

FILMES ULTRAFINOS DE ÉSTERES DE CELULOSE: PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS*

Jorge Amim Jr. e Denise F. S. Petri*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Francisco C. B. Maia e Paulo B. Miranda

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13566-590 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 8/6/10; aceito em 29/9/10; publicado na web em 25/10/10

ULTRATHIN CELLULOSE ESTER FILMS: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND PROTEIN IMMOBILIZATION. In this study cellulose acetate butyrate (CAB) and carboxymethylcellulose acetate butyrate (CMCAB) films adsorbed onto silicon wafers were characterized by means of ellipsometry, atomic force microscopy (AFM), sum frequency generation spectroscopy (SFG) and contact angle measurements. The adsorption behavior of lysozyme (LIS) or bovine serum albumin (BSA) onto CAB and CMCAB films was investigated. The amounts of adsorbed LIS or BSA onto CMCAB films were more pronounced than those onto CAB films due to the presence of carboxymethyl group in the CMCAB structure. Besides, the adsorption of BSA molecules on CMCAB films was more favored than that of LIS molecules. Antimicrobial effect of LIS bound to CAB or CMCAB layers was evaluated using *Micrococcus luteus* as substrate.

Keywords: cellulose ester; protein adsorption; film characterization.

INTRODUÇÃO

A formação de filmes finos de polissacarídeos sobre superfícies sólidas tem uma importância significativa, devido principalmente à capacidade de aplicação desses filmes na imobilização de biomoléculas,^{1,2} o que fornece condições para o desenvolvimento de biossensores.³ Para esta finalidade, superfícies de polissacarídeos têm se destacado em relação aos polímeros sintéticos por serem biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis.⁴

Ésteres de celulose são polímeros derivados da celulose com maior número de aplicações tecnológicas. Estes derivados de celulose são largamente utilizados em formulações de tintas e revestimentos à base de solventes orgânicos para melhorar as propriedades de fluxo (viscosidade), a capacidade de polimento, estabilidade à radiação UV, resistência ao amarelecimento, resistência a fissuras no filme e dispersão dos pigmentos.⁵ Os ésteres de celulose mais utilizados em revestimentos são acetato de celulose (CA), propionato acetato de celulose (CAP) e butirato acetato de celulose (CAB).⁵ Na formulação de revestimentos metálicos para a indústria automotiva, a presença de CAB ajuda na orientação paralela das partículas metálicas.⁵ No segmento de tintas decorativas CAB tem sido usado como compatibilizante e agente promotor de retenção de cor, flexibilidade e resistência à umidade.⁵

O acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) é um éster de celulose insolúvel em água, mas solúvel em solventes como acetato de etila, metanol e acetona, que reúne duas características em um só material: o caráter hidrofílico dos grupos acetato e carboximetil e o caráter hidrofóbico devido ao radical butirato.^{5,6} CMCAB pode ser obtido a partir da esterificação de carboxialquil celulose.⁵ A diferença na estrutura química entre CMCAB e o éster de celulose CAB é a presença do grupo carboximetil (CH₂COOH), como mostrado na Figura 1. As patentes encontradas sobre CMCAB focam aplicações tecnológicas, tais como a aplicação em pinturas automotivas,⁷ na dispersão de materiais hidrofóbicos em solução aquosa, além de seu uso como

aditivo em tintas, dando mais durabilidade à impressão da mesma.^{8,9} Mais recentemente, CMCAB está sendo usado como matriz para formulações farmacêuticas.⁶ Neste trabalho, as propriedades superficiais de filmes ultrafinos de CAB e CMCAB foram investigadas através de elipsometria, microscopia de força atômica (AFM), medidas de ângulo de contato e espectroscopia vibracional por geração de soma de frequências (SFG). Na literatura nota-se a ausência de estudos sobre a aplicação de filmes finos de CMCAB como substratos para adsorção de biomoléculas. Por esta razão, este trabalho explorou a aplicação de filmes finos de CMCAB como suporte para imobilização de proteínas. Foram escolhidas duas proteínas com características diferenciadas para o estudo de imobilização de biomoléculas: a lisozima (LIS), que é uma enzima com função bactericida,¹⁰ e a albumina de soro bovino (BSA), que é uma proteína globular com larga aplicação no desenvolvimento de kits de diagnósticos.¹¹

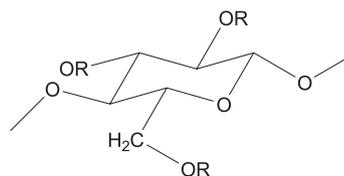


Figura 1. Representação da estrutura química do acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB), onde R², R³ e R⁶: H, COCH₂CH₂CH₃, CH₂COOH e COCH₃ e do acetato butirato celulose (CAB) onde R², R³ e R⁶: H, CO-CH₂CH₂CH₃ e COCH₃.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Lâminas de silício (Si/SiO₂) adquiridas da Silicon Quest (Califórnia, EUA) foram usadas como substrato nas dimensões de 1 x 1 cm para experimentos de obtenção de filmes ultrafinos. Foram utilizados água destilada e acetato de etila (grau analítico) como solventes. Cloreto de sódio foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil). Os polímeros acetato butirato celulose (CAB) e acetato butirato carbo-

*e-mail: dfsp@iq.usp.br

#Artigo respeitosamente dedicado ao querido Prof. Hans Viertler

ximetil celulose (CMCAB) foram gentilmente cedidos pela Eastman do Brasil (Tabela 1). LIS (L7651, Sigma, MM = 14.3 kDa) de clara de ovo e BSA (A2153, Sigma, MM = 66 kDa) foram utilizadas sem purificação prévia.

Tabela 1. Características do acetato butirato celulose (CAB) e acetato butirato de carboximetilcelulose (CMCAB): massa molar média numérica (M_n), temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), grau de esterificação para o acetato (DS_{AC}), butirato (DS_{BU}), carboximetil (DS_{CM}) e hidroxila (OH)

Polímero	Código	M_n (g/mol)	T_g (°C)	T_m (°C)	DS_{AC}	DS_{BU}	DS_{CM}	OH
Acetato butirato	CMCAB							
carboximetil celulose	641-0,2	20000	135	145-160	0,44	1,64	0,33	0,59
Acetato butirato	CAB	20000	125	160	0,95	1,65	-	0,4
celulose	381							

Dados fornecidos pelo fabricante (Eastman).

Métodos

Preparação dos filmes ultrafinos finos dos polímeros CAB e CMCAB

Primeiramente as lâminas de Si/SiO₂ foram limpas, imergindo-as em uma mistura oxidativa contendo H₂O₂, NH₄OH e H₂O, na proporção de 1:1:4 em volume, à temperatura de 75 °C, durante 20 min. Depois desse período, retirou-se as lâminas da mistura, lavou-se em água destilada e secou-se com jatos de nitrogênio. Em seguida, as lâminas de Si/SiO₂ foram colocadas em contato com soluções de CAB e CMCAB preparadas em acetato de etila na concentração de 1,5 g/L. Após 21 h de adsorção, os substratos foram lavados com acetato de etila e secos com jatos de N₂. Os experimentos de desorção foram realizados deixando-se os substratos adsorvidos com os polímeros em contato com o solvente puro por 21 h. Os experimentos de adsorção e desorção foram realizados a 25 ± 1 °C.

Adsorção de proteínas sobre os filmes ultrafinos de CAB e CMCAB

As lâminas de Si/SiO₂ cobertas com os filmes finos de ésteres de celulose foram imersas em soluções aquosas das proteínas LIS ou BSA na concentração de 1 g/L a 25 ± 1 °C e pH = 6,4 ± 0,1, durante 21 h. Este período garante que o equilíbrio de adsorção seja atingido. O efeito da força iônica sobre a adsorção da LIS ou BSA foi investigado preparando-se soluções dessas proteínas em 0,01 e 0,1 mol/L de NaCl. Após o período de adsorção, os substratos foram removidos das soluções, lavados com água destilada e secos com jatos de N₂. Os experimentos de desorção foram realizados deixando-se os substratos recobertos com proteínas em contato com água pura ou com solução de NaCl na concentração de 0,01 ou 0,1 mol/L por 21 h.

Elipsometria

A elipsometria consiste em medir a mudança do estado de polarização da luz após a reflexão de um feixe de luz, a partir de uma superfície isotrópica refletora.¹² As medidas de elipsometria foram realizadas utilizando o elipsômetro DRE – ELX02 (Ratzeburg, Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) ajustado em um ângulo de incidência de 70,0° que cobre uma área superficial de aproximadamente 3 mm² da amostra em análise, em temperatura ambiente. Para a interpretação dos dados, utilizou-se um modelo de multicamadas formado pelo substrato, uma camada desconhecida e o meio externo. A espessura (d_i) e o índice de refração (n_x) da camada desconhecida podem ser calculados através das variações de fase (Δ) e amplitude (Ψ) relativas à radiação incidente, das relações de Drude

e Fresnel, da equação fundamental da elipsometria (Equação 1) e de cálculos iterativos através de matrizes de Jones:¹³

$$e^{i\Delta} \tan \Psi = R_p/R_s = f(n_k, d_k, \lambda, \phi) \quad (1)$$

onde R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total para as ondas paralela e perpendicular e dependem do ângulo de incidência ϕ , do comprimento de onda λ da radiação, do índice de refração e da espessura de cada camada do modelo, n_k , d_k . A partir dos ângulos elipsométricos Δ e Ψ e de um modelo de multicamadas formado pelo silício, o óxido de silício, a camada de CMCAB ou CAB e ar é possível determinar somente a espessura da camada de CMCAB ou CAB. Inicialmente, a espessura da camada de SiO₂ das lâminas foi determinada em ar, considerando o índice de refração para o Si como $\tilde{n} = 3,88 - i0,018$ ¹⁴ e sua espessura como infinita. Para o meio externo (ar) o índice de refração foi considerado como 1,00. Como a camada de SiO₂ nativa é muito fina utiliza-se $n = 1,462$ ¹⁴ para calcular sua espessura, que é de aproximadamente 1,9 ± 0,2 nm. A espessura da camada de CAB e CMCAB foi calculada considerando o índice de refração nominal de $n = 1,48$ para ambos os polissacarídeos.¹⁵ A espessura da camada proteica foi calculada considerando o índice de refração nominal de $n = 1,52$ para LIS e BSA, este valor é típico de proteínas.¹⁶ As incertezas experimentais associadas à técnica de elipsometria envolvem a leitura de ângulos de dois polarizadores e do ângulo de incidência do laser, que quando propagadas no cálculo da espessura e de índice de refração geram incertezas da ordem de 10% do valor médio. As medidas elipsométricas foram feitas em triplicata para cada polissacarídeo antes e após a imobilização de LIS ou BSA. Os valores médios de espessura com os respectivos desvios padrão apresentados neste trabalho contemplam as incertezas da técnica e as replicatas.

A quantidade de proteína adsorvida, Γ (mg/m²), pode ser calculada através da Equação 2:¹⁷

$$\Gamma = d \cdot \rho \quad (2)$$

onde d é a espessura da camada de proteína adsorvida e ρ é densidade das proteínas e/ou polissacarídeos. Neste caso, para as proteínas¹⁷ $\rho = 1,37$ g/cm³ e para os ésteres de celulose $\rho = 1,21$ g/cm³ (dado fornecido pelo fabricante).

Microscopia de força atômica (AFM)

A caracterização da superfície dos filmes do CAB e CMCAB e das proteínas imobilizadas sobre o filme desses polímeros foi realizada através de imagens obtidas por medidas de AFM, utilizando o equipamento Molecular Imaging Pico LE Microscope. As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente, a temperatura ambiente, usando *cantilevers* de silício com frequência de ressonância próxima de 300 kHz e constante de mola nominal de 42 N/m. As imagens apresentadas neste trabalho se referem a áreas de varredura de (1 x 1 μ m) com resolução de 512 x 512 pixels. Os valores de rugosidade média (RMS) foram obtidos pelo software PicoPlus.

Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato em graus foram obtidas pelo método da gota sessil,¹⁸ numa montagem construída no laboratório (Figura 1S, material suplementar). Gotas de água destilada de 8 e 4 μ L foram usadas para os ângulos de avanço (θ_A) e recesso (θ_R), respectivamente. A histerese no ângulo de contato ($\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$) nos dá uma indicação da rugosidade da superfície e da heterogeneidade química da superfície.¹⁸ As medidas foram feitas em triplicata para CAB e CMCAB antes e após a adsorção das proteínas.

Espectroscopia vibracional por geração de soma de frequências (SFG)

A espectroscopia SFG é uma técnica de ótica não linear baseada na interação de dois fótons na superfície. Na espectroscopia SFG, os fótons de soma de frequências ($\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{IR}} + \omega_{\text{VIS}}$) são gerados pela interação de dois feixes de laser pulsado, um feixe infravermelho sintonizável de frequência ω_{IR} e um feixe visível de frequência fixa ω_{VIS} . Medindo-se o sinal de SFG em função da frequência do feixe de infravermelho obtém-se um espectro vibracional das moléculas na interface, sem contribuição das moléculas no volume do material.¹⁹ A aplicação desta técnica permite a investigação de espectros vibracionais de polímeros presentes em uma determinada interface,^{20,21} bem como obter informações sobre sua orientação média.

Filmes de CAB e CMCAB adsorvidos a partir de solução em acetato de etila na concentração de 1,5 g/L sobre quartzo foram utilizados nos experimentos de SFG. Os espectros de SFG dos filmes de CAB e CMCAB secos foram obtidos em um espectrômetro (Ekspla) equipado com um laser pulsado de Nd³⁺:YAG (taxa de repetição 20 Hz, duração do pulso 28 ps, comprimento de onda 1064 nm) que excita uma unidade geradora de harmônicos. Essa unidade produz feixes de 2º harmônico a $\lambda = 532$ nm (visível) e de 3º harmônico a $\lambda = 355$ nm (UV), além de permitir um sinal de saída no comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm (fundamental). Este fundamental e o 3º harmônico excitam um oscilador/amplificador paramétrico óptico que será responsável pela geração do feixe infravermelho (IR) sintonizável, que incidirá sobre a amostra juntamente com o feixe no visível ($\lambda = 532$ nm). Os ângulos de incidência e energias por pulso são de 55° e ~200 mJ para o feixe na região do IR, e 61° e ~900 mJ para o feixe visível; os feixes iluminam uma região na amostra de ~0,5 mm de diâmetro. O sinal SFG é coletado por um conjunto monocromador/fotomultiplicadora em função da frequência do feixe do infravermelho e cada ponto do espectro é uma média do sinal obtido para 100 pulsos do laser. Neste estudo, os dados foram obtidos na região do IR entre 1600 e 1800 cm⁻¹ e entre 2800 e 3000 cm⁻¹. O sinal SFG pode ser obtido nas combinações de polarização ppp, sps e ssp, onde “s” e “p” indicam que a luz está polarizada perpendicular e paralelamente ao plano de incidência, respectivamente. A primeira, segunda e terceira letras representam a polarização da luz SFG, do visível e do infravermelho, respectivamente.

Atividade enzimática da LIS

A ação antimicrobiana da LIS livre em solução (3 g/L) e imobilizada sobre os filmes CAB ou CMCAB foi avaliada usando-se uma dispersão aquosa de *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), 1,33 g/L, como substrato, a 25 °C. A atividade enzimática foi medida pelo decréscimo da turbidez da dispersão ($\Delta\tau$).²² Este foi determinado pela transmitância a 650 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Beckmann Coulter DU-600, após 1 h de contato da dispersão com a LIS pura ou com LIS imobilizada sobre os filmes de éster de celulose. $\Delta\tau$ foi calculado pela Equação 3:

$$\Delta\tau = (\tau - \tau_0 / \tau_0) \times 100 \quad (3)$$

onde τ_0 é a turbidez da dispersão da bactéria antes do contato com LIS e τ é a turbidez após 1 h de contato com LIS. Quanto maior $\Delta\tau$, maior é a ação bactericida da LIS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características dos filmes ultrafinos de CAB e CMCAB

O valor médio da espessura da camada de CAB obtido foi de $d = 0,52 \pm 0,02$ nm sobre Si/SiO₂, o que corresponde à quantidade de material adsorvido de $\Gamma = 0,63 \pm 0,03$ mg/m². Considerando o polímero CMCAB,

o valor médio da espessura da camada de CMCAB foi de $d = 1,9 \pm 0,2$ nm sobre Si/SiO₂, portanto, a quantidade de CMCAB adsorvido sobre Si/SiO₂ foi de $\Gamma = 2,3 \pm 0,2$ mg/m². Os valores médios das espessuras dos filmes de CAB e CMCAB formados sobre Si/SiO₂ indicam que somente o CAB adsorve formando uma monocamada, uma vez que a espessura média de uma monocamada homogênea de celulose²³ é aproximadamente de 0,5 nm. Experimentos de desorção mostraram que o processo de adsorção é irreversível para o CAB e CMCAB.

O processo de adsorção é controlado pelo balanço das interações entre polímero e substrato, substrato e solvente, polímero e solvente, como descrito por Silberberg.²⁴ A adsorção dos polissacarídeos sobre as lâminas de Si/SiO₂ é provavelmente dirigida por interações favoráveis entre os grupos carbonila e hidroxila dos polissacarídeos e os grupos silanol no substrato,²⁵ o que é mais intenso para o polímero CMCAB, pois Γ_{CMCAB} foi maior que Γ_{CAB} .

Imagens topográficas de AFM (Figura 2) mostram que as superfícies dos filmes de CAB e CMCAB apresentam relevo homogêneo e que os polímeros recobrem todo o substrato. Estas características são confirmadas pelos valores de rugosidade média obtidos para os filmes de CAB e CMCAB de $0,20 \pm 0,02$ e $0,30 \pm 0,03$ nm, respectivamente, os quais não diferem muito da rugosidade média do substrato $0,10 \pm 0,01$ nm.^{26,27}

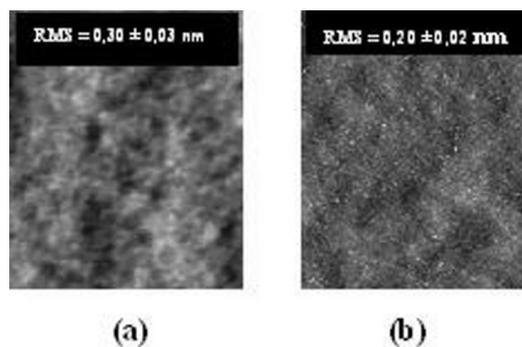


Figura 2. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x 1 μm) para filmes de (a) CAB, Z = 4 nm, e (b) CMCAB, Z = 3 nm

Os valores dos ângulos de contato determinados para filmes de CAB e CMCAB $\theta_a = 54 \pm 1^\circ$ e $\theta_a = 60 \pm 1^\circ$, respectivamente, evidenciaram que a molhabilidade dessas superfícies diminuiu, pois os valores de θ_a aumentaram em relação ao SiO₂,^{26,27} $\theta_a = 5 \pm 1^\circ$. Portanto, a provável orientação do grupo butirato para o ar tornou as superfícies mais hidrofóbicas. Além disso, os valores relativamente baixos de $\Delta\theta = 9 \pm 2^\circ$ obtidos tanto para CAB como para CMCAB corroboraram com a homogeneidade dos filmes observada por AFM (Figura 2).

A orientação molecular preferencial de radicais alquílicos sugerida por medidas de ângulo de contato foi investigada através de medidas de SFG. Foram obtidos os espectros de SFG dos filmes de CAB e CMCAB em três polarizações (ssp, sps e ppp). A Figura 3 mostra os espectros de SFG obtidos a seco (interface sólido-ar) na região de 2800 a 3000 cm⁻¹, a qual é característica de grupos metileno e metila.^{28,29} As bandas nos espectros obtidos na polarização ssp são mais intensas que aquelas obtidas nas polarizações sps e ppp. Além disso, os espectros na polarização ssp obtidos para CAB e CMCAB são semelhantes entre si tanto com relação à intensidade relativa das bandas como na faixa espectral em que se encontram. As bandas presentes em 2879 cm⁻¹ (CH_{3(s)}) e 2942 cm⁻¹ (CH_{3(F)}) são atribuídas ao estiramento simétrico do grupo metila e à ressonância de Fermi.^{28,29} A presença de bandas do grupo metila neste espectro mostra que as cadeias poliméricas do CAB e CMCAB se orientam preferencialmente na interface sólido-ar de modo a arranjar os grupos CH₃, em média, perpendicularmente à superfície. Além disso,

a Figura 3 mostra que os espectros dos filmes de CAB e CMCAB nas polarizações sps e ppp são dominados por uma banda em 2970 cm^{-1} , característica do estiramento assimétrico do grupo metila ($\text{CH}_{3(\text{as})}$). Esses espectros são similares aos obtidos em filmes de Langmuir de ácidos graxos,³⁰ indicando que as cadeias butila se encontram em média perpendiculares à superfície dos filmes poliméricos. Portanto, com os grupos CH_3 ligeiramente inclinados em relação à direção normal ao substrato. Estes resultados são coerentes com a orientação do grupo butirato para a interface sólido-ar que, conseqüentemente, contribui para o maior valor de ângulo de contato para os filmes de CAB e CMCAB em relação ao Si/SiO_2 .

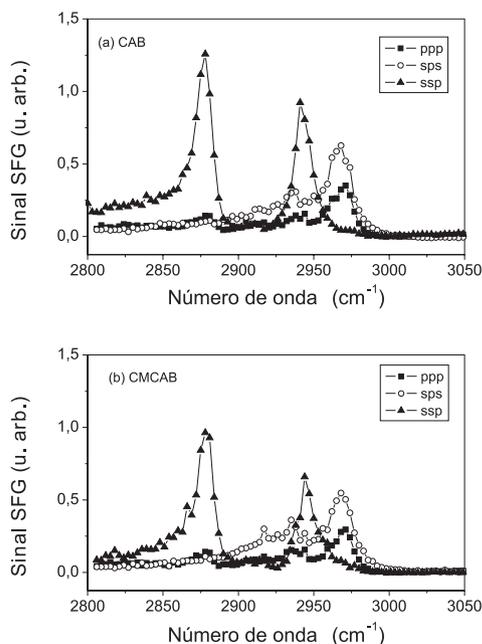


Figura 3. Espectros de SFG obtidos nas polarizações ssp, sps e ppp, no ar, para filmes de (a) CAB e (b) CMCAB depositados sobre quartzo a partir de soluções preparadas em acetato de etila

O espectro obtido para CAB e CMCAB na região da carbonila (1600 a 1800 cm^{-1}) não apresentou nenhuma banda característica do grupo, indicando que para ambos os polímeros a carbonila está aleatoriamente orientada na interface sólido-ar (espectro não apresentado).

Adsorção de LIS ou BSA sobre filmes de CAB e CMCAB

A Figura 4 mostra os valores médios das quantidades de LIS ou de BSA adsorvidas sobre os filmes de CAB e CMCAB adsorvidos sobre Si/SiO_2 , em $\text{pH} = 6,4 \pm 0,1$, a partir de soluções aquosas ou em NaCl, na concentração de $1,0\text{ g/L}$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Comparando os valores obtidos de Γ_{LIS} e Γ_{BSA} , LIS e BSA adsorveram em maior quantidade sobre o filme de CMCAB do que sobre o filme de CAB. A preferencial interação entre LIS e CMCAB pode ser explicada pela presença do grupo carboximetil (CM) no CMCAB. Em meio aquoso, grupos carboximetil orientados para a interface sólido-líquido podem estar desprotonados, gerando cargas negativas na superfície. Como o ponto isoelétrico (pI) da LIS³¹ é 11, em $\text{pH} = 6,4 \pm 0,1$ a LIS encontra-se com carga líquida positiva, favorecendo interações eletrostáticas entre filme de CMCAB e LIS. Os valores de Γ_{LIS} determinados para o polianion poli(ácido acrílico), PAA, são da mesma ordem de grandeza daqueles encontrados para CMCAB.³¹ Além disso, ocorrem interações hidrofóbicas entre resíduos hidrofóbicos de LIS e os radicais butila. Por outro lado, o pI da BSA³² é geralmente dado como uma faixa de

4,7 a 4,9. Portanto, em $\text{pH} = 6,4 \pm 0,1$ a BSA encontra-se com carga líquida negativa, o que poderia provocar certa repulsão eletrostática pelos grupos carboxilatos da superfície de CMCAB e diminuir a adsorção. Porém, a presença do grupo carboximetil (CM) no CMCAB provavelmente intensifica as interações do tipo dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio com a proteína. A adsorção de BSA sobre filmes de PAA é uma ordem de grandeza menor que aquela observada sobre CAB ou CMCAB,³¹ indicando que a adsorção sobre os ésteres de celulose é provavelmente dirigida por interações hidrofóbicas.

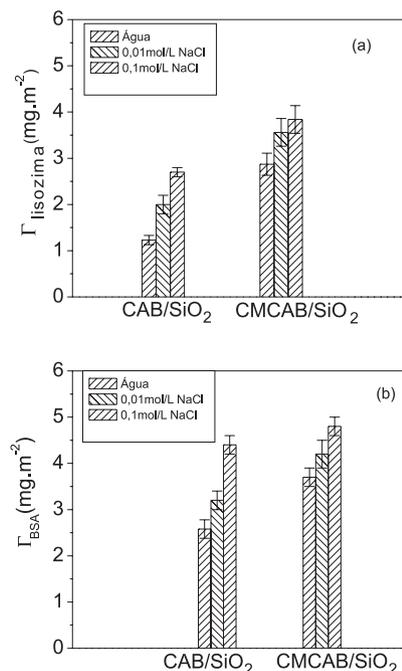


Figura 4. Valores médios da quantidade de BSA ou LIS adsorvidas (Γ) sobre os filmes de CAB e CMCAB depositados sobre Si/SiO_2 , a partir de soluções ($C = 1,0\text{ g/L}$) preparadas em água pura, $0,01\text{ mol/L NaCl}$ e $0,10\text{ mol/L NaCl}$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 6,4 \pm 0,1$

O efeito da força iônica sobre a adsorção da LIS e da BSA foi investigado como mostra a Figura 4. Os valores de Γ_{LIS} e Γ_{BSA} aumentaram quando foi adicionado NaCl nas soluções, independentemente do substrato utilizado CAB ou CMCAB. Esta tendência foi mantida quando se aumentou a força iônica do meio de $0,01$ para $0,1\text{ mol/L}$ de NaCl. Este comportamento pode ser explicado pela desidratação das moléculas de LIS e de BSA, devido à solvatação de íons do sal ao redor das proteínas.³³ Logo, as biomoléculas tendem a agregar em solução e provavelmente adsorvem sobre as superfícies do CAB e CMCAB por interações hidrofóbicas.

Para avaliar se o processo de adsorção das biomoléculas é reversível ou irreversível, todos os filmes obtidos para LIS e BSA foram deixados em contato com os seus respectivos solventes (água ou solução $0,01$ ou $0,1\text{ mol/L}$ de NaCl). Este controle foi realizado por meio da técnica de elipsometria, avaliando se houve variação na espessura das camadas de proteína adsorvida sobre os filmes de CAB e CMCAB. Para todos os sistemas investigados, observou-se diminuição de $\sim 5\%$ na espessura da camada proteica, indicando que o processo é irreversível.

A imobilização de LIS e BSA sobre os filmes de ésteres de celulose modificou a molhabilidade dos filmes de CAB e CMCAB, como pode ser visto na Tabela 2. Após a adsorção de LIS e BSA, houve um decréscimo dos ângulos de contato em relação aos filmes dos ésteres de celulose, tornando os filmes mais hidrofílicos. Provavelmente, as biomoléculas orientaram os resíduos hidrofóbicos para a superfície

Tabela 2. Valores de ângulo de contato de avanço (θ_a), de recesso (θ_r) e da histerese do ângulo de contato ($\Delta\theta$) em graus para LIS e BSA imobilizadas sobre os filmes de CAB e CMCAB em diferentes forças iônicas

Superfícies	Biomoléculas								
	LIS								
	Água			NaCl 0,01 mol/L			NaCl 0,1 mol/L		
	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$
CAB/SiO ₂	47 ± 2	29 ± 1	18 ± 2	49 ± 1	30 ± 1	19 ± 1	44 ± 1	25 ± 2	19 ± 1
CMCAB/SiO ₂	52 ± 1	31 ± 2	21 ± 1	46 ± 2	28 ± 1	18 ± 3	51 ± 2	30 ± 2	21 ± 3
Superfícies	BSA								
	NaCl 0,01 mol/L								
	Água			NaCl 0,01 mol/L			NaCl 0,1 mol/L		
	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$
CAB/SiO ₂	50 ± 1	40 ± 1	10 ± 1	55 ± 1	39 ± 2	16 ± 2	49 ± 1	38 ± 2	11 ± 2
CMCAB/SiO ₂	51 ± 1	37 ± 2	14 ± 2	49 ± 1	33 ± 1	16 ± 2	50 ± 1	35 ± 2	15 ± 2

dos ésteres de celulose e, conseqüentemente, os resíduos hidrofílicos para a interface sólido-ar. Observou-se também um aumento na histerese do ângulo de contato, indicando aumento de rugosidade e/ou heterogeneidade química na superfície. As imagens topográficas de AFM obtidas para o filme contendo LIS adsorvida a partir do uso de uma solução de NaCl 0,1 mol/L indicam a presença de estruturas cujas alturas variam de 10 a 15 nm sobre filmes de CAB (Figura 2S, material suplementar) e de 10 a 12 nm sobre filmes de CMCAB (Figura 2S, material suplementar). Considerando que as dimensões cristalográficas reportadas para LIS³⁴ são 4,5 x 3 x 3 nm³, estas estruturas podem ser agregados de LIS, os quais causam aumento na histerese das medidas de ângulo de contato. Agregados de BSA também foram observados sobre os filmes de CAB e CMCAB (imagens não apresentadas). De forma geral, o tamanho médio dos agregados aumenta com o aumento da força iônica, devido à interação da água de hidratação da proteína com os íons em solução.³³

Para se verificar possíveis mudanças conformacionais da LIS após imobilização sobre os filmes de CAB e CMCAB, testes enzimáticos foram realizados utilizando dispersões de *M. luteus* como substrato. Para este estudo, foram escolhidos os filmes de LIS adsorvidos a partir de 0,1 mol/L de NaCl sobre os filmes de CAB e CMCAB, porque foram aqueles que apresentaram maiores valores de Γ_{LIS} . A atividade enzimática de LIS livre e imobilizada foi correlacionada com o decréscimo da turbidez $\Delta\tau$ da dispersão de micro-organismo. Após 1 h de contato dos filmes de LIS com a dispersão, os valores de $\Delta\tau$ foram 23 ± 1% e 29 ± 1% para LIS adsorvida sobre CAB e CMCAB, respectivamente. Para efeito de comparação LIS adsorvida sobre Si/SiO₂, uma superfície mais hidrofílica, apresentou $\Delta\tau$ 49 ± 4%³⁵ e LIS livre (em quantidade equivalente à adsorvida) apresentou $\Delta\tau$ 100%. A menor atividade sobre superfícies de éster de celulose pode ser explicada pela agregação das moléculas de LIS sobre os filmes de CAB e CMCAB (Figura 2S, material suplementar). A atividade enzimática da LIS é dependente da preservação de sua estrutura nativa, que ocorre quando as ligações de dissulfeto são mantidas intactas.¹⁰ O mecanismo catalítico envolve os resíduos hidrofílicos Glu35 e Asp52, os quais se ligam ao anel glicosídico, de maneira que Glu35 é o responsável pela catálise ácida e Asp52 pela estabilização do íon carbônio. Os resíduos hidrofóbicos Trp62 e Trp63 estabilizam a estrutura aberta do sítio ativo.^{10,36,37} A perda parcial de atividade enzimática observada para LIS imobilizada pode ser explicada por mudança conformacional, devida à adsorção ou exposição reduzida do sítio ativo causada pela agregação.

Após os experimentos de atividade biocida, os filmes de LIS foram lavados, secos e suas espessuras foram determinadas por elipsometria, com o intuito de verificar se houve desorção da enzima. Como não houve variação de espessura, os filmes foram reutilizados.

Após 1 h de contato com a dispersão, a atividade da LIS manteve-se, pois $\Delta\tau$ foi de 32 ± 2%, mostrando que mesmo após armazenagem em dessecador a 25 °C por um dia, o nível de atividade catalítica original foi mantido. Este resultado é bastante interessante porque mostra que, embora a atividade enzimática de LIS adsorvida seja mais baixa que aquela medida para LIS livre, a estrutura após adsorção e uso é mantida, permitindo reuso.

CONCLUSÕES

Filmes ultrafinos de CAB (~0,5 nm) e CMCAB (~2,0 nm) adsorvidos sobre lâminas de Si/SiO₂ tendem a expor os grupos alquila para a interface sólido-ar. Esta orientação preferencial pôde ser evidenciada por espectroscopia SFG e medidas de ângulo de contato. Vale ressaltar que para estudos de filmes finos e interfaces estas duas técnicas se complementam muito bem. A primeira fornece informações microscópicas, enquanto a segunda revela propriedades macroscópicas.

Com relação à aplicação de filmes de CAB e CMCAB como suporte para imobilização de biomoléculas, pode-se afirmar que a presença do grupo carboximetil (CM) na estrutura química do CMCAB, mesmo em pequena concentração ($DS_{CM} = 0,33$) favorece a adsorção de proteínas (BSA e LIS). No caso particular de LIS, a adsorção sobre CAB ou CMCAB induziu mudanças conformacionais que provocaram redução na atividade biocida. Entretanto, esta redução pode ser compensada pelo fato de manter a atividade biocida no reuso. Do ponto de vista prático, a imobilização de LIS sobre filmes de CAB e CMCAB agrega propriedades bactericidas importantes para o uso dos mesmos como revestimento de dispositivos que requerem assepsia.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S e 2S estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br> na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, CNPq e CAPES (Rede Nanobiotecnologia) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Charreyre, C. M-T.; Tcherkasskaya, O.; Winnik, M. A.; Hiver, A.; Delair, T.; Cros, P.; Pichot, C.; Mandrand, B.; *Langmuir* **1997**, *12*, 3103.
- Wiegand, G.; Jaworek, T.; Wegner, G.; Sackmann, E.; *Langmuir* **1997**, *13*, 3563.

3. Delair, T.; Meunier, F.; Elaissari, A.; Charles, M.-H.; Pichot, C.; *Colloids Surf., A* **1999**, *153*, 341.
4. Sackmann, E.; *Science* **1996**, *271*, 43.
5. Edgar, K. J.; Buchanan, C. M.; Debenham, J. S.; Rundquist, P. A.; Seiler, B. D.; Shelton, M. C.; Tindall, D.; *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 1605.
6. Edgar, K. J.; *Cellulose* **2007**, *14*, 49.
7. Walker, K. R.; Posey-Dowty J.; Seo, K. S.; Wilson, A. K.; *Surface Coatings Australia* **2002**, *39*, 11.
8. Obie, R. T.; *US PI 2004030801*, **2004**.
9. Bauer, R. D.; *US PI 2005166794*, **2005**.
10. Franck, R. W.; *Bioorg. Chem.* **1992**, *20*, 77.
11. Carter, D. C.; Ho, J. X.; *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
12. Gonçalves, D.; Irene, E. A.; *Quim Nova* **2002**, *25*, 794.
13. Azzam, R. M.; Bashara, N. M.; *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland: Amsterdam, 1979.
14. Palik, E. D.; *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, Inc.: London, 1985.
15. Kosaka, P. M.; Kawano, Y.; El Seoud, O. A.; Petri, D. F. S.; *Langmuir* **2007**, *23*, 1216.
16. Malmsten, M.; *Protein architecture: Interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*, Marcel Dekker: New York, 2000.
17. Ortega-Vinuesa, J. L.; Tengvall, P.; Lundstrom, I.; *Thin Solid Films* **1998**, *324*, 257.
18. Adamson, A. W.; *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th ed., John Wiley & Sons: Toronto, 1990.
19. Lambert, A. G.; Davies, P. B.; Neivandt, D. J.; *Appl. Spectrosc. Rev.* **2005**, *40*, 103.
20. Ye, X.; Zuo, B.; Deng, M.; Hei, Y.; Ni, H.; Lu, X.; Wang, X.; *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *349*, 205.
21. Kristalyn, C. B.; Lu, X.; Weinman, C. J.; Ober, C. K.; Kramer, E. J.; Chen, Z.; *Langmuir* **2010**, *26*, 11337.
22. Bergmeyer, H. U.; *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., Weinheim, vol. 2.
23. Holmberg M.; Berg, J.; Stemme, S.; Odberg, L.; Rasmusson, J.; Claesson, P.; *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *186*, 369.
24. Silberberg, A.; *J. Chem. Phys.* 1968, *48*, 2835.
25. Kosaka, P. M.; Kawano, Y.; Salvadori, M. C.; Petri, D. F. S.; *Cellulose* **2005**, *12*, 351.
26. Petri, D. F. S.; Wenz, G.; Schunk, P.; Schimmel, T.; *Langmuir* **1999**, *15*, 4520.
27. Castro, L. B. R.; Petri, D. F. S.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 2063.
28. Chen, C.; Wang, J.; Woodcock, S. E.; Chen, Z.; *Langmuir* **2002**, *18*, 1302.
29. Opdahl, A.; Koffas, T. S.; Amitay-Sadovsky, E.; Kim, J.; Somorjai, G. A.; *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16*, R659.
30. Guyot-Sionnest, P.; Hunt, J. H.; Shen, Y. R.; *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *59*, 1597.
31. Belegriou, S.; Mannelli, I.; Lisboa, P.; Bretagnol, F.; Valsesia, A.; Cecccone, G.; Colpo, P.; Rauscher, H.; Rossi, F.; *Langmuir* **2008**, *24*, 7251.
32. Serefoglou, E.; Oberdisse, J.; Staikos, G.; *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1195.
33. Arakawa, T.; Timasheff, S. N.; *Biochemistry* **1984**, *23*, 5912.
34. Zhou, D.; Wang, X.; Birch, L.; Rayment, T.; Abell, C.; *Langmuir* **2003**, *19*, 10557.
35. Silva, R. A.; Urzúa, M. D.; Petri, D. F. S.; *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *330*, 310.
36. Blake, C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R.; *Nature* **1965**, *206*, 757.
37. Kirby, A. J.; *Nature Structural Biology* **2001**, *8*, 737.