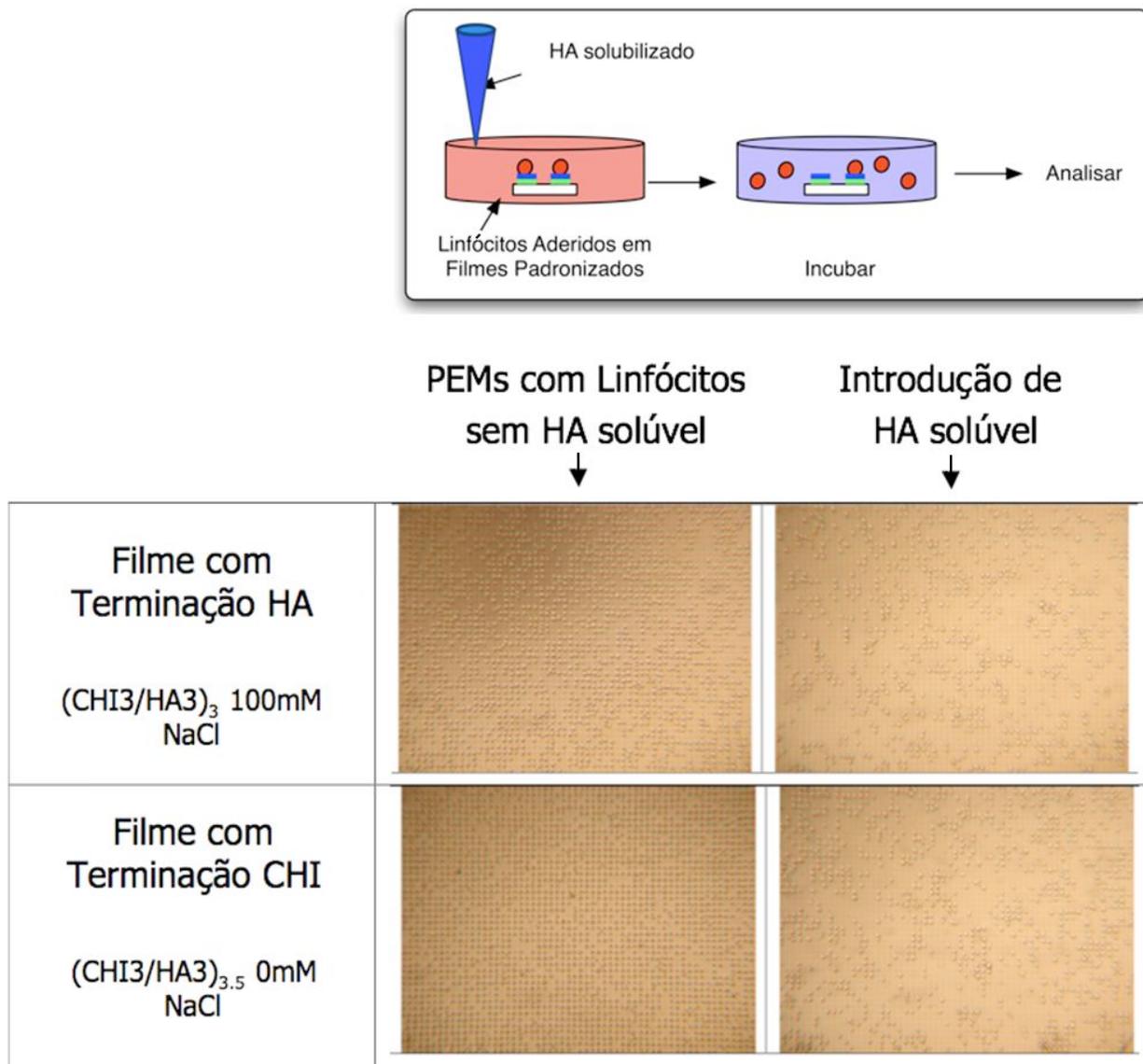
multicamadas com segmentos de HA acessíveis para a adesão celular. Dois experimentos foram utilizados para confirmar que o HA é responsável pela adesão dos linfócitos B. No primeiro ensaio, o HA foi substituído, no filme de multicamadas, pelo polissacarídeo alginato de sódio, que estruturalmente é muito semelhante ao HA. Os filmes, assim formados, não apresentaram propriedades de adesão com os linfócitos. Multicamadas de CHI/ALG com 3,0 e 3,5 bicamadas foram construídas com pH 3,0 na ausência de NaCl. Neste caso, nenhuma adesão de linfócitos B foi observada tanto com a CHI, quanto com o ALG sendo depositados como última camada da superfície do filme. De fato, estas multicamadas de CHI/ALG são excelentes superfícies de bloqueio a serem utilizadas, caso se deseje evitar a adesão de linfócitos B, em uma superfície.



**Figura 4.12.** Imagens ópticas de linfócitos B com filmes de PEMs de  $(\text{ALG3/CHI3})_3$  e  $(\text{ALG3/CHI3})_{3,5}$ , ambos com 0 mM NaCl, antes e após a etapa de lavagem com HBSS - demonstrando que não há adesão seletiva de linfócitos nestes filmes de PEMs.

Este resultado sugere que o HA é fundamental para a adesão de linfócitos através das interações de CD44-HA e que a carga positiva da CHI, por si mesma, é insuficiente para promover uma adesão eficiente dos linfócitos em uma superfície. O segundo ensaio envolveu a utilização de HA solúvel como um antagonista para a adesão de linfócitos (massa molecular,  $1,58 \times 10^6$  g/mol, concentração de solução, 200 mg/mL). Linfócitos B foram introduzidos e incubados em solução RPMI sobre filmes padronizados com camadas superiores de -HA e

–CHI construídos na presença e na ausência de 100 mM NaCl, respectivamente, e o HA solúvel foi adicionado para aderir competitivamente com o receptor CD44 ou CHI. Um desenho esquemático e micrografias destes ensaios estão apresentados na Figura 4.13.



**Figura 4.13.** Desenho esquemático e micrografias dos filmes padronizados onde os linfócitos B foram introduzidos e incubados nos filmes com a terminação de HA e CHI na presença e na ausência de 100 mM NaCl, respectivamente – antes e após a etapa de adicionar HA solúvel para aderir competitivamente com o receptor CD44 ou CHI. (adaptada de Vasconcellos *et al.*, 2010)

A introdução do HA solúvel resultou em um decréscimo na ocupação dos bastões pelos linfócitos B, para ambos os filmes, com última camada de HA ou de CHI. Para o caso no qual a última camada do filme era de CHI, ocorreu uma redução de aproximadamente 60 %, do nível

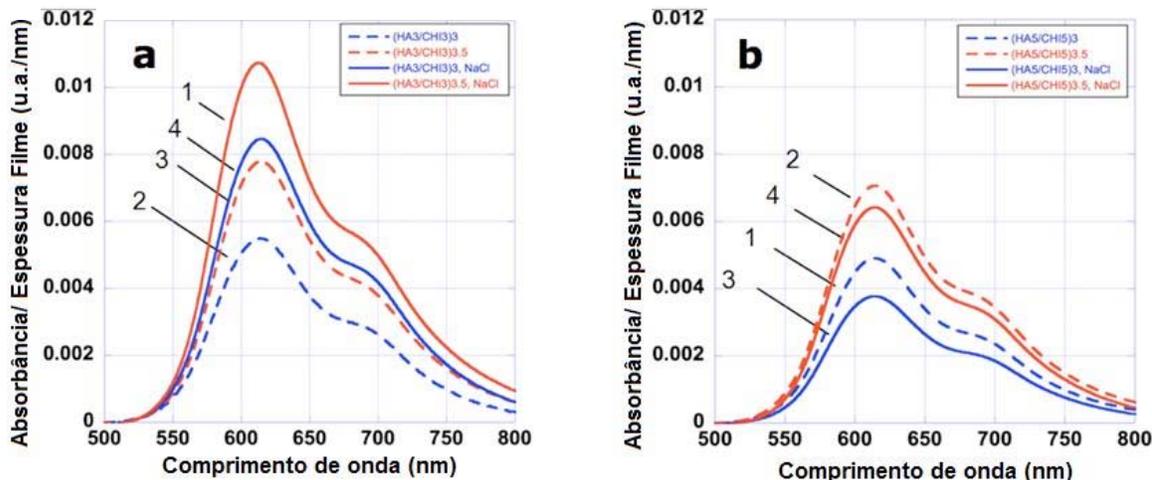
de ocupação, enquanto que para o caso do filme ter a última camada com HA, a redução foi de aproximadamente 12 %. A maior redução observada para os filmes multicamadas com terminação CHI sugere que existe uma ligação de adesão mais fraca para este caso, em comparação com filmes que apresentam HA como última camada depositada. Consistente com esta idéia, já se observou que quando os linfócitos B, aderidos a um filme de PEMs, são submetidos a um escoamento de solução de PBS sobre a superfície, as células B aderidas aos filmes com terminação de HA exibem uma maior resistência para se descolar, em comparação com as células aderidas em filmes multicamadas com terminação de CHI. Estes resultados são consistentes com as observações anteriores do grupo do Prof. Rubner, isto é, que adicionar HA solúvel em uma suspensão de linfócitos B antes de expô-los a filmes padronizados de CHI/HA reduz dramaticamente a adesão dos linfócitos devido à saturação dos receptores celulares CD44 com a HA solúvel (SWISTON *et al.*, 2008). Estes experimentos complementares, fortemente sugerem que as interações CD44-HA são o modo dominante de adesão dos linfócitos B em filmes contendo HA – mesmo para o caso daqueles construídos com CHI como a última camada depositada do filme.

#### **4.3.4 Determinação de grupos Carboxila do HA e Amônio da CHI**

Para indiretamente explorar as mudanças nas quantidades de segmentos da cadeia polimérica de HA, acessíveis às células e não complexadas ionicamente, em diferentes condições de montagem das PEMs, foram utilizados corantes específicos, conhecidos, para interagir e se ligar aos grupos funcionais do HA e da CHI. Corantes de moléculas pequenas têm sido previamente utilizados para tingir somente grupos amino ou carboxila livres - que não tem ligações (YOO *et al.*, 1998). Estes corantes também não titulam grupos eletrostaticamente unidos como demonstrado por Yoo *et al.* (YOO *et al.*, 1998); supõe-se que os corantes utilizados, nestes estudos, se comportam de uma maneira similar. Os grupos livres de ácidos carboxílicos do HA foram tingidos com o azul de alciano, um corante tetracatiônico que tem sido utilizado para investigar substâncias polianiónicas tais como o ácido hialurônico (FAGNOLA *et al.*, 2009; ETIENNE *et al.*, 2005; WHITEMAN, 1973). O tingimento com rosa de bengala, um corante aniônico, foi utilizado para avaliar a presença dos grupos livres de amônio da CHI. Em ambos os casos, partimos do pressuposto que a quantidade de corante absorvida é determinada principalmente pelo número de cargas livres das partes das cadeias aniônicas (no caso do HA) e catiônicas (no caso da CHI).

Os resultados do tingimento com o azul de alciano, para as multicamadas preparadas com as condições de preparo com pH 3,0 e pH 5,0, estão apresentadas nas Figuras 4.14a e 4.14b, respectivamente. Os resultados complementares, do tingimento com rosa de bengala, estão apresentados nas Figuras 4.15a e 4.15b.

Como se observa nestas figuras, todos os filmes multicamadas foram tingidos com ambos os corantes, independentemente do polímero da última camada depositada. Após os 15 minutos de adsorção dos corantes, supôs-se a difusão completa dos mesmos em todo o filme (estado de equilíbrio). Isso ocorre para as PEMs fabricados - com alto grau de interpenetração entre as bicamadas e grupos funcionais iônicos livres dos dois polímeros (tanto na superfície do filme quanto no seu meio contínuo) - que permitem a difusão e penetração dos corantes para acessar todos os grupos funcionais iônicos livres, nos filmes multicamadas. Nenhuma condição de montagem dos filmes produziu uma camada de superfície com um arranjo capaz de bloquear a absorção dos corantes carregados com carga oposta aos polímeros (YOO *et al.*, 1998). Supôs-se que o corante não desloca o equilíbrio estabelecido pelas interações entre a CHI e o HA nos filmes multicamadas.

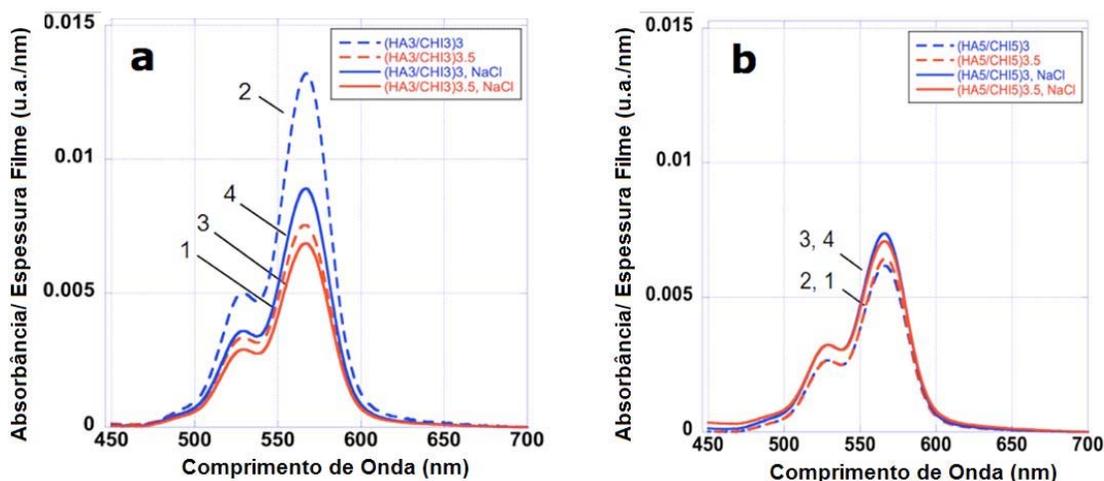


**Figura 4.14.** Absorbância do corante azul de alciano para filmes de (a) (HA3/CHI3) e (b) (HA5/CHI5) normalizados pela espessura dos filmes secos. Os números 1 a 4 correspondem aos filmes com a maior a menor capacidade de adesão de linfócitos (Fig. 4.6). (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)

A Figura 4.14a mostra que PEMs preparadas com pH 3,0 e com NaCl, apresentam a maior absorbância do azul de alciano, independentemente do polímero depositado na última

camada e que, portanto, tem a maior quantidade de segmentos livres do HA. A preparação de filmes com pH 3,0, na presença de NaCl, aumenta o valor da absorbância do azul de alciano, em comparação com filmes preparados na ausência de NaCl. Este comportamento não foi observado para condições de deposição com pH 5,0 (Figura 4.14b), onde os dois maiores valores de absorbância do azul de alciano foram observados para filmes com última camada em HA, independentemente da condição de sal, e onde a preparação de um filme, sem NaCl, aumentou os valores da absorbância em comparação com um filme preparado com NaCl.

Os resultados do tingimento das cargas catiônicas livres, com rosa de bengala, estão apresentados na Figura 4.15. Estes dados revelam que filmes cuja última camada é a CHI, com pH 3,0 (curvas 2 e 4 na Figura 4.15a), apresentam os maiores valores de grupos catiônicos livres. Por outro lado, filmes cuja última camada é o HA, exibiram quantidades menores de grupos catiônicos de amônio livres, como se observa pela absorbância das curvas 1 e 3 na Figura 4.15a. A adição de sal nas soluções de deposição reduz o número de grupos catiônicos livres em relação a uma PEM preparada sem sal (compare as curvas 2 e 4, 1 e 3 da Figura 4.15a). Este tipo de tendência foi observado para somente as condições de preparo com pH 3,0. Para as montagens com pH 5,0, a concentração dos grupos livres de amônio é essencialmente insensível às condições de deposição (último polímero depositado e sal).

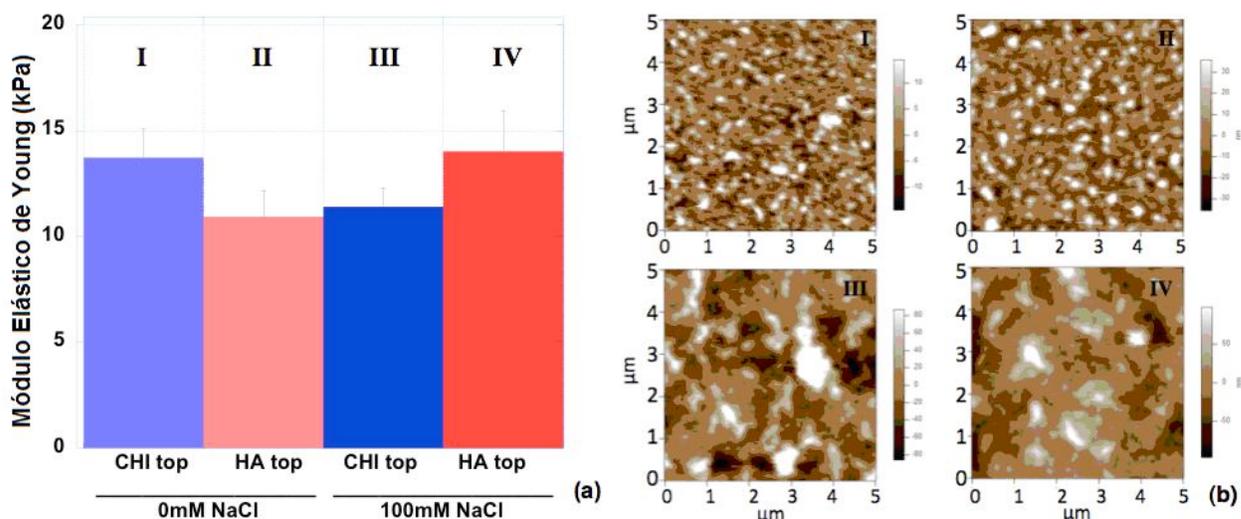


**Figura 4.15.** Absorbância do corante rosa de bengala para filmes de (a) (HA3/CHI3) e (b) (HA5/CHI5) normalizados pela espessura dos filmes secos. Os números 1 a 4 correspondem aos filmes com a maior até a menor capacidade de adesão de linfócitos. (adaptada de VASCONCELLOS *et al.*, 2010)

#### 4.3.5 Módulo de Elasticidade e Topografia de Filmes de PEMs

Nanoindentação via MFA, de filmes PEMs de HA3/CHI3, foi aplicada para determinar se a escolha dos parâmetros de montagem do filme influencia sua rigidez mecânica. Correlações entre a adesão de outros tipos de células e o módulo de elasticidade (rigidez) de superfícies poliméricas tem sido determinadas para uma variedade de hidrogéis, PEMs de polieletrólitos de ácidos/bases fortes e fracos (SCHNEIDER *et al.*, 2007 B; BERG *et al.*, 2004; RICHERT *et al.*, 2002; ETIENNE *et al.*, 2005; RICHERT *et al.*, 2004 B; LICHTER *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2005). É, portanto, plausível que a adesão de linfócitos seja uma função do polieletrólito na última camada e/ou da concentração de sal utilizados na montagem das PEMs.

A Figura 4.16a sintetiza os valores para os módulos de elasticidade de Young  $E$ , efetivos dos filmes hidratados de (CHI3/HA3), adquiridos em pH neutro e em meio de cultura RPMI. É interessante notar que o exame das Figuras 4.16a e 4.6a (rigidez da PEM e capacidade de adesão de linfócitos B, respectivamente), mostra uma correlação qualitativa entre a rigidez e a taxa de adesão dos linfócitos B. A dependência da taxa de ocupação dos linfócitos, em função de tipo de PEM preparado, parece ser reproduzida na dependência da rigidez em função dos mesmos tipos de PEMs, isto é, os linfócitos parecerem aderir, seletivamente, aos filmes que apresentam uma maior rigidez média. Entretanto, notou-se que o módulo de elasticidade de Young,  $E$ , entre estes quatro filmes PEM de HA3/CHI3, com condições de montagem diferentes, não é significativamente diferente (ANOVA,  $p=0,15$ ). Portanto, estes dados não apresentam uma correlação forte entre a rigidez dos filmes e a adesão de linfócitos B dentro da faixa estudada. Além disso, a Figura 4.16b mostra que a morfologia da superfície das PEMs depende principalmente da escolha dos parâmetros, com ou sem sal; portanto, a topografia não está correlacionada com a adesão celular como mostra a Figura 4.6a.

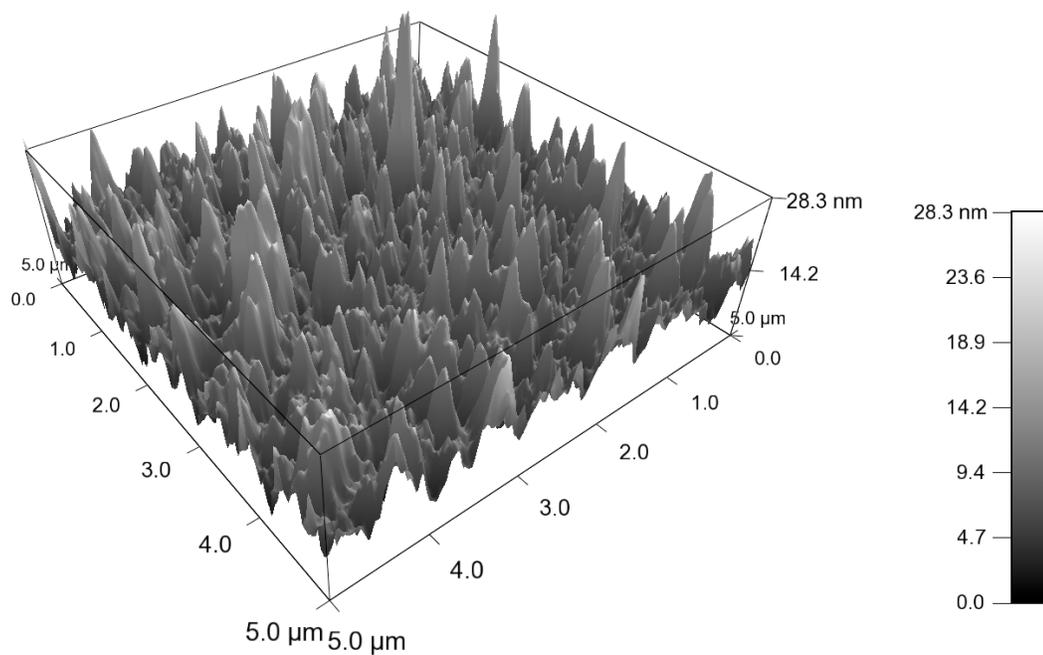


**Figura 4.16.** Módulos de elasticidade e morfologia de filmes de PEM de HA3/CHI3. (a) Módulos de Young  $E$  (média  $\pm$  desvio padrão) medidos via nanoindentação com microscopia de força atômica indicado pela diferença estatística significativa entre estes quatro filmes (ANOVA,  $p = 0.15$ ). (b) Imagens de topografia de MFA com modo contato mostram que montagem na presença de sal altera a morfologia de superfície das PEMs. A comparação com a Figura 4.6a indica que não há uma correlação entre esta topografia de superfície e a adesão de linfócitos B.

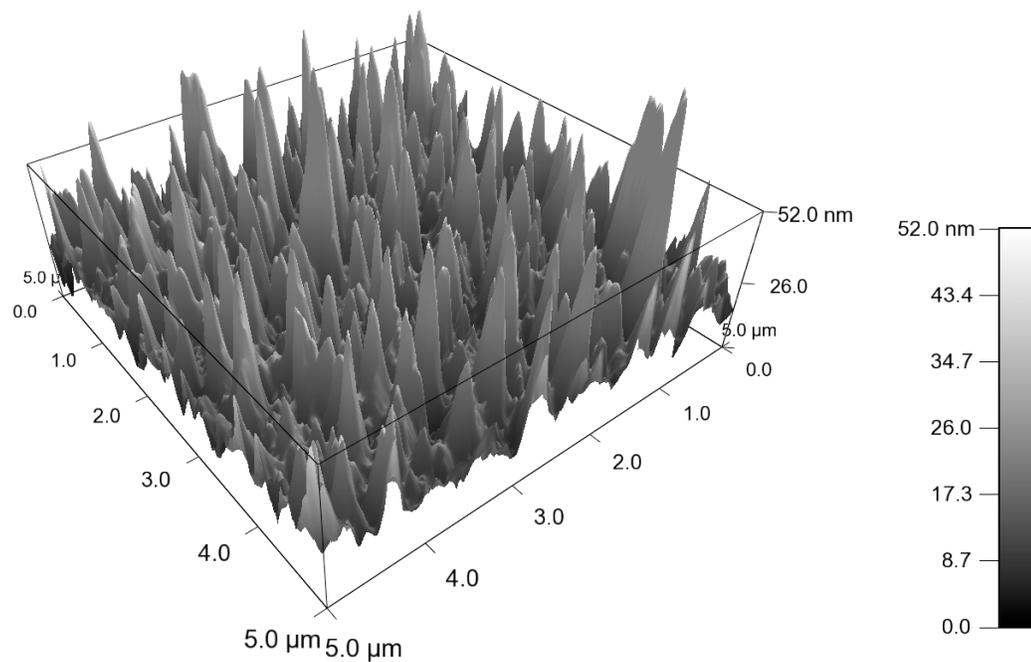
A ausência de correlação entre a rigidez e a topografia superficial dos filmes PEM sugere que outras características de superfície, tais como a densidade e acessibilidade de ligantes de HA, permanecem como explicações plausíveis para a adesão seletiva.

Filmes hidratados de  $(\text{HA3/CHI3})_3$ , 0 mM NaCl apresentaram uma topografia de picos pontiagudos de até 28,3 nm de altura (Fig. 4.17). Com uma camada de HA adicional, estes filmes apresentam característica topográfica similar, porém com uma altura superior, de até 52,0 nm.

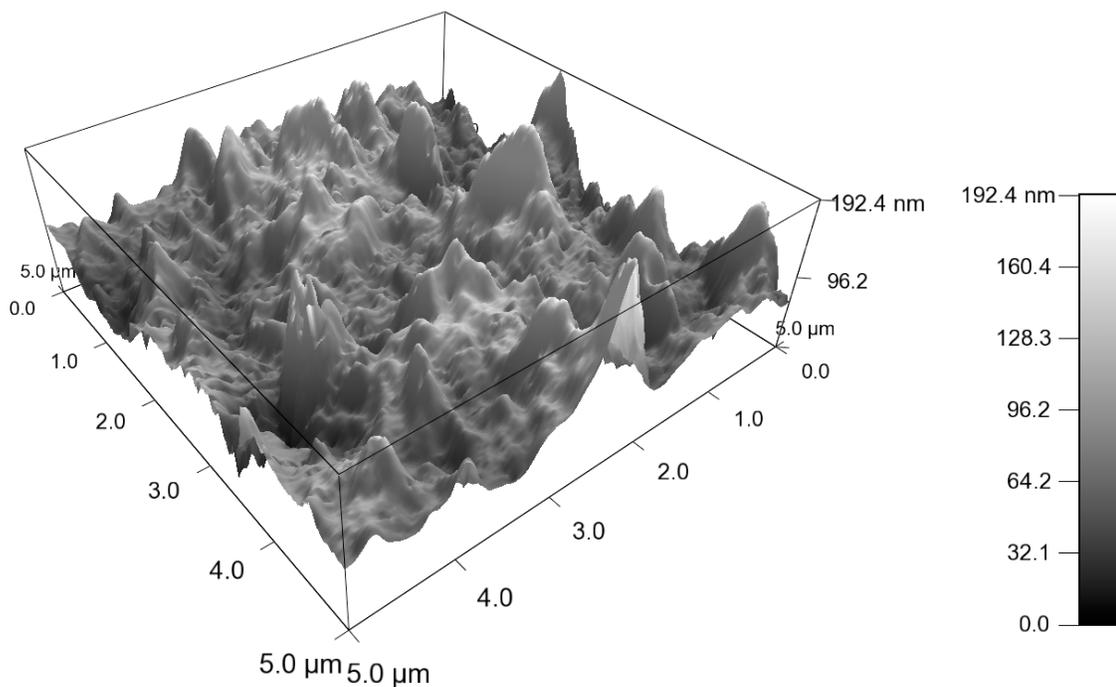
A presença de sal, durante a preparação dos filmes, muda drasticamente o relevo da superfície. Em comparação com os filmes preparados sem sal, filmes hidratados de  $(\text{HA3/CHI3})_3$ , 100 mM NaCl, apresentaram uma superfície com regiões menos pontiagudas mas, por outro lado, com uma rugosidade maior, de até 192,4 nm. A presença de sal promove a maior deposição de polieletrólitos, e a preparação com sal nas soluções de polieletrólitos e lavagens com água pura promovem um alisamento da superfície, devido à inserção e remoção do sal durante o processo de preparação, dos filmes, como observado.



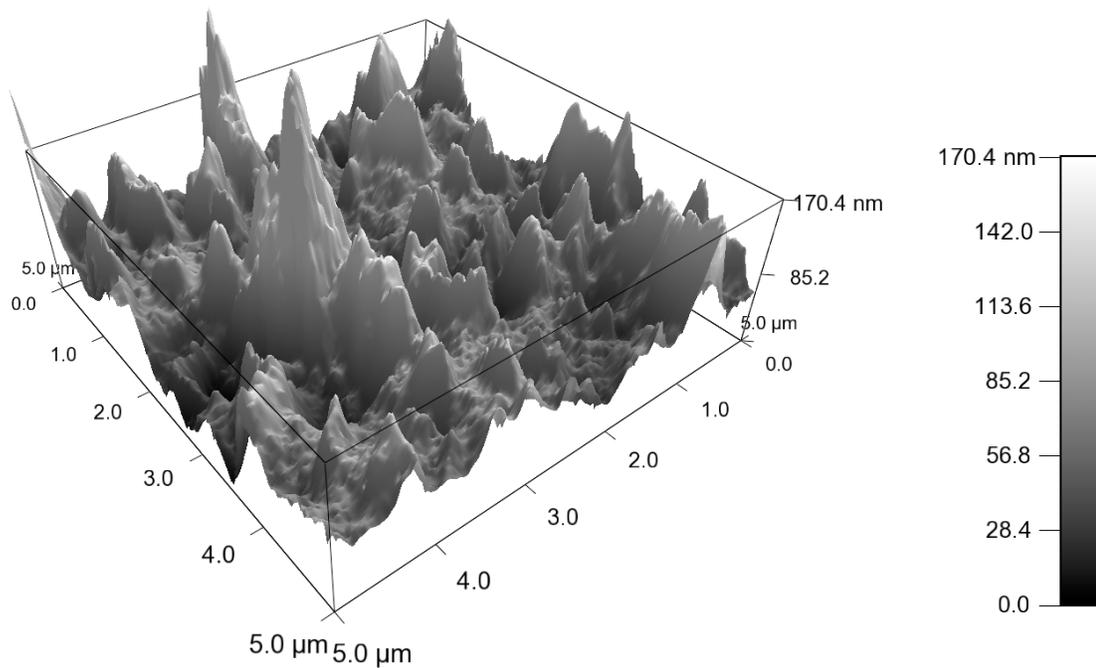
**Figura 4.17.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de  $(HA3/CHI3)_3$ , 0 mM NaCl.



**Figura 4.18.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de  $(HA3/CHI3)_{3.5}$ , 0 mM NaCl.



**Figura 4.19.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de  $(\text{HA}_3/\text{CHI}_3)_3$ , 100 mM NaCl.



**Figura 4.20.** Imagem MFA 3D de um filme hidratado de  $(\text{HA}_3/\text{CHI}_3)_{3,5}$ , 100 mM NaCl.

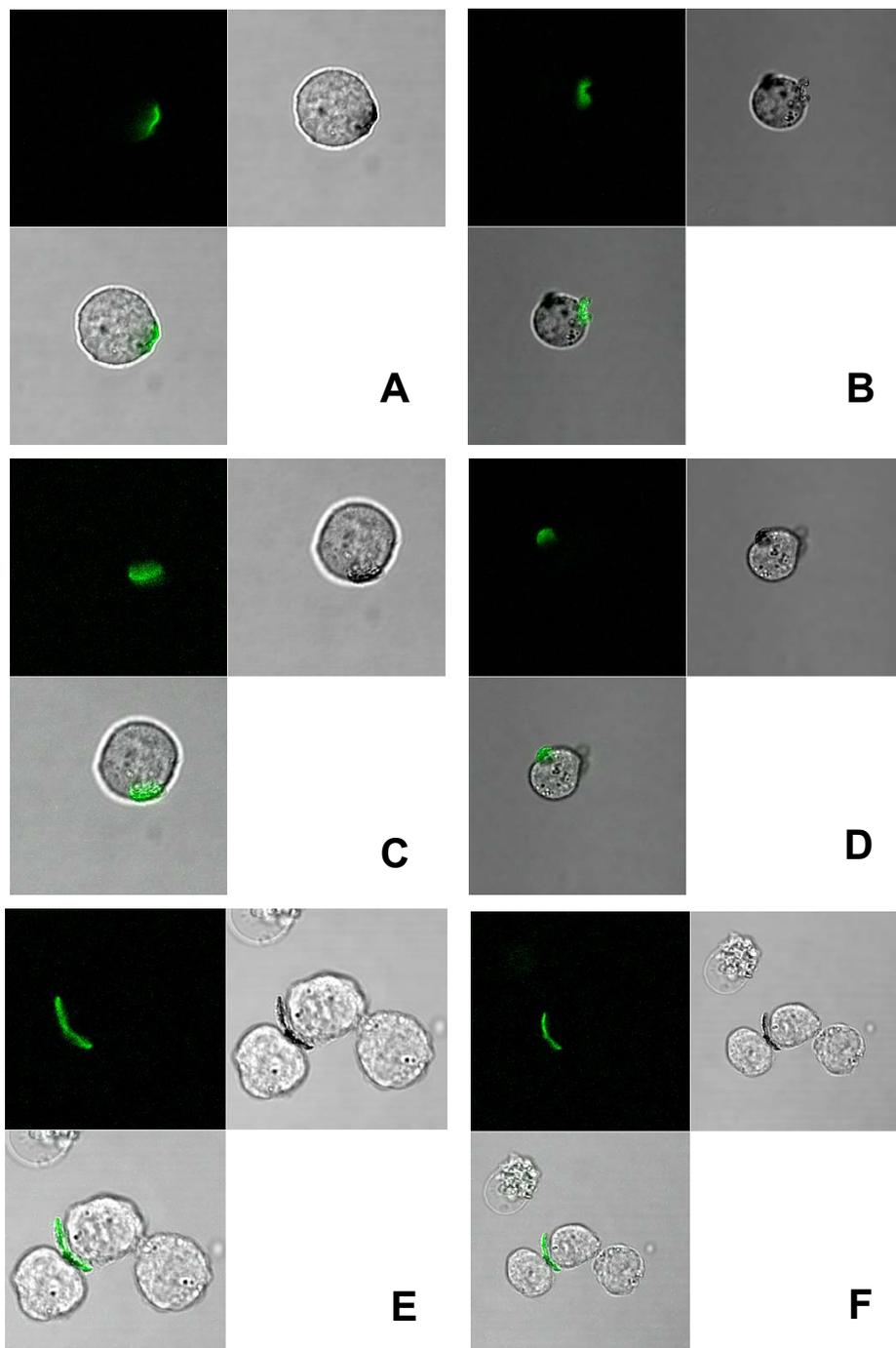
O filme hidratado de  $(\text{HA3/CHI3})_{3,5}$ , 100 mM NaCl mostrou uma topografia similar ao filme de  $(\text{HA3/CHI3})_3$ , 100 mM NaCl, com regiões de picos mais arredondados e com maior rugosidade em comparação com os filmes preparados na ausência de sal.

#### 4.3.6 Linfócitos Funcionalizados com PEMs em Solução RPMI

Uma vez que os linfócitos estão aderidos em PEMs, estes filmes podem ser desprendidos da superfície dos substratos com a utilização da camada de  $(\text{PNIPAAm3/PMAA3})_{80,5}$ , que se dissolve em água com pH 7,0 e temperatura de 4 °C. Imagens de microscopia confocal, a laser, de linfócitos funcionalizados com PEMs de  $(\text{CHI3/HA3})_3$ , 100 mM NaCl, são observados na Figura 4.21. As diferentes figuras A-F representam diferentes linfócitos funcionalizados em situações diferentes.

Estes linfócitos são, agora, equipados com *backpacks* (*mochilas*) que contêm um marcador fluorescente e nanopartículas superparamagnéticas, o que confere funcionalidade aos linfócitos. Os linfócitos são viáveis mesmo carregando a *backpack* de PEMs. Aparentemente, os linfócitos podem se replicar mesmo contendo as PEMs, como se observa nas Figuras 4.21E e 4.21F. É importante destacar que, com a versatilidade da preparação de PEMs, é possível funcionalizar os linfócitos com outros compostos na *backpack*, tais como fármacos para tratamento de câncer, outras nanopartículas, nanoestruturas, ou biomoléculas com finalidades específicas para a área de biotecnologia.

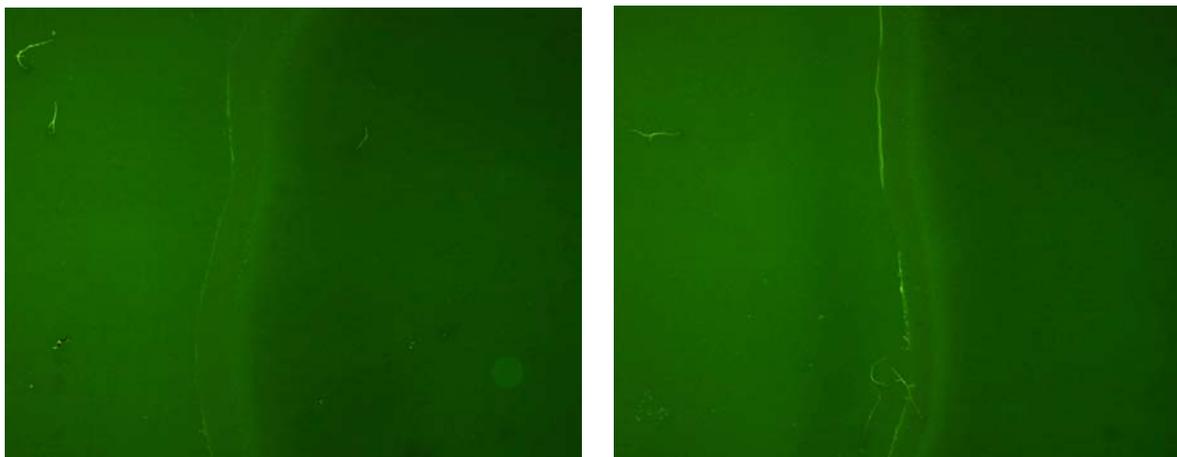
Análises adicionais de citometria de fluxo dos linfócitos funcionalizados foram realizadas, as quais comprovaram que aproximadamente 71% dos linfócitos tinham a *backpack* de  $(\text{MNP4/FITC-PAH})_{9,5}(\text{CHI3/HA3})_3$ , com 100 mM NaCl, e se apresentavam viáveis.



**Figura 4.21.** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de linfócitos funcionalizados com PEMs de  $-(MNP4/FITC-PAH)_{9,5}(CHI3/HA3)_3$ , com 100 mM NaCl (trabalho em colaboração com Albert J. Swiston, 2009).

#### 4.3.7 Reação de PEMs com SPDP

Imagens de microscopia fluorescente de PEMs funcionalizadas com o ligante SPDP (região de fluorescência na metade do lado esquerdo) estão apresentadas na Figura 4.22.



**Figura 4.22.** Imagens de microscopia fluorescente de PEMs funcionalizadas com o ligante SPDP (região de fluorescência na metade do lado esquerdo). (Estudo em colaboração com Albert J. Swiston, 2009; RESULTADOS AINDA NÃO PUBLICADOS)

Os experimentos de adesão dos linfócitos B em PEMs de HA/CHI, funcionalizadas com o ligante SPDP, não apresentaram um aumento na eficiência de adesão, em comparação com os filmes de HA/CHI, sem o ligante. Mais estudos necessitam ser realizados para investigar a força de ligação dos linfócitos aos filmes de PEMs contendo o ligante SPDP e comparar os resultados com os obtidos quando se considera apenas a interação CD44-HA.

PEMs contendo HA e CHI são interessantes para uma variedade de aplicações biológicas devido as suas propriedades já bem estabelecidas de biocompatibilidade e biodegradabilidade. (RICHERT *et al.* 2004 A; THIERRY *et al.*, 2003; ETIENNE *et al.*, 2005; PICART *et al.*, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2007 B,C). No caso específico de engenharia do sistema imune, uma sequência de seis-açúcares do HA é um ligante natural para os receptores de superfície CD44 presentes em muitas células do sistema imunológico (UNDERHILL, 1992). Para se tirar o maior proveito desta interação, potencialmente muito forte, entre célula-polímero, é necessário criar nanoestruturas moleculares que apresentem seus grupos funcionais de ligação críticos, em um arranjo otimizado. Para se alcançar este objetivo, examinamos como as condições de deposição influenciam o *blending* no nível molecular (SHIRATORI & RUBNER, 2000) destes dois polímeros, durante a preparação dos filmes multicamadas. Três variáveis de

deposição foram estudadas detalhadamente: a presença de NaCl nas soluções poliméricas (0 mM ou 100 mM NaCl), o pH das soluções poliméricas (3,0 ou 5,0), e o polímero depositado na última camada (HA ou CHI).

Filmes multicamadas de polieletrólitos biopoliméricos, construídos de ácido hialurônico e quitosana, são capazes de eficientemente promover a adesão de linfócitos B. Linfócitos B são células do sistema imunológico adaptativo que tem evoluído para identificar agentes patogênicos muito eficientemente. Elas são, devido às suas habilidades de detecção, candidatas excepcionais para compor biossensores - baseados em células - devido as suas aplicações em diagnósticos de doenças infecciosas, em aplicações de engenharia para o sistema imune, onde podem ser utilizadas para localizar e alcançar tecidos doentes e infectados (RIDER *et al.*, 2003).

Os filmes construídos com quitosana e ácido hialurônico exploram as interações entre o receptor celular CD44 - presente na superfície dos linfócitos - e o ácido hialurônico fornecendo um método para produzir superfícies com propriedades de aderência às células B, sem a necessidade da utilização de reações químicas agressivas.

Os filmes multicamadas que apresentaram as duas maiores eficiências de adesão de linfócitos B foram construídos com pH 3,0. Em um dos casos, HA foi depositado como última camada e 100 mM NaCl foi adicionado às soluções de deposição. No outro caso, CHI foi depositada como última camada polimérica e nenhum NaCl foi adicionado às soluções de deposição. No primeiro caso, com HA como última camada e na presença de NaCl, o filme multicamada resultante exibiu a maior concentração de segmentos livres de HA, revelado pelo tingimento com azul de alciano. Na hipótese de que a adesão de linfócitos B, em multicamadas de HA/CHI, é promovida através da interação do receptor CD44 com os segmentos da cadeia polimérica de HA, então é de se esperar que a multicamada com a maior concentração de segmentos livres de HA seja a mais eficiente para a adesão de linfócitos B. Porém, o fato de que o filme multicamada com terminação de CHI, construído com pH 3,0, exibiu a maior quantidade de grupos livres catiônicos (e um tingimento muito menor de azul de alciano), indica que as cargas positivas das cadeias poliméricas da CHI estão também contribuindo, neste caso, para uma alta eficiência de adesão. Cargas catiônicas podem melhorar a adesão celular, já que linfócitos B tem uma membrana celular negativamente carregada. Portanto, tanto as interações de CD44-HA, quanto às interações eletrostáticas podem estar agindo no processo de adesão dos linfócitos com as PEMs de HA/CHI.

Experimentos de controle, apropriados, confirmaram que o HA é necessário para uma adesão bem sucedida de linfócitos B. Para todos os casos examinados (montagem com pH 3,0 e 5,0, com e sem sal), multicamadas contendo HA exibiram a habilidade de aderir e imobilizar linfócitos B de meios de cultura. Por outro lado, quando o HA foi substituído, nas multicamadas, pelo polímero ALG, estruturalmente similar ao HA, nenhuma adesão de linfócitos foi observada. De fato, os filmes multicamadas de ALG/CHI, investigados neste estudo, provaram ser excelentes multicamadas para bloquear a adesão dos linfócitos B. De forma similar, filmes multicamadas contendo PDAC/SPS exibiram somente uma fraca habilidade de aderir linfócitos B. Em um estudo separado, sobre as propriedades mecânicas no estado-molhado dos filmes, realizado com experimentos de nanoindentação com MFA, determinou-se que não há uma correlação forte entre a dureza (módulo) do filme e a adesão de linfócitos B. (RESULTADOS AINDA NÃO PUBLICADOS, Em colaboração com VAN VLIET *et al.*, 2010)

Para fortalecer a idéia de que a adesão de linfócitos B é facilitada por segmentos de HA, a introdução de HA solúvel promoveu o desprendimento dos linfócitos previamente aderidos nas multicamadas de HA/CHI. A diferença pronunciada observada no número de linfócitos desprendidos das multicamadas com as maiores eficiência de adesão dos linfócitos com terminação de HA e CHI (12 % e 60 %, respectivamente) aponta que a adesão entre linfócitos B com a multicamada com terminação de CHI é consideravelmente menos forte. Essa observação também fortalece a noção que, no caso das multicamadas com terminação CHI, as interações eletrostáticas entre as cadeias poliméricas positivamente carregadas de CHI e os linfócitos negativamente carregados, são em parte, responsáveis pela alta eficiência da adesão de linfócitos B, neste sistema de multicamadas. Mesmo que as interações eletrostáticas possam resultar em uma alta eficiência de adesão de linfócitos, com menos sítios de ligação com ligantes CD44 na superfície, os linfócitos B são facilmente deslocados das multicamadas com as cadeias de HA em solução que agem como receptores competitivos. Além disso, demonstramos que os linfócitos B aderidos em multicamadas com terminação de HA são muito mais resistentes ao deslocamento, quando sujeitos a um escoamento agressivo de solução de PBS sobre a superfície. Portanto, se o objetivo é uma alta eficiência de adesão de linfócitos, junto com uma adesão mais forte, condições de montagem que produzem o maior nível de segmentos livres e acessíveis de HA são a melhor opção.

A possibilidade de se obter um filme com terminação com HA ou CHI e se alcançar uma eficiência de adesão similar de linfócitos pode ser de interesse particular para algumas aplicações. Caso os requisitos da aplicação ditem a necessidade da presença de grupos

funcionais particulares nas superfícies carboxilas em HA, aminos em CHI), então HA ou CHI podem ser utilizados sem prejudicar a capacidade de adesão dos linfócitos B. Adicionalmente, as propriedades antibacterianas conhecidas da CHI (KUMAR *et al.*, 2004) podem ser melhor exploradas quando a CHI é a última camada depositada.

Finalmente, notou-se que mesmo tendo identificado condições específicas de montagem das PEMs para promover um nível alto de adesão de linfócitos B, uma correlação direta e clara entre a quantidade total de segmentos livres de HA (como revelado com o tingimento com azul de alciano) e a adesão de linfócitos B não foi descoberta. Isso reflete o fato que, como mencionado acima, interações eletrostáticas também podem estar influenciando a adesão, resultando em uma interação e ação combinadas entre a adesão de linfócitos e o número de segmentos de HA e cadeias positivamente carregadas de CHI, próximas de ou na superfície. Adicionalmente, como os ligantes de adesão do HA estão dispostos na superfície (em *loops* e/ou em *tails*, por exemplo), não somente a quantidade total de HA presente no filme, é muito mais importante para uma adesão eficiente do CD44. Condições de montagem com pH baixo e com a presença de sal nas soluções de deposição seriam esperadas para favorecer uma concentração maior de *loops* e *tails*.

#### 4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Multicamadas de biopolímeros contendo ácido hialurônico e quitosana imobilizam linfócitos B não-aderentes, com sucesso. Estes filmes aderem linfócitos B via a interação nativa entre o CD44 e o HA, assegurando a viabilidade e funções dos linfócitos após a adesão. É possível maximizar a eficiência de adesão das PEMs ajustando-se sistematicamente as variáveis força iônica e pH das soluções de deposição. Dentre todos os sistemas de multicamadas de biopolímeros estudados, os filmes com terminação de HA, (HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, depositados com 100 mM NaCl, foram os que apresentaram a maior adesão de linfócitos (com  $1850 \pm 150$  células/mm<sup>2</sup>). Níveis de adesão muito similares foram encontrados para filmes com terminação de CHI, (HA3/CHI3)<sub>3</sub>, depositados sem NaCl. Também foi observado que os linfócitos aderem em filmes de HA/CHI, padronizados foto-litograficamente, corroborando observações prévias.

Este trabalho demonstra duas condições importantes para a adesão bem sucedida de linfócitos B, em filmes multicamadas contendo HA. A primeira condição é que o HA é essencial para a adesão mediada pelo receptor CD44, o que foi demonstrado pelos experimentos de

controle com ALG e ensaios de adesão antagônica com HA solúvel. Porém, como mostrado pelos resultados obtidos com tingimento por corantes, a quantidade total de HA em um filme multicamada não determina, necessariamente, a capacidade de adesão de linfócitos B. A segunda condição, envolve a escolha de parâmetros para as soluções de HA (pH baixo e presença de sal) que favoreçam o surgimento de *loops* e *tails*, disponibilizando mais ligantes de adesão para o receptor CD44, resultando em uma maior adesão de linfócitos B. Estas duas condições enfatizam que, como HA é apresentado na superfície, ele é o fator mais importante para determinar o potencial de adesão dos linfócitos. A possibilidade de facilmente se produzir filmes finos que façam adesão com o receptor CD44, com afinidades de adesão ajustáveis, encontrará inúmeras aplicações em biosensores, biomateriais, e aplicações de engenharia tecidual do sistema imune. Além disso, a interação natural entre o CD44 e o HA pode desencadear cascatas de sinalização celular e resultar em comportamentos desejáveis para biosensoriamento, uma aplicação que originalmente motivou este trabalho (RIDER *et al.*, 2003).

#### 4.5 APÊNDICE

Publicado em *Biomacromolecules: Bioactive polyelectrolyte multilayers: hyaluronic acid mediated B lymphocyte adhesion*. *Biomacromolecules*, 2010; 11(9); 2407-2417.

Entrevista no Jornal da UNICAMP, *Pesquisador desenvolve na FEQ material que interage com células*. Complexos biocompatíveis podem ser usados como biossensores ou no ‘transporte’ de fármacos. Edição do jornal: 21-27 de maio de 2011, página 9.

Entrevista no Correio Braziliense, Brasília, “*Mochilas*” de Salvação, Caderno Saúde, 14 de maio 2011, página 31.

Apresentações orais do trabalho:

- 1) Vasconcellos, F. C., Swiston, A. J., Zieger, A. S., Vliet, K. V., Cohen, R. E., Rubner, M. F., *Physical and Mechanical Properties of Lymphocyte Adhesive Biopolymer Multilayer Films*, In: *International Conference on Advanced Materials- ICAM*, Rio de Janeiro, RJ, 20-25 setembro, 2009.
- 2) Vasconcellos, F. C., Swiston, A. J., Beppu, M. M., Cohen, R. E., Rubner, M. F., *Biopolymer Multilayers for Promoting Immune Cell Adhesion*, In: *13<sup>th</sup> IACIS International Conference on Surface of Colloid Science and the 83<sup>rd</sup> ACS Colloid & Surface Symposium*, Columbia University, New York, NY, 14-19 junho, 2009.
- 3) Vasconcellos, F. C., Swiston, A. J., Beppu, M. M., Cohen, R. E., Rubner, M. F., *Lymphocyte Adhesive Biopolymer Thin Films*, In: *MIT/Princeton Microsymposium on Polymers*, Princeton, NJ, 10-11 junho, 2009.

Prêmio: Melhor Pôster – Materials Day, 2008 (MIT): *Functional Polyelectrolyte Multilayer Patches on Living B-cells*, Massachusetts Institute of Technology, MIT, Cambridge, MA, 29 outubro, 2008. (apresentação em colaboração com Albert J. Swiston)

Citação do Trabalho no *Diário da Saúde*, *Brasileiros criam “mochila” para células carregarem medicamentos*. 05 de abril 2011.

Citação do Trabalho na NewsRx: <http://www.newsrx.com/health-articles/2182228.html>, Outubro 2010.



## CAPÍTULO 5

### FILMES FINOS ANTIBACTERIANOS COMPOSTOS POR MULTICAMADAS DE BIOPOLÍMEROS

#### 5.1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes tem demonstrado que superfícies que podem sofrer significativo intumescimento e ao mesmo tempo ser não-rígidas, têm a característica de resistir à proliferação de bactérias, e que um número suficiente de cargas catiônicas móveis podem efetivamente romper membranas celulares (LICHTER & RUBNER, 2009, LICHTER *et al.*, 2008). Os filmes finos de polieletrólitos (PEMs) produzidos pela técnica *layer-by-layer* (LbL), para o recobrimento e funcionalização de superfícies vem sendo estudados para inativar (destruir) bactérias, seja através da liberação controlada de biocidas ou com a fabricação de superfícies que promovam a destruição das células bacterianas, logo ao contato com a superfície.

As superfícies de filmes PEMs constituídos pelos polieletrólitos HA e CHI se prestam a essa atividade antibacteriana, uma vez que, sendo o HA passível à hidratação, ele condiciona e lubrifica a superfície do filme, impedindo a proliferação das bactérias. Ao mesmo tempo, a CHI, com suas cargas positivas, inativam (destroem) as bactérias. Portanto, para a produção de superfícies antibacterianas, filmes de PEMs que maximizem o HA depositado - disponível na superfície para a lubrificação e livre para impedir a proliferação - juntamente com as cargas positivas da CHI - com características biocidas - servem ao propósito de impedir a contaminação de superfícies pela proliferação indesejável de bactérias viáveis.

Neste estudo, filmes finos de ácido hialurônico (HA) e quitosana (CHI) foram utilizados como superfícies antibacterianas. Um dos parâmetros de preparo destes filmes, o pH, foi variado para expor um número alto de cargas catiônicas, criando assim, superfícies antibacterianas efetivas, sem a utilização de fármacos ou biocidas. O número de bactérias viáveis da cepa *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) foi significativamente reduzido em PEMs com um número alto de cargas catiônicas livres.

O estudo da produção de novos materiais funcionais, para o controle da proliferação bacteriana e prevenção de infecções, vem sendo extensivamente pesquisado. Estima-se que aproximadamente 64% das infecções adquiridas em hospitais ao redor do mundo são atribuídas à proliferação de bactérias em equipamentos médicos e implantes (COSTERTON *et*

*al.*, 1999). Estas infecções hospitalares representam um gasto estimado de U\$ 4,5 bilhões, anualmente, no mundo (KATSIKOIANNI & MISSIRLIS, 2004).

A adesão de células de bactérias, nas superfícies e interfaces de materiais, representa o primeiro estágio na proliferação e colonização bacteriana e, posteriormente, no desenvolvimento de biofilmes bacterianos (estruturas tridimensionais de colônias bacterianas envolvidas em uma matriz de polissacarídeos produzida pelas bactérias) (COSTERTON *et al.*, 1999). Biofilmes bacterianos, na superfície e interfaces de equipamentos e dispositivos, são sabidamente muito resistentes a tratamentos com antibióticos (COSTERTON *et al.*, 1999; STEWART & COSTERTON, 2001; NOROWSKI & JOEL, 2009). Em sistemas de distribuição de águas, a adesão e proliferação bacteriana resulta na formação de biofilmes, um processo denominado de *biofouling*, que pode restringir e mudar o fluxo do fluido, e causar a aceleração da degradação de materiais como os componentes de tubulações, comprometendo assim a qualidade da água (HALLAM *et al.*, 2001).

As abordagens atuais, mais comuns, para combater a colonização de bactérias que consigam aderir estavelmente em superfícies, incluem o uso de antibióticos; a funcionalização de superfícies com agentes microbicidas; a liberação lenta de biocidas, tais como o ouro ou a prata, na superfície de materiais que tenham estes agentes incorporados em suas estruturas; ou a funcionalização superficial de materiais com polímeros ou peptídeos que tem ações antimicrobianas específicas. Outra abordagem muito promissora é a prevenção da adesão bacteriana na superfície de materiais, antes da colonização.

Recentemente, a técnica de deposição *layer-by-layer* de multicamadas de polieletrólitos tem sido utilizada no estudo e controle da interface entre superfícies e células bacterianas, e na produção de recobrimentos antibacterianos eficientes (LICHTER *et al.*, 2009; LICHTER *et al.*, 2008; LICHTER & RUBNER, 2009; RICHERT *et al.*, 2004 A).

As células bacterianas de interesse, no presente estudo, são da bactéria *Staphylococcus epidermis* (*S. epidermidis*). A *S. epidermis*, é uma bactéria esférica firmicute Gram positiva (G+), que serve como modelo, já estabelecido, de adesão e proliferação bacteriana e que é responsável por infecções hospitalares. Estratégias e métodos de prevenção da colonização e infecção por *S. epidermidis* são muito importantes, já que essa espécie de bactéria tem, através de mutação, se tornado mais resistente a tratamentos com antibióticos.

O presente estudo avalia filmes finos de multicamadas de quitosana (CHI) e ácido hialurônico (HA) com pH 3,0 e diferente número de bicamadas para otimizar sua ação antibacteriana. A funcionalidade química e as propriedades mecânicas destes filmes podem

ser ajustadas com variações simples de condições de preparo, utilizando-se a técnica *layer-by-layer*, como a escolha do polycation/poliânion, pH de montagem, ou polímero da camada de superfície, podendo ser obtidas diversas superfícies (substratos de vidro, metálicas, ou poliméricas), com capacidade de prevenir a proliferação de bactérias.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Materiais

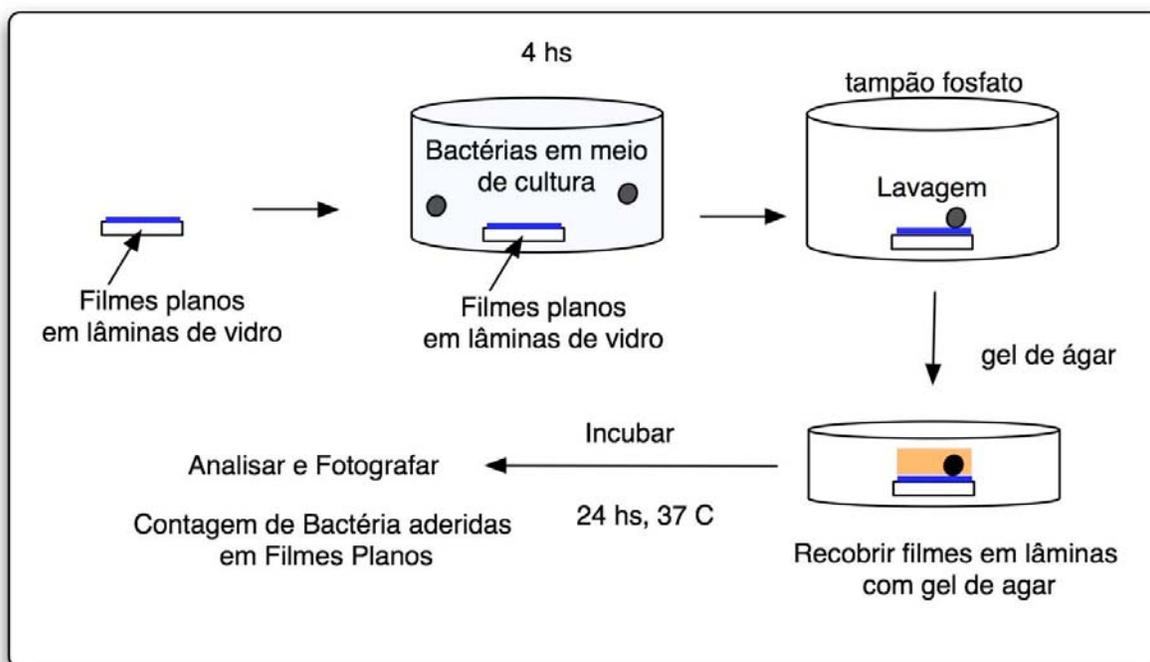
O ácido hialurônico (HA, de *Streptococcus equi* sp, massa molecular  $M_W \approx 1,63 \times 10^6$  g/mol), quitosana (CHI, baixa massa molecular  $\approx 5 \times 10^4$  g/mol, 75-85 % desacetilada), alginato (ALG, na forma de alginato de sódio, baixa massa molecular  $\approx 12-19 \times 10^4$  g/mol), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC, média massa molecular, 20% massa em solução aquosa), e poliestireno sulfonato de sódio (SPS, massa molecular  $M_W \approx 7 \times 10^4$  g/mol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Todos os polieletrólitos foram utilizados sem purificação anterior. O pH das soluções de polieletrólitos foi ajustado para pH 3,0, com 1 M HCl ou 1 M NaOH. O meio de cultura LB-Miller foi obtido da VWR (USA). O ágar e a água estéril deionizada, para os ensaios bacteriológicos, foram adquiridos da VWR (USA). Bactérias monoclonais *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis* ATCC # 35984 (capazes de formar biofilmes)) foram utilizadas nos estudos. Todos os reagentes eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação anterior. Lâminas de vidro (VWR) pré-limpas foram utilizados como substratos. Placas Petri BD Falcon foram adquiridas da BD Biosciences (USA). Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore) com uma resistividade de 18,2 M $\Omega$ ·cm.

### 5.2.2 Preparação das PEMs

A preparação das PEMs foi realizada através do método de deposição *layer-by-layer* (LbL), de imersão alternada e sequencial, em soluções de polycations/ânions. Lâminas de vidro foram previamente recobertas com filmes de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> + 100 mM NaCl - antes da construção da região do filmes com os biopolímeros HA e CHI. Soluções de CHI e HA (ambos de marca Sigma, USA), na concentração de 1% (w/v) em água Milli-Q 18M $\Omega$ , foram ajustadas para pH 3,0 com soluções de 1 M HCl ou 1 M NaOH. Os filmes de multicamadas foram produzidos iniciando-se a deposição com HA sobre a superfície da pré-camada positiva de PDAC. Variou-se o número de bicamadas do filmes (2 e 3), mantendo a CHI como última camada depositada.

### 5.2.3 Teste de Proliferação de Bactérias – Ensaio *Waterborne*

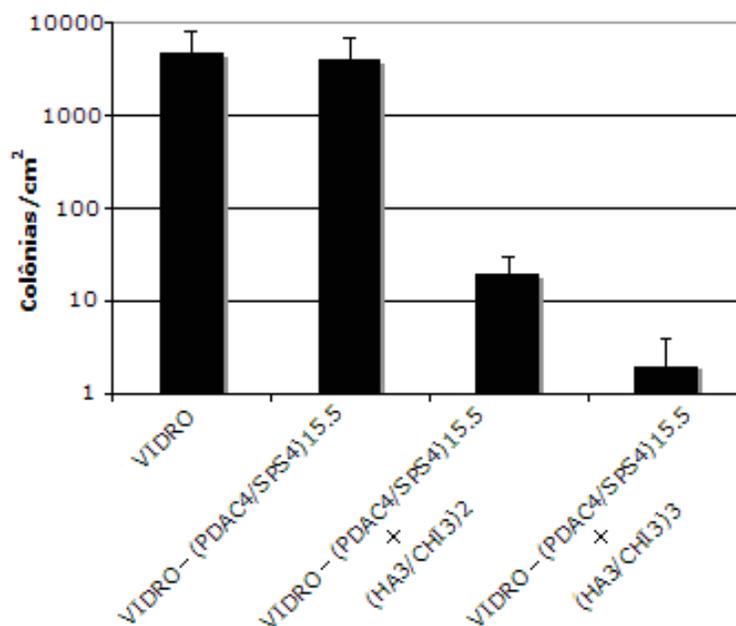
Ensaio de proliferação de bactérias, presentes em meios aquosos (*waterborne*), foram adaptados do protocolo estabelecido de Tiller *et al.* (TILLER *et al.*, 2001). O meio de cultivo Miller Luria-Bertani ou LB-Miller (VWR) foi inoculado com uma cepa monoclonal de uma cepa bacteriana escolhida com um *loop* estéril e incubado durante 24 horas, a 37°C, com leve agitação. Duas alíquotas de 50 mL de cultura bacteriana foram centrifugadas a uma frequência de 2700 RPM, durante 10 min, a 4°C; o meio de cultivo LB foi decantado, e os *pellets* bacterianos foram re-suspensas em PBS 150 mM NaCl (VWR). Após a re-suspensão, as células foram centrifugadas duas vezes (2700 RPM, 5 min) para assegurar a remoção completa do meio de cultivo LB, e foram re-suspensas, finalmente, em água Milli-Q, 18,2 MΩ·cm. A re-suspensão foi diluída com água de 10<sup>9</sup> células/mL (medida via densidade óptica) para obter suspensões com a requerida densidade celular (tipicamente de 10<sup>7</sup> células/mL para a cepa *S. Epidermidis*, em água). Amostras (em triplicata, para cada condição) foram colocadas em soluções bacterianas durante 4 horas à temperatura ambiente, e submetidas a três lavagens leves de água Milli-Q, 18 MΩ·cm. Amostras foram incubadas sob uma camada de gel de ágar com 1% LB, durante 24 horas. As colônias de bactérias foram contadas para determinar a habilidade de proliferação, em cada amostra, das bactérias viáveis. Para lâminas com alta densidade populacional de colônias, no mínimo 10 imagens digitais, por amostra, foram adquiridas com uma lente objetiva de 4x utilizando um microscópio invertido (Leica, Alemanha). Densidades das colônias foram determinadas normalizando o número médio de colônia, por imagem, com a área total da imagem calibrada. Amostras com poucas colônias bacterianas foram contadas a olho nú. A Figura 5.1 apresenta a representação esquemática dos ensaios *waterborne* de bactérias em filmes de PEMs.



**Figura 5.1.** Representação esquemática dos ensaios *waterborne* com bactérias em filmes de PEMs.

### 5.3 RESULTADOS

Lâminas de vidro sem recobrimento e outras recobertas com filmes de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>2</sub> e (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub> foram imersos durante 4 horas em uma diluição de 10<sup>7</sup> células de bactérias/mL (*S. epidermidis*). As amostras, contendo os filmes, e as lâminas de vidro - sem recobrimento - foram posteriormente recobertas com géis de 1% ágar e incubadas durante 24 horas. As amostras e as lâminas de vidro de controle (não recobertas) e com apenas a pré-camada (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> foram analisadas (a pré-camada de PDAC4/SPS4 promove uma melhor adesão das PEMs de CHI e HA – veja página 45). A contagem de colônias bacterianas nas diversas superfícies está apresentada na Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Ensaios *waterborne* com *S. epidermidis* mostrando nenhuma atividade antibacteriana em substratos de vidro sem recobrimento e em substratos recobertos com (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>2</sub> e (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub>, demonstrando uma redução da proliferação bacteriana de 90 e 99%, respectivamente, em comparação à lâmina de vidro controle e à lâmina de vidro recoberto apenas com a pré-camada (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub>.

Os resultados mostram que o recobrimento com (HA3/CHI3)<sub>2</sub> e (HA3/CHI3)<sub>3</sub> sobre uma pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub> proporcionou uma redução de proliferação bacteriana de aproximadamente 90 e 99%, respectivamente, em comparação com as lâminas de controle e as lâminas de vidro com a pré-camada (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub>.

A composição de PEMs com a CHI, portanto, apresentam menos bactérias no contato. Sua ação pode ser otimizada – pela escolha das condições de preparo quanto ao pH e à força iônica - aumentando-se a atividade antibacteriana das PEMs dos quais ela faz parte. No presente trabalho, a escolha do pH foi 3,0, diferente daquele dos demais trabalhos na área, que utilizaram pH 5,0. O pH 3,0 conduziu a melhores resultados do que os obtidos anteriormente, em vista do aumento das cargas positivas o que pode dificultar a proliferação bacteriana. Nessa condição, como já discutimos nos capítulos 3 e 4, a superfície do filme também apresenta mais *loops and tails* do polímero HA, que provavelmente promovem uma maior lubrificação da superfície e dificultam a colonização das bactérias.

É interessante destacar que os filmes (PDAC4/SPS4)<sub>15.5</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3</sub> são filmes com dupla funcionalidade - previnem a proliferação de bactérias, e ao mesmo tempo promovem a

adesão de células do sistema imunológico (células B), através da interação entre HA e receptores celulares CD-44 presentes em células do sistema imunológico (SWISTON *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2010).

Também foi observado que a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub> é importante para a formação de filmes de HA/CHI que sejam capazes de prevenir a proliferação bacteriana de uma forma efetiva. Ensaio posteriores mostraram que sistemas de HA/CHI e HA/CMC (ácido hialurônico/carboximetil celulose), sem a pré-camada de (PDAC4/SPS4)<sub>15,5</sub>, não eram significativamente resistentes à colonização de bactérias. Isso se deve ao fato destes filmes não aderirem ao substrato de uma forma uniforme, eficaz, como no caso da lâmina de vidro controle. Os filmes formados, sem a pré-camada, não recobrem a superfície por inteiro, como discutido no capítulo 3.

Testes antibacterianos também foram realizados com o sistema *backpack* para a adesão de linfócitos B (SWISTON *et al.*, 2008), (PMAA/PNIPAAm)<sub>80,5</sub>-(FITC-PAH/MNP)<sub>10</sub>-(HA3/CHI3)<sub>3,5</sub>, porém, estas amostras se mostraram com uma cor muito escura e a precisão na contagem de colônias de bactérias ficou comprometida.

#### 5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

PEMs de CHI e HA preparadas com pH 3,0 são excelentes recobrimentos para prevenir a proliferação de bactérias *S. epidermidis*, com resultados que apontam redução de até 99% de colônias bacterianas aderidas em substratos funcionalizados. Com isso, é possível produzir PEMs com dupla funcionalidade – com superfícies para a adesão seletiva de linfócitos B, e superfícies para evitar a proliferação de bactérias (superfícies antibacterianas). Estes filmes de PEMs tem grande potencial para aplicação nas áreas médicas, de saúde e de bioengenharia.

## 5.5 APÊNDICE

Apresentação do Trabalho (Pôster)

Vasconcellos, F. C., Beppu, M. M., Rubner, M. F., Multicamadas Antibacterianas de Filmes Finos de Biopolímeros, In: 2º Encontro sobre Estruturas Auto-organizadas em Soluções e Interfaces - AutoOrg, São Pedro, SP, 29 setembro - 1 outubro, 2010.

Vasconcellos, F. C., Beppu, M. M., Rubner, M. F., *Biopolymer Multilayers for Antibacterial Applications*, In: *Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials - COLAOB*, Gramado, RS, 17 - 20 agosto, 2010.

## CONCLUSÕES FINAIS

Alguns biopolímeros foram escolhidos para a produção de filmes de polieletrólitos com multicamadas (PEMs), devido a suas propriedades físico-químicas específicas e a sua biocompatibilidade. A técnica *layer-by-layer* (LbL), utilizada na produção dos filmes, possibilitou a formação das PEMs pela deposição sequencial e alternada de polieletrólitos de cargas opostas, sobre um substrato sólido.

PEMs produzidas com a técnica *layer-by-layer*, pela deposição dos biopolímeros quitosana (CHI) e ácido hialurônico (HA), se mostraram com a capacidade de imobilizar linfócitos B (células do sistema imunológico não aderentes), eficientemente. Quando os filmes de PEMs foram expostos aos linfócitos B durante uma hora, linfócitos B aderiram aos filmes, tanto em filmes com estruturas planas (com adesão da ordem de até  $1850 \pm 150$  células/mm<sup>2</sup>), como em filmes com estruturas padronizadas (com adesão de até 71% de células aderidas nos bastões disponíveis do padrão). Níveis superiores de imobilização puderam ser alcançados pela exposição mais prolongada dos linfócitos B aos filmes de PEMs.

PEMs de CHI/ALG produzidas com CHI associada ao polieletrólito alginato (ALG) – substituindo o HA e de mesma carga elétrica - não apresentaram a propriedade de adesão dos linfócitos B indicando, portanto, ser o HA é um componente fundamental na fabricação das PEMs que promovam essa adesão. O processo de adesão ocorre via interação do HA presente na superfície dos filmes com os receptores celulares CD44, presentes nos linfócitos B.

As PEMs funcionalizadas com os linfócitos B foram posteriormente desprendidas da superfície onde estavam depositadas, resultando em linfócitos equipados com *backpacks* (*mochilas*) (porções dos filmes PEMs aderidos às células) para uso de interesse. Os *backpacks* preparados e associados aos linfócitos podem ser incorporados com marcadores fluorescentes – importantes para imagens biológicas – e com nanopartículas superparamagnéticas – susceptíveis de serem deslocadas, juntamente com os linfócitos, para regiões de interesse via aplicação de campo magnético. Os linfócitos B mantiveram sua atividade biológica e capacidade de reprodução, mesmo quando aderidos às PEMs de CHI/HA.

Filmes PEMs de HA/CHI forma produzidos com 2 e 3 bicamadas, e posteriormente colocados em contato com a bactéria *S. epidermidis*. Foi observada uma redução de 90%, no crescimento da bactéria quando em contato com as PEMs de HA/CHI com 2 bicamadas e de até 99% quando em contato com as PEMs de HA/CHI com 3 bicamadas, em comparação com

o crescimento destas bactérias em lâminas de vidro sem recobrimento ou recobertas com apenas a pré-camada (PDAC4/SPS4)<sup>15,5</sup>.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a viabilidade da construção de filmes finos multicamadas à base de biopolímeros para uso na adesão de linfócitos B, e na fabricação de superfícies antibacterianas para a área de bionanotecnologia. Além da utilização de biopolímeros para a construção de filmes finos multicamadas, também foi possível utilizar diversos polímeros sintéticos para o mesmo fim, e incorporar nesses filmes, marcadores fluorescentes e nanopartículas. A tecnologia de *layer-by-layer*, utilizada, é de grande aplicabilidade, como foi constatado pelos experimentos realizados. A aplicação conjunta das técnicas, litográfica e de *layer-by-layer*, se mostrou muito versátil e poderosa para a produção de complexos nanoestruturados (*bottom-up* e *top-down approaches*). Portanto, é possível utilizar tanto abordagens *bottom-up* (*layer-by-layer*) como *top-down* (*litografia*) para criar nanoestruturas complexas de interesse. A combinação destas duas abordagens é de expressiva importância no futuro desenvolvimento da nanotecnologia.

Parte do trabalho desenvolvido foi realizado em colaboração com grupos experimentais ativos, e proeminentes em pesquisas, na área de PEMs e suas aplicações: com os grupos de pesquisa do Prof. Dr. Michael F. Rubner, do Departamento de Ciência dos Materiais e Engenharia (DMSE)/MIT, do Prof. Dr. Robert Cohen, do Departamento de Engenharia Química/MIT, além de outros do MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), EUA, no período de julho 2008 – agosto 2009 e com o grupo da Profa. Marisa Beppu do LEQUIP/UNICAMP, durante o período de março 2007 - abril 2011, no programa de doutoramento - bolsa-sanduiche, concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Processo # 1101-08-0.

Como produto adicional do trabalho, uma máquina automática de imersão para o processo LbL foi projetada e construída. A máquina, batizada *LbL Nanostructure Pro™*, está atualmente instalada e operacional no Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, e tem sido fundamental nos estudos sendo realizados pelo grupo do LEQUIP, nesta promissora área de pesquisa. A máquina desenvolvida é de grande interesse para vários grupos de pesquisa de nano e biotecnologia no Brasil.

A técnica *layer-by-layer* descrita e os resultados com ela obtidos demonstram expressivo potencial a ser explorado na produção de novos biomateriais e nanoestruturas complexas com inúmeras aplicações em diversas áreas do conhecimento.



## TRABALHOS FUTUROS E EM ANDAMENTO

Trabalhos e projetos futuros envolvem o estudo de:

- ✓ Sistemas de CHI/ALG e CHI/CMC e futuras aplicabilidades de superfícies biocompatíveis\*;
- ✓ Sistemas de ALG/CHI e HA/CHI unificados para a adesão de linfócitos\*;
- ✓ Separação de fases de PEMs com aquecimento ou autoclavagem\*;
- ✓ Construção de nanotubos e nanobastões e adesão de linfócitos *in vitro*\*;
- ✓ Preparação de PEMs com moléculas da flora brasileira para a área médica;
- ✓ Sistema de produção de PEMs com máquina automática de atomização\*;
- ✓ PEMs antibacterianas (utilizando outras cepas) e testes *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Incorporação de nanobastões de ouro em PEMs para o tratamento de câncer;
- ✓ Funcionalização de próteses em colaboração com o grupo de prototipagem rápida e biofabricação, BioFabris, Brasil;
- ✓ Estudos da influência da temperatura durante a preparação de PEMs.
- ✓ Modelagem molecular da deposição *layer-by-layer* e da formação de PEMs.

\*Trabalhos em andamento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N. e AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.100, n.1, p.5-28. 2004.
- AI, H., JONES, S. A. e LVOV, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.39, p. 23-43. 2003.
- ALLONGUE, P., COSTAKIELING, V. e GERISCHER, H. Etching of Silicon in NaOH Solutions. 1. In situ Scanning Tunneling Microscopic Investigation of N-Si (111). *Journal of the Electrochemical Society*, v.140, n.4, p.1009-1018. 1993.
- ANTIPOV, A. A., SHCHUKIN, D., FEDUTIK, Y., PETROV, A. I., SUKHORUKOV, G. B. e MÖHWALD, H. Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.224, n.1-3, p.175-183. 2003.
- ASSIS, O. B. G. e SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, p. 223-228. 2003.
- AZZAM, R. M. A., BASHARA, N. M. *Ellipsometry and Polarized Light*. North Holland Press, Amsterdam, 2<sup>nd</sup> Edition. 1987.
- BERG, M. C., ZHAI, L., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Controlled Drug Release from Porous Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules*, v.7, p. 357-364. 2006.
- BERG, M. C., YANG, S. Y., HAMMOND, P. T. e RUBNER, M. F. Controlling Mammalian Cell Interactions on Patterned Polyelectrolyte Multilayer Surfaces. *Langmuir*, v.20, n.4, p.1362. 2004.
- BONGAERTS, J. H. H., COOPER-WHITE, J. J., STOKES, J. R. Low Biofouling Chitosan-Hyaluronic Acid Multilayers with Ultra-Low Friction Coefficients. *Biomacromolecules*, v.10, p.1287-1294. 2009.
- BOUDOU, T., CROUZIER, T., REN, K., GUILLAUME, B. e PICART, C. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials*, v.22, p.441-467. 2010.
- BOULMEDAIS, F., FRISCH, B., ETIENNE, O., LAVALLE, P., PICART, C., OGIER, J., VOEGEL, J. C., SCHAFF, P. e EGLES, C. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials*, v.25, n.11, p.2003-2011. 2004.

- BRATSKAYA, S., MARININ, D., SIMON, F., SYNITSKA, A., ZSCHOCHÉ, S., BUSSCHER, H. J., JAGER, D. e VAN DER MEI, H. C. Adhesion and Viability of Two Enterococcal Strains on Covalently Grafted Chitosan and Chitosan/ $\kappa$ Carrageenan Multilayers. *Biomacromolecules*, v.8, n.9, p.2960-2968. 2007.
- BUNKER, B. C., TALLANT, D. R., HEADLEY, T. J., TURNER, G. L. e KIRKPATRICK, R. J. The structure of leached sodium borosilicate glass. *Physics and Chemistry of Glasses*, v. 29, n.3, p.106-120. 1988.
- CAI, K., HU, Y. e JANDT, K., D. . Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.82A, n.4, p.927-935. 2007.
- CAI, K., RECHTENBACH, A., HAO, J., BOSSERT, J. e JANDT, K. D. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, v.26, n.30, p.5960-5971. 2005.
- CARRILLO, J.-M. Y. e DOBRYNIN, A. V. Molecular Dynamics Simulations of Polyelectrolyte Adsorption. *Langmuir*, v.23, p.2472-2482. 2007.
- CARUSO, F., CARUSO, R. A. e MOHWALD, H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, v.282, n.5391, p.1111-1114. 1998.
- CASSIER, T., LOWACK, K. e DECHER, G. Layer-by-layer assembled protein/polymer hybrid films: nanoconstruction via specific recognition. *Supramolecular Science*, v.5, n.3-4, p.309-315. 1998.
- CASSINELLI, C., MORRA, M., PAVESIO, A. e RENIER, D. Evaluation of interfacial properties of hyaluronan coated poly(methylmethacrylate) intraocular lenses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.11, p.961-977. 2000.
- CASTELNOVO, M. e JOANNY, J.-F. Formation of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.16, p.7524-7532. 2000.
- CEBECI, F. Ç., WU, Z., ZHAI, L., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Nanoporosity-Driven Superhydrophilicity: A Means to Create Multifunctional Antifogging Coatings. *Langmuir*, v.22, p.2856-2862. 2006.
- CHIA, K.-K., RUBNER, M. F. e COHEN, R. E. pH-Responsive Reversibly Swellable Nanotube Arrays. *Langmuir*, v.25, n.24, p.14044-14052. 2009.
- CHIA, K.-K., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F., Amine-Rich Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for in Situ Gold Nanoparticle Synthesis. *Chemistry of Materials*, v.20, p.6756-6763. 2008.
- CHUA, P.-H., NEOH, K.-G., KANG, E.-T. e WANG, W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*, v.29, n.10, p.1412-1421. 2008.

- CHUANG, H. F., SMITH, R. C. e HAMMOND, P. T. Polyelectrolyte Multilayers for Tunable Release of Antibiotics. *Biomacromolecules*, v.9, n.6, p.1660-1668. 2008.
- CLARK, S. L. e HAMMOND, P. T. The Role of Secondary Interactions in Selective Electrostatic Multilayer Deposition. *Langmuir*, v.16, n.26, p.10206-10214. 2000.
- CLELAND, R. L., WANG, J. L. e DETWEILER, D. M. Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid. *Macromolecules*, v.15, n.2, p.386-395. 1982.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. e GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, v.284, n.5418, p.1318-1322. 1999.
- CROLL, T. I., O'CONNOR, A. J., STEVENS, G. W. e COOPER-WHITE, J. J. A Blank Slate? Layer-by-Layer Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan onto Various Surfaces. *Biomacromolecules*, v.7, n.5, p.1610-1622. 2006.
- CUI, X., LI, C. M., BAO, H., ZHENG, X. e LU, Z. In situ fabrication of silver nanoarrays in hyaluronan/PDDA layer-by-layer assembled structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.327, n.2, p.459-465. 2008.
- DAI, J. H. e BRUENING, M. L. Catalytic nanoparticles formed by reduction of metal ions in multilayered polyelectrolyte films. *Nano Letters*, v.2, n.5, p.497-501. 2002
- DAI, J., JENSEN, A. W., MOHANTY, D. K., ERNDT, J. e BRUENING, M. L. Controlling the Permeability of Multilayered Polyelectrolyte Films through Derivatization, Cross-Linking, and Hydrolysis. *Langmuir*, v.17, n.3, p.931-937. 2001.
- DECHER, G. e SCHLENOFF, J. B. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p.700. 2008.
- DECHER, G. e SCHLENOFF, J. B. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 2002. 2008.
- DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*, v.277, n.5330, p.1232-1237. 1997.
- DECHER, G., HONG, J. D. e SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v.210/211, p.831-835. 1992.
- DECHER, G. e SCHMITT, J. Fine-Tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Progress in Colloid Polymer Science*, v.89, p.160-164. 1992.

- DENUZIERE, A., FERRIER, D., DAMOUR, O. e DOMARD, A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*, v.19, n.14, p.1275-1285. 1998.
- DENUZIERE, A., FERRIER, D. e DOMARD, A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers*, v.29, n.4, p.317-323. 1996.
- DIASPRO, A., SILVANO, D., KROL, S., CAVALLERI, O. e GLIOZZI, A. Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir*, v.18, n.13, p.5047-5050. 2002.
- DONATH, E., SUKHORUKOV, G. B., CARUSO, F., DAVIS, S. A. e MÖHWALD, H. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. *Angewandte Chemie International Edition*, v.37, n.16, p.2201-2205. 1998.
- DUBAS, S. T. e SCHLENOFF, J. B. Swelling and Smoothing of Polyelectrolyte Multilayers by Salt. *Langmuir*, v.17, n.25, p.7725-7727. 2001.
- DUBAS, S. T. e SCHLENOFF, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules*, v.32, n.24, p.8153-8160. 1999.
- DURSTOCK, M. F. e RUBNER, M. F. Dielectric Properties of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.17, n.25, p.7865-7872. 2001.
- ELBERT, D. L., HERBERT, C. B. e HUBBELL, J. A. Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces. *Langmuir*, v.15, n.16, p.5355-5362. 1999.
- ELSABEE, M. Z., ABDU, E. S., NAGY, K. S. A. e EWEIS, M. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate Polymers*, v.71, n.2, p.187-195. 2008.
- ETIENNE, O., SCHNEIDER, A., TADDEI, C., RICHERT, L., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C., EGLES, C. e PICART, C. Degradability of Polysaccharides Multilayer Films in the Oral Environment: an in Vitro and in Vivo Study. *Biomacromolecules*, v.6, n.2, p.726-733. 2005.
- FAGNOLA, M., PAGANI, M. P., MAFFIOLETTI, S., TAVAZZI, S. e PAPAGNI, A. Hyaluronic acid in hydrophilic contact lenses: Spectroscopic investigation of the content and release in solution. *Contact Lens & Anterior Eye : The Journal of the British Contact Lens Association*, v.32, n.3, p.108-112. 2009.
- FARHAT, T. R. e SCHLENOFF, J. B. Ion Transport and Equilibria in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.17, n.4, p.1184-1192. 2001.

- FENG, Y., HAN, Z., PENG, J., LU, J., XUE, B., LI, L., MA, H. e WANG, E. Fabrication and characterization of multilayer films based on Keggin-type polyoxometalate and chitosan. *Materials Letters*, v.60, n.13-14, p.1588-1593. 2006.
- FENG, Q., ZENG, G., YANG, P., WANG, C. e CAI, J. Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.257-258, p.85-88. 2005.
- FENG, Q. L., WU, J., CHEN, G. Q., CUI, F. Z., KIM, T. N. e KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.52, n.4, p.662-668. 2000.
- FOU, A., ONITSUKA, O., FERREIRA, M., RUBNER, M. F. e HSIEH, B. Fabrication and Properties of Light-Emitting-Diodes Based on Self-Assembly Multilayers of Poly(Phenylene Vinylene). *Journal of Applied Physics*, v.79, p.7501-7509. 1996.
- FU, J., JI, J., YUAN, W. e SHEN, J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*, v.26, n.33, p.6684-6692. 2005.
- GRUNLAN, J. C., CHOI, J. K. e LIN, A. Antimicrobial Behavior of Polyelectrolyte Multilayer Films Containing Cetrimide and Silver. *Biomacromolecules*, v.6, n.2, p.1149-1153. 2004.
- HABERSKA, K. e RUZGAS, T. Polymer multilayer film formation studied by in situ ellipsometry and electrochemistry. *Bioelectrochemistry*, v.76, n.1-2, p.153-161. 2009.
- HABIB, S. B., GONZALEZ, E. e HICKS, R. F. Atmospheric oxygen plasma activation of silicon (100) surfaces. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, v.28, n.3, p.476-485. 2010.
- HALLAM, N. B., WEST, J. R., FORSTER, C. F. e SIMMS, J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research*, v.35, n.17, p.4063-4071. 2001.
- HE, J.-A., MOSURKAL, R., SAMUELSON, L. A., LI, L. e KUMAR, J. Dye-sensitized Solar Cell Fabricated by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly of Amphoteric TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Langmuir*, v.19, n.6, p.2169-2174. 2003.
- HILLBERG, A. L. e TABRIZIAN, M. Biorecognition through Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly: In-Situ Hybridization on Living Cells. *Biomacromolecules*, v.7, n.10, p.2742-2750. 2006.
- HILLER, J. A. e RUBNER, M. F. Reversible Molecular Memory and pH-Switchable Swelling Transitions in Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules*, v.36, n.11, p.4078-4083. 2003.
- HUCK, W. T. S., STROOCK, A. D. e WHITESIDES, G. M. Synthesis of Geometrically Well Defined, Molecularly Thin Polymer Films. *Angewandte Chemie International Edition*, v.39, n.6, p.1058-1061. 2000.

- ILER, R. K., Multilayers of Colloidal Particles. *Journal of Colloid Interface Science*, v.21, p.569-594. 1966.
- J. A. WOOLMAN CO., INC. *A Short Course in Ellipsometry*, 2001.
- JIN, W., TOUTIANOUSH, A. e TIEKE, B. Use of Polyelectrolyte Layer-by-Layer Assemblies as Nanofiltration and Reverse Osmosis Membranes. *Langmuir*, v.19, n.7, p.2550-2553. 2003.
- JOANNY, J. F. *Eur Phys Journal B*, v.9, p.117-122 .1999.
- JOLY, S., KANE, R., RADZILOWSKI, L., WANG, T., WU, A., COHEN, R. E., THOMAS, E. L. e RUBNER, M. F. Multilayer Nanoreactors for Metallic and Semiconducting Particles. *Langmuir*, v.16, n.3, p.1354-1359. 2000.
- KATSIKOIANNI, M. e MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions *European Cells and Materials*, v.8, p.37-57. 2004.
- KIDAMBI, S., UDPA, N., SCHROEDER, S. A., FINDLAN, R. e LEE, I. Cell Adhesion on Polyelectrolyte Multilayer Coated Polydimethylsiloxane Surfaces with Varying Topographies. *Tissue Engineering*, v.13, n.8, p.2105-2117. 2007.
- KIM, H., COHEN, R., HAMMOND, T. e IRVINE, D. Live Lymphocyte Arrays for Biosensing. *Advanced Functional Materials*, v.16, n.10, p.1313-1323. 2006.
- KIM, H., DOH, J., IRVINE, D. J., COHEN, R. E., HAMMOND, P. T. Large Area Two-Dimensional B Cell Arrays for Sensing and Cell-Sorting Applications. *Biomacromolecules*, vol.5, n.3, p.822-827. 2004 A.
- KIM, S. J., SHIN, S. R., LEE, K. B., PARK, Y. D. e I. KIM, S. Synthesis and characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, v.91, n.5, p.2908-2913. 2004 B.
- KLEFENZ, H. *Nanobiotechnology: From Molecules to Systems*. *Engineering in Life Sciences*, v.4, n.3, p.211-218. 2004.
- KOTZ, J. *Polyelectrolyte Complexes (Overview)*. Boca Raton, Fl.: CRC Press, Inc. 1996.
- KOVACEVIC, D., BURGH, S. V. D., KEIZER, A. D. e STUART, M. A. C. Kinetics of Formation and Dissolution of Weak Polyelectrolyte Multilayers: Role of Salt and Free Polyions. *Langmuir*, v.18, n.14, p. 5607-5612. 2002.
- KRASEMANN, L., TOUTIANOUSH, A. e TIEKE, B. Self-assembled polyelectrolyte multilayer membranes with highly improved pervaporation separation of ethanol/water mixtures. *Journal of Membrane Science*, v.181, n.2, p.221-228. 2001.

- KROL, S., NOLTE, M., DIASPRO, A., MAZZA, D., MAGRASSI, R., GLIOZZI, A. e FERY, A. Encapsulated Living Cells on Microstructured Surfaces. *Langmuir*, v.21, n.2, p.705-709. 2005.
- KRUTYAKOV, Y. A., KUDRINSKIY, A. A., OLENIN, A. Y. e LISICHKIN, G. V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, v.77, p.233-257. 2008.
- KUJAWA, P., SCHMAUCH, G., VIITALA, T., BADIA, A., WINNIK, F. M. Construction of Viscoelastic Biocompatible Films via the Layer-by-Layer Assembly of Hyaluronan and Phosphorylcholine-Modified Chitosan. *Biomacromolecules*, v. 8, n.10, p.3169-3176. 2007.
- KUJAWA, P. MORAILLE, P., SANCHEZ, J., BADIA, A. e WINNIK, F. M. Effect of Molecular Weight on the Exponential Growth and Morphology of Hyaluronan/Chitosan Multilayers: A Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Investigation. *Journal of the American Chemical Society*, v.127, p.9224-9234. 2005.
- KUMAR, M. N. V. R., MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H. e DOMB, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, n.12, p.6017. 2004.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v.46, n.1, p.1-27. 2000.
- KURTH, D. G., VOLKMER, D., KLITZING, R. V., DECHER, G., SCHLENOFF, J. B. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p.393-397. 2002.
- LAČPÍK JR., L., LAČPÍK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTER, J. e CHABREČEK, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*, v.98, n.8, p.2663-2684. 1998.
- LADAM, G., SCHAAD, P., VOEGEL, J. C., SCHAAF, P., DECHER, G. e CUISINIER, F. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.16, n.3, p.1249-1255. 2000.
- LAJIMI, R. H., ABDALLAH, A. B., FERJANI, E., ROUDESLI, M. S. e DERATANI, A. Change of the performance properties of nanofiltration cellulose acetate membranes by surface adsorption of polyelectrolyte multilayers. *Desalination*, v.163, n.1-3, p.193-202. 2004.
- LAUGEL, N., BETSCHA, C., WINTERHALTER, M., VOEGEL, J. C., SCHAAF, P. e BALL, V. Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, n.39, p.19443-19449. 2006.

- LEE, H., LEE, Y., STATZ, A. R., RHO, J., PARK, T. G. e MESSERSMITH, P. B. Substrate-Independent Layer-by-Layer Assembly by Using Mussel-Adhesive-Inspired Polymers. *Advanced Materials*, v.20, n.9, p.1619-1623. 2008.
- LEE, D., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Heterostructured Magnetic Nanotubes. *Langmuir*, v.23, n.1, p.123-129. 2007.
- LEE, D., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Antibacterial Properties of Ag Nanoparticle Loaded Multilayers and Formation of Magnetically Directed Antibacterial Microparticles. *Langmuir*, v.21, n.21, p.9651-9659. 2005.
- LEPORATTI, S., VOIGT, A., MITLÖHNER, R., SUKHORUKOV, G., DONATH, E. e MÖHWALD, H. Scanning Force Microscopy Investigation of Polyelectrolyte Nano- and Microcapsule Wall Texture. *Langmuir*, v.16, n.9, p.4059-4063. 2000.
- LI, Z., LEE, D., SHENG, X., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities. *Langmuir*, v.22, n.24, p.9820-9823. 2006.
- LICHTER, J. A., VAN VLIET, K. J. e RUBNER, M. F. Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform. *Macromolecules*, v.42, n.22, p.8573-8586. 2009.
- LICHTER, J. A. e RUBNER, M. F. Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations. *Langmuir*, v.25, n.13, p.7686-7694. 2009.
- LICHTER, J. A., THOMPSON, M. T., DELGADILLO, M., NISHIKAWA, T., RUBNER, M. F. e VAN VLIET, K. J. Substrata Mechanical Stiffness Can Regulate Adhesion of Viable Bacteria. *Biomacromolecules*, v.9, n.10, p.2967-2967. 2008.
- LIU, Y., LU, H., ZHONG, W., SONG, P., KONG, J., YANG, P., GIRAULT, H. H., LIU, B. Multilayer-Assembled Microchip for Enzyme Immobilization as Reactor Toward Low-Level Protein Identification. *Analytical Chemistry*, v.78, p.801-808. 2006.
- LOWMAN, G. M., TOKUHISA, H., LUTKENHAUS, J. L. e HAMMOND, P. T. Novel Solid-State Polymer Electrolyte Consisting of a Porous Layer-by-Layer Polyelectrolyte Thin Film and Oligoethylene Glycol. *Langmuir*, v.20, n.22, p.9791-9795. 2004.
- LU, H. e HU, N. Loading Behavior of {Chitosan/Hyaluronic Acid}<sub>n</sub> Layer-by-Layer Assembly Films toward Myoglobin: An Electrochemical Study. *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, p.23710-23718. 2006.
- MAEHARA, Y., TAKENAKA, S., SHIMIZU, K., YOSHIKAWA, M. e SHIRATORI, S. Buildup of multilayer structures of organic-inorganic hybrid ultra thin films by wet process. *Thin Solid Films*, v.438-439, p.65-69. 2003.

- MALCHER, M., VOLODKIN, D., HEURTAULT, B., ANDREA, P., SCHAAF, P., MOHWALD, H., VOEGEL, J.-C., SOKOLOWSKI, A., BALL, V., BOULMEDAIS, F. e FRISCH, B. Embedded Silver Ions-Containing Liposomes in Polyelectrolyte Multilayers: Cargos Films for Antibacterial Agents. *Langmuir*, v.24, n.18, p.10209-10215. 2008.
- MAO, Z., MA, L., GAO, C. e SHEN, J. Preformed microcapsules for loading and sustained release of ciprofloxacin hydrochloride. *Journal of Controlled Release*, v.104, n.1, p.193-202. 2005.
- MARX, K. A. Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules*, v.4, n.5, p.1099-1120. 2003.
- MATTOUSSI, H., RUBNER, M. F., ZHOU, F., KUMAR, J., TRIPATHY, S. K. e CHIANG, L. Y. Photovoltaic heterostructure devices made of sequentially adsorbed poly(phenylene vinylene) and functionalized C60. *Applied Physics Letters*, v.77, n.10, p.1540-1542. 2000.
- MECKING, S. e THOMANN, R. Core-Shell Microspheres of a Catalytically Active Rhodium Complex Bound to a Polyelectrolyte-Coated Latex. *Advanced Materials*, v.12, n.13, p.953-956. 2000.
- MENDELSON, J. D., YANG, S. Y., HILLER, J. A., HOCHBAUM, A. I. e RUBNER, M. F. Rational Design of Cytophilic and Cytophobic Polyelectrolyte Multilayer Thin Films. *Biomacromolecules*, v.4, n.1, p.96-106. 2002.
- MENDELSON, J. D., BARRETT, C. J., CHAN, V. V., PAL, A. J., MAYES, A. M. e RUBNER, M. F. Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.16, n.11, p.5017-5023. 2000.
- MESSINA, R. Polyelectrolyte multilayering on a charged planar surface. *Macromolecules*, v.37, p.621-629. 2004
- MICHEL, M., TAYLOR, A., SEKOL, R., PODSIADLO, P., HO, P., KOTOV, N. e THOMPSON, L. High-Performance Nanostructured Membrane Electrode Assemblies for Fuel Cells Made by Layer-By-Layer Assembly of Carbon Nanocolloids. *Advanced Materials*, v.19, n.22, p.3859-3864. 2007.
- MITCHELL, D. T., LEE, S. B., TROFIN, L., LI, N., NEVANEN, T. K., SODERLUND, H. e MARTIN, C. R. Smart Nanotubes for Bioseparations and Biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, v.124, n.40, p.11864-11865. 2002.
- MÖHWALD, H. From Langmuir monolayers to nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.171, n.1-3, p.25-31. 2000.
- NOLTE, A. J., RUBNER, M. F. e COHEN, R. E. Creating Effective Refractive Index Gradients within Polyelectrolyte Multilayer Films: Molecularly Assembled Rugate Filters. *Langmuir*, v.20, n.8, p.3304-3310. 2004.

- NOROWSKI, P. A. e BUMGARDNER, J. D. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.88B, n.2, p.530-543. 2009.
- OFEK, K., HASTY, D. L. e DOYLE, R. J. *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissue*. ASM Press, Washington D.C. 2003.
- PALMER, J., FLINT, S. e BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology*, v.34, n.9, p.577-588. 2007.
- PARK, S., RUBNER, M. F. e MAYES, A. M. Free Energy Model for Layer-by-Layer Processing of Polyelectrolyte Multilayer Films. *Langmuir*, v.18, p.9600-9604. 2002.
- PATEL, P.A., JEON, J., MATHER, P. T., DOBRYNIN, A. V. Molecular Dynamics Simulations of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes at Charged Surfaces: Effects of Chain Degree of Polymerization and Fraction of Charged Monomers. *Langmuir*, v. 21, p. 6113-6122. 2005.
- PICART, C., SCHNEIDER, A., ETIENNE, O., MUTTERER, J., SCHAAF, P., EGLES, C., JESSEL, N. e VOEGEL, J. C. Controlled Degradability of Polysaccharide Multilayer Films In Vitro and In Vivo. *Advanced Functional Materials*, v.15, n.11, p.1771-1780. 2005.
- PORCEL, C., LAVALLE, P., DECHER, G., SENGER, B., VOEGEL, J. C. e SCHAAF, P. Influence of the Polyelectrolyte Molecular Weight on Exponentially Growing Multilayer Films in the Linear Regime. *Langmuir*, v.23, n.4, p.1898-1904. 2007.
- PORCEL, C., LAVALLE, P., BALL, V., DECHER, G., SENGER, B., VOEGEL, J.-C. e SCHAAF, P. From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, v.22, n.9, p.4376-4383. 2006.
- RABEA, E. I., BADAWY, M. E. T., STEVENS, C. V., SMAGGHE, G. e STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, v.4, n.6, p.1457-1465. 2003.
- RICHERT, L., LAVALLE, P., PAYAN, E., SHU, X. Z., PRESTWICH, G. D., STOLTZ, J.-F., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C. e PICART, C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir*, v.20, n.2, p.448-458. 2004 A.
- RICHERT, L., ENGLER, A. J., DISCHER, D. E. e PICART, C. Elasticity of Native and Cross-Linked Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules*, v.5, n.5, p.1908. 2004 B.
- RICHERT, L., LAVALLE, P., VAUTIER, D., SENGER, B., STOLTZ, J. F., SCHAAF, P., VOEGEL, J. C. e PICART, C. Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules*, v.3, n.6, p.1170-1178. 2002.

- RIDER, T. H., PETROVICK, M. S., NARGI, F. E., HARPER, J. D., SCHWOEBEL, E. D., MATHEWS, R. H., BLANCHARD, D. J., BORTOLIN, L. T., YOUNG, A. M., CHEN, J. e HOLLIS, M. A. A B Cell-Based Sensor for Rapid Identification of Pathogens. *Science*, v.301, n.5630, p.213-215. 2003.
- RIEDL, C., R., WITKOWSKI, M., PLAS, E. e PFLUEGER, H. Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a preliminary report. *International journal of antimicrobial agents*, v.19, n.6, p.507-510. 2002.
- RINAUDO, M., PAVLOV, G. e DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, v.40, n.25, p.7029-7032. 1999.
- RMAILE, H. H. e SCHLENOFF, J. B. Optically Active Polyelectrolyte Multilayers as Membranes for Chiral Separations. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, n.22, p.6602-6603. 2003.
- ROBERTS, G. *Chitin Chemistry*. London: The Macmillian Press. 1992
- RUBNER, M. F., *Comunicação Pessoal*, 2009.
- SANTOS, J. E. D., SOARES, J. D. P., DOCKAL, E. R., CAMPANA FILHO, S. P. e CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, v.13, p.242-249. 2003.
- SALOMAKI, M. e KANKARE, J. Influence of Synthetic Polelectrolyte on the Growth and Properties of Hyaluronan-Chitosan Multilayers. *Biomacromolecules*, v.10, p.294-301. 2009.
- SCHLENOFF, J. B. e DUBAS, S. T. Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution. *Macromolecules*, v.34, n.3, p.592-598. 2001.
- SCHNEIDER, A., PICART, C., SENGER, B., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C. e FRISCH, B. Layer-by-Layer Films from Hyaluronan and Amine-Modified Hyaluronan. *Langmuir*, v.23, n.5, p.2655-2662. 2007 A.
- SCHNEIDER, A., VODOUHE, C., RICHERT, L., FRANCIUS, G., LE GUEN, E., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C., FRISCH, B. e PICART, C. Multifunctional Polyelectrolyte Multilayer Films: Combining Mechanical Resistance, Biodegradability, and Bioactivity. *Biomacromolecules*, v.8, n.1, p.139-145. 2007 B.
- SCHNEIDER, A., RICHERT, L., FRANCIUS, G., VOEGEL, J.-C. e PICART, C. Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films. *Biomedical Materials*, v.2, n.1, p.S45-S51. 2007 C.
- SCRANTON, A. B., RANGARAJAN, B. e KLIER, J. Biomedical applications of polyelectrolytes. In: (Ed.): Springer Berlin / Heidelberg, 1995. Biomedical applications of polyelectrolytes. (*Advances in Polymer Science*)

- SHAFIR, A., ANDELMAN, D., NETZ, R. R. Adsorption and depletion of polyelectrolytes from charged surfaces. *Journal of Chemical Physics*, v.119, n.4, p.2355-2362. 2003.
- SHAIKH MOHAMMED, J., DECOSTER, M. A. e MCSHANE, M. J. Fabrication of Interdigitated Micropatterns of Self-Assembled Polymer Nanofilms Containing Cell-Adhesive Materials. *Langmuir*, v.22, n.6, p.2738-2746. 2006.
- SHAIKH MOHAMMED, J., DECOSTER, M. A. e MCSHANE, M. J. Micropatterning of Nanoengineered Surfaces to Study Neuronal Cell Attachment in Vitro. *Biomacromolecules*, v.5, n.5, p.1745-1755. 2004.
- SHIMAZAKI, Y., NAKAMURA, R., ITO, S. e YAMAMOTO, M. Molecular Weight Dependence of Alternate Adsorption through Charge-Transfer Interaction. *Langmuir*, v.17, n.3, p.953-956. 2000.
- SHIRATORI, S. S. e RUBNER, M. F. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*, v.33, n.11, p.4213-4219. 2000.
- SILVANO, D., KROL, S., DIASPRO, A., CAVALLERI, O. e GLIOZZI, A. Confocal laser scanning microscopy to study formation and properties of polyelectrolyte nanocapsules derived from CdCO<sub>3</sub> templates. *Microscopy Research and Technique*, v.59, n.6, p.536-541. 2002.
- SRIVASTAVA, S. e KOTOV, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. *Accounts of Chemical Research*, v.41, n.12, p.1831-1841. 2008.
- STEWART, P. S. e COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, v.358, n.9276, p.135-138. 2001.
- STOCKTON, W. B. e RUBNER, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules*, v.30, n.9, p.2717-2725. 1997.
- SUCH, G. K., JOHNSTON, A. P. R., CARUSO, F. Engineered hydrogen-bonded polymer multilayers: from assembly to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, v.40, p.19-29. 2011.
- SUKHORUKOV, G. B., DONATH, E., LICHTENFELD, H., KNIPPEL, E., KNIPPEL, M., BUDDE, A. e MOHWALD, H. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.137, n.1-3, p.253-266. 1998.
- SVALDO-LANERO, T., KROL, S., MAGRASSI, R., DIASPRO, A., ROLANDI, R., GLIOZZI, A. e CAVALLERI, O. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy*, v.107, n.10-11, p.913-921. 2007.

- SVALDO-LANERO, T., CAVALLERI, O., KROL, S., ROLANDI, R. e GLIOZZI, A. Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *Journal of Biotechnology*, v.124, n.4, p.723-731. 2006.
- SWISTON, A. J., CHENG, C., UM, S. H., IRVINE, D. J., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Surface Functionalization of Living Cells with Multilayer Patches. *Nano Letters*, v.8, n.12, p.4446-4453. 2008.
- TAN, W., DESAI, T. A. Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures. *Biomaterials*, v.25, p.1355-1364. 2004.
- TANG, Z., WANG, Y., PODSIADLO, P. e KOTOV, N. A. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Advanced Materials*, v.18, n.24, p.3203-3224. 2006.
- TAO, X., CHEN, H., SUN, X.-J., CHEN, J.-F. e ROA, W. H. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin loaded in self-assembled bio-polyelectrolyte microshells. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, n.2, p.376-381. 2007.
- THIERRY, B., WINNIK, F. M., MERHI, Y., SILVER, J. e TABRIZIAN, M. Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules*, v.4, n.6, p.1564-1571. 2003.
- THOMPSON M. T., BERG, M. C., TOBIAS, I. S., RUBNER, M. F. e VLIET, K. J. V. V. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. *Biomaterials*, v.26, p.6836-6845. 2005.
- TILLER, J. C., LIAO, C.-J., LEWIS, K. e KLIBANOV, A. M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.11, May 22, 2001, p.5981-5985. 2001.
- UNDERHILL, C. CD44: The hyaluronan receptor. *Journal of Cell Science*, v.103, p.293-298. 1992.
- ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, v.47, n.7, p.2217-2262. 2006.
- VASCONCELLOS, F. C., SWISTON, A. J., BEPPU, M. M., COHEN, R. E. e RUBNER, M. F. Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: Hyaluronic Acid Mediated B Lymphocyte Adhesion. *Biomacromolecules*, v.11, n.9, p.2407-2414. 2010.
- VASCONCELLOS, F. C., GOULART, G. A. S., BEPPU, M. M., Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. *Powder Technology*, v.205, p. 65-70, 2011.
- VENANZI, D. C., PAVINATTO, F. J., BALOGH, D. T., OLIVEIRA JR, O. N. e CARVALHO, A. J. F. Self-standing LBL thin films of chitosan/carboxymethylcellulose complexes. .

- International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures - ISAMN. Porto de Galinhas, Brazil: Book of Abstracts ICSM 2008: 93 p. 2008.
- VON KLITZING, R. Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v.8, n.43, p. 5012-5033. 2006.
- VUILLAUME, P. Y., GLINEL, K., JONAS, A. M. e LASCHEWSKY, A. Ordered Polyelectrolyte "Multilayers". 6. Effect of Molecular Parameters on the Formation of Hybrid Multilayers Based on Poly(Diallylammonium) Salts and Exfoliated Clay. *Chemistry of Materials*, v.15, n.19, p.3625-3631. 2003.
- WANG, T. C., RUBNER, M. F. e COHEN, R. E. Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites: Controlling Metal Concentration and Nanoparticle Size. *Langmuir*, v.18, n.8, p.3370-3375. 2002.
- WHITEMAN, P. The Quantitative Measurement of Alcian Blue-Glycosaminoglycan Complexes. *Biochem. J.*, v.131, p.343-350. 1973.
- WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Amsterdam; New York: Elsevier. 1987 (Progress in Biomedical Engineering)
- WILSON, J. T., CUI, W., SUN, X.-L., TUCKER-BURDEN, C., WEBER, C. J. e CHAIKOF, E. L. In vivo biocompatibility and stability of a substrate-supported polymerizable membrane-mimetic film. *Biomaterials*, v.28, n.4, p.609-617. 2007.
- WU, A., YOO, D., LEE, J. K. e RUBNER, M. F. Solid-State Light-Emitting Devices Based on the Tris-Chelated Ruthenium(II) Complex: High Efficiency Devices via a Layer-by-Layer Molecular-Level Blending Approach. *Journal of the American Chemical Society*, v.121, n.20, p.4883-4891. 1999.
- WU, M.-Y., CHEN, N., LIU, L.-K., YUAN, H, LI, Q.-L. e CHEN, S.-H. Chitosan/Alginate Multilayer Scaffold Encapsulating Bone Marrow Stromal Cells *In Situ* on Titanium. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.24, p301-315. 2009.
- YAN, L., HUCK, W. T. S., ZHAO, X.-M. e WHITESIDES, G. M. Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) on a Reactive SAM Using Microcontact Printing. *Langmuir*, v.15, n.4, p.1208-1214. 1999.
- YANG, Y., HE, Q., DUAN, L., CUI, Y. e LI, J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*, v.28, n.20, p.3083-3090. 2007.
- YE, S., WANG, C., LIU, X. e TONG, Z. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *Journal of Controlled Release*, v.106, n.3, p.319-328. 2005 A.

- YE, S., WANG, C., LIU, X. e TONG, Z. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.16, n.7, p.909-923. 2005 B.
- YOO, D., SHIRATORI, S. S. e RUBNER, M. F. Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*, v.31, n.13, p.4309-4318. 1998.
- YUAN, W., JI, J., FU, J. e SHEN, J. A facile method to construct hybrid multilayered films as a strong and multifunctional antibacterial coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.85B, n.2, p.556-563. 2008.
- ZHENG, H., BERG, M. C., RUBNER, M. F. e HAMMOND, P. T. Controlling Cell Attachment Selectively onto Biological Polymer - Colloid Templates Using Polymer-on-Polymer Stamping. *Langmuir*, v.20, n.17, p.7215-7222. 2004.
- VAN VLIET, K., ZEIGER, A.S., VASCONCELLOS, F.C., RUBNER, M.F.; Department of Materials Science and Engineering, Massachusetts Institute of Technology 2010, colaboração e estudo ainda não publicado.

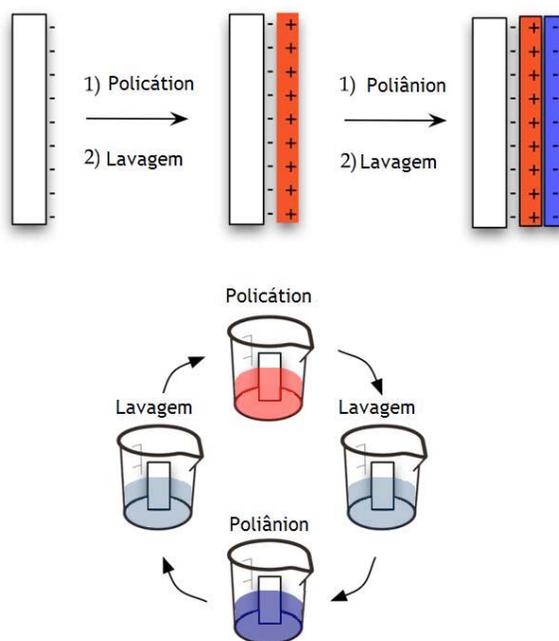


## ANEXO I

### SISTEMA-MÁQUINA AUTOMÁTICA DE IMERSÃO PARA A TÉCNICA *LAYER-BY-LAYER*

#### A.0 INTRODUÇÃO

Este anexo descreve a invenção desenvolvida durante o projeto de doutorado de forma a viabilizar a produção de PEMs no LEQUIP (FEQ-UNICAMP), baseado nas experiências de uso de outros sistemas de imersão durante o doutorado-sanduíche do autor da tese. Aqui, apresenta-se o projeto e a construção de uma máquina automática de imersão (*spin dipper*) para a produção de filmes finos nanoestruturados, através da técnica de deposição *layer-by-layer* (camada-a-camada). A técnica LbL é baseada na deposição sequencial e alternada de componentes de cargas opostas, (ex. um polycátion e um poliânion) sobre um substrato, a partir de soluções aquosas, ou a partir de outros meios de interação, tais como ligações chave-fechadura, ligações covalentes, etc. A Figura A.1 apresenta, esquematicamente, o processo.



**Figura A.1.** Representação esquemática do processo de deposição *layer-by-layer*.

O sistema tem sido utilizado para a preparação de filmes finos de multicamadas nanoestruturados, constituídos de polímeros sintéticos e de biopolímeros.

Cada etapa de deposição é tipicamente seguida por uma etapa de lavagem e/ou de secagem. O processo de deposição é repetido até atingir o número desejável de bicamadas. As características das bicamadas, e do filme como um todo, podem ser ajustadas através da variação de parâmetros do processo de deposição, tais como tipo de cátion ou ânion, e propriedades das soluções tais como a concentração, força iônica e pH (DUBAS & SCHLENOFF, 1999). As camadas presentes nos filmes nanoestruturados não são camadas individuais, e sim camadas interpenetradas (DECHER, 1997). A habilidade de controlar as características do filme na faixa nanométrica, em condições ambientes, fez com que a técnica LbL fosse vista como muito promissora em diversas áreas de pesquisa. A técnica LbL vem sendo utilizada para a produção de nanomateriais para uma variedade de aplicações incluindo recobrimentos antibacterianos (LITCHER *et al.*, 2009), recobrimentos anti-reflexo (HILLER *et al.*, 2002), filmes para a adesão de linfócitos B (SWISTON *et al.*, 2009; VASCONCELLOS *et al.*, 2010), funcionalização de arcabouços (TANG *et al.*, 2006), para aplicações na área de engenharia tecidual, e na preparação de superfícies funcionais de membranas (ULBRICHT, 2006), para processos de separação de biomacromoléculas e aplicações com células-combustível (MICHEL *et al.*, 2007), dentre outras.

### **A.1 Fundamentos da Invenção**

Apesar da existência de equipamentos robóticos, personalizados, para a deposição *layer-by-layer* de nanocomponentes, é desconhecida a construção de uma estrutura fechada com grande versatilidade de opções de imersão e posições para posicionar as soluções, energizada somente com força elétrica, motores, e software personalizado e apresentando uma grande variedade de opções de processamento.

Esta invenção apresenta uma máquina de imersão automática, totalmente personalizada, com altas capacidades de suportes para soluções, sem a necessidade de um sistema pneumático para funcionar. Este sistema é operado através de um software personalizado que permite ao usuário pré-programar o número de camadas, os tempos de deposição, secagem, e a frequência de agitação do porta-amostra, para cada etapa de imersão. A máquina de imersão automática foi utilizada para construir tanto filmes

nanoestruturados de multicamadas de polímeros sintéticos (poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC) e poliestireno sulfonato de sódio (SPS)), quanto filmes de biopolímeros (quitosana (CHI), alginato (ALG), ácido hialurônico (HA), e carboximetilcelulose (CMC)).

## A.2 Projeto e Construção da Máquina Automática LbL Nanostructure Pro

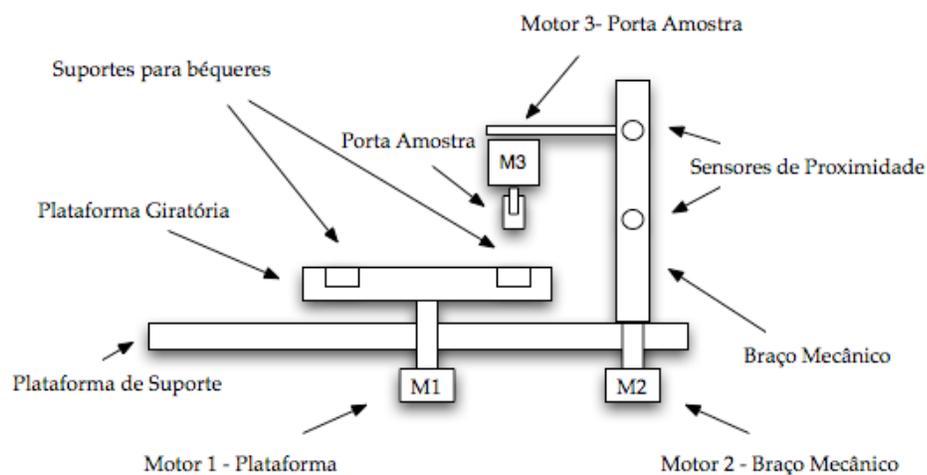
O sistema da nova máquina de imersão (LbL Nanostructure Pro<sup>TM</sup>) é apresentado na Figura A.2. A estrutura do equipamento é constituída de painéis e suportes de alumínio revestidos com tinta eletrostática. A base estrutural principal é de aço inox 316, para fornecer à máquina uma maior estabilidade e maior resistência à corrosão. A plataforma giratória que acomoda os béqueres, contendo as soluções, é construída com alumínio e girada com precisão por motores elétricos.



**Figura A.2.** Imagem do sistema da máquina automática de imersão.

A Figura A.3 mostra um desenho esquemático do sistema da máquina automática de imersão. O sistema da máquina automática de imersão é controlado através de um controlador lógico programável (CLP), podendo ser acionado, tanto automaticamente quanto manualmente, através do painel de controle. A plataforma giratória é acoplada à uma eixo mecânico personalizado. A plataforma giratória padrão suporta oito béqueres de 150, 250, 400, ou 600 mL, porém o número de posições pode ser aumentado, e é apenas limitado pelo diâmetro dos béqueres e pelo tamanho da plataforma. Como a plataforma é feita de alumínio, ela pode ser usinada para diversos tamanhos de béqueres como, por exemplo, de 5, 10 e 50 mL, principalmente quando reagentes caros são utilizados para construir os filmes

nanoestruturados. O porta-amostra é acoplado a um motor elétrico que permite girar/agitar as amostras, durante o processo de imersão, o que tipicamente conduz a nanoestruturas mais ordenadas, em comparação com filmes que são preparados sem agitação das amostras durante o processo LbL.



**Figura A.3.** Desenho esquemático do sistema da máquina automática de imersão.

O porta-amostra padrão possui apenas quatro montagens para lâminas de vidro. Porta-amostras para acomodar tanto um número maior de amostras quanto amostras maiores, foram incorporados ao presente modelo. O porta amostra é acoplado a um segundo eixo mecânico que se movimenta na direção z, permitindo controlar a velocidade do movimento do braço e tempos de imersão. O eixo mecânico também é acionado através de um motor elétrico e controlado através de um CLP e painel de controle, que é exibido em uma tela de um computador. Um visor de nível é instalado dentro do instrumento para facilitar a sua instalação na posição horizontal, equilibrada. A máquina é uma estrutura auto contida, que isola o procedimento de imersão do ambiente externo, protegendo assim os substratos e as soluções contra possíveis contaminações. A estrutura da máquina tem a opção de ser equipada com um filtro de ar (ex. HEPA) ou filtro *hazmat* v. A plataforma giratória, que suporta os béqueres/recipientes com a soluções de imersão, tem potencial para girar com praticamente qualquer combinação, em número e tamanho, de béqueres/recipientes, mostrando máxima versatilidade na sua utilização.

### A.3 Operação do Equipamento LbL Nanostructure Pro

A máquina automática de imersão é operada completamente através de um software personalizado e proprietário. O sistema é controlado através de um controlador lógico programável (CLP) e uma interface personalizada para uma operação fácil; versão 2.0 apresentada na Figura A.4.



**Figura A.4.** Interface personalizada para controle do sistema da máquina automática de imersão.

O software permite que o usuário escolha o número de etapas de imersão (0-999 camadas), tempos de imersão, frequência de rotação do porta-amostra durante a imersão ou secagem (0-150Hz), e tempos de secagem. O motor elétrico para a opção de girar o porta-amostra foi calibrado. O software do sistema disponibiliza para o usuário as horas de início e término de cada corrida de preparação. Receitas específicas, de preparo, podem ser salvas no diretório do software para efetuar um início rápido do processo, além de futuro uso.

Para preparar a máquina automática de imersão para o produção de filmes, o usuário precisa efetuar os seguintes passos: primeiro preencher os béqueres ou recipientes com as soluções de imersão de interesse; acoplar os substratos ao porta-amostra, e o porta-amostra ao

braço mecânico. O braço mecânico tem dois sensores de proximidade de metal, o que permite ao usuário verificar e ajustar a distância entre o substrato e o fundo dos recipientes contendo as soluções. Uma vez que os parâmetros de número de camadas, tempo de imersão, opção de rotação do porta-amostra estão especificados no programa de software, e a corrida iniciada, a máquina automática de imersão não requer mais nenhuma supervisão até que o processo termine.

#### **A.4 Produção de Filmes Nanoestruturados com LbL Nanostructure Pro**

Uma máquina, completamente automática e versátil, para a construção de compósitos nanoestruturados, Figura A.2 foi projetada e construída. Esta máquina automática de imersão está sendo intensivamente utilizada e tem produzido, com sucesso, filmes de PDAC/SPS, CHI/ALG, CHI/HA e CHI/CMC.

#### **A.5 CONCLUSÃO PARCIAL**

O problema resolvido por esta invenção atende à necessidade de fazer imersões de substratos em diversas soluções de forma automática, ao invés de manual. A operação manual de imersão, além de poder conduzir a erros de preparação, implica num dispêndio enorme de tempo e energia, desnecessários, para a produção de nanocompostos e filmes finos nanoestruturados. A máquina automática de imersão permite, ainda, a deposição de múltiplos componentes, posicionados na plataforma giratória, de acordo com a aplicação desejada, e processados automaticamente, necessitando apenas a força elétrica, para sua operação. A estrutura da máquina tem a opção de ser equipada com um filtro de ar ou um filtro *hazmat v.* A plataforma giratória, que suporta os béqueres/recipientes com as soluções de imersão, gira com praticamente qualquer combinação de número ou tamanhos de béqueres/recipientes, para uma máxima flexibilidade. O controle da máquina é feito por um computador externo, longe dos reagentes para assegurar que nada derrame sobre o computador/controle. O porta-amostra tem a opção de acomodar múltiplas lâminas, para uma alta eficiência de processamento. A base da máquina é construída com aço inox que resiste à corrosão. O sistema de imersão, automático é completamente acionado eletricamente, sem a necessidade de sistemas pneumáticos e cilindros de gás acoplados, para operar a máquina. O presente sistema pode ser facilmente escalonado para maiores volumes de soluções e tamanhos de substratos, produzindo, em curto

espaço de tempo, filmes sobre uma área superficial grande, o que é de grande importância para a viabilidade comercial.

A máquina vem sendo utilizada em vários trabalhos em andamento, no Laboratório de Engenharia Química e de Produtos (LEQUIP) e no departamento de Termofluidodinâmica da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

## **A.6 TRABALHOS FUTUROS**

A máquina e o sistema operacional, incluindo o software, estão sendo constantemente aprimorados, incluindo características para atender aos seguintes itens:

- possibilidade(s) de aquecimento dos recipientes contendo as soluções de deposição
- inclusão de uma estação de secagem com ar ou nitrogênio comprimido
- desenvolvimento de porta-amostras para outras aplicações específicas
- desenvolvimento de plataforma para recipientes menores, para (de) processos de alto custo
- desenvolvimento de filtros de ar e fluxos laminares dentro da estrutura fechada da máquina

## A.7 APÊNDICE

Entrevista no Jornal da UNICAMP, *Pesquisador desenvolve na FEQ material que interage com células*. Complexos biocompatíveis podem ser usados como biossensores ou no ‘transporte’ de fármacos. Edição do jornal: 21-27 de maio de 2011, página 9.

Apresentações do trabalho:

- 1) Vasconcellos, F. C., Bataglioli, R. A., Flores, E. B., Beppu, M. M., *New Automated Equipment for the Production of Layer-by-Layer Thin Film Nanostructures*, In: *International Conference on Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors - Nanoenergy11*, Natal, RN, 4-6 abril, 2011.