

LIZANDRA BELMONTE RODRIGUES DE CASTRO

*Imobilização de proteínas sobre
superfícies de polissacarídeos*

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Química (Físico-Química)*

Orientadora: Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus pais, Ruy e Elenice,

e ao meu esposo, Tiago.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Denise F. S. Petri, pela orientação e incentivo desde a iniciação científica, pela contribuição na minha formação acadêmica e pessoal, e pelas oportunidades de fazer parte do seu grupo e de fazer um “sanduíche” na Alemanha.

Ao Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt e Dr. Michael Kappl pela oportunidade de trabalhar no “Max Planck Institut für Polymerforschung”, MPI-P, em Mainz, Alemanha.

Ao meu grande amor Tiago, que sempre me deu forças pra continuar, quando eu encontrava algum obstáculo, desde a graduação. Obrigada por todas as aulas e pelas discussões, científicas ou não, pela companhia, amizade e amor. Obrigada também pela leitura e análise crítica desta tese.

Aos meus pais, Ruy e Elenice, pela compreensão e apoio à minha carreira científica. Aos meus irmãos, Rodrigo e Henrique, pelo companheirismo, e suas respectivas, Jussara e Camila, pelas maravilhosas conversas com pizza na 6ª feira e almoços de domingo.

Aos meus grandes amigos, Fê, Pop e Ma, que estavam sempre comigo pelos corredores do IQ.

Ao Caio, Massari, Vanessa, Iélou, Nathália, Sabrina, Pé, Helena, Escobar e Paty pelos cafês, almoços, baladas e viagens!

Aos amigos bioquímicos, Lívea, Adriano e Danilo, pelas discussões e muito aprendizado.

A todos os amigos que passaram pelo grupo, Arlete, Bruna, Sabrina, Paulo, Romeu, Alliny, Priscila, Karina, Eduardo, Caio, André, Guilherme, Fabio, Rubens, Rafael, Jorge, Iris e Elielma, pelo ambiente descontraído no laboratório, e por tantos cafês.

Aos brasileiros que me ajudaram a agüentar firme na Alemanha, Rodrigo, Marcos e Fred.

Aos amigos das nacionalidades diversas que fiz em Mainz: Eugenia, Maria, Adriana, Mine, Tugba, Ramon, Rüdiger, Sebastian, Massaia, Mika, Vitor, Suzana, Andrea, Nikos e Despina.

Ao Prof. Dr. Paulo Teng, pela amizade, boas conversas e cartas de recomendação.

À Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pelas colaborações, portas sempre abertas de seu laboratório, medidas de espalhamento de luz e potencial zeta.

À Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori (IF-USP), pelo início do aprendizado em AFM.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski (UFPR), pelos polissacarídeos cedidos.

Ao Prof. Dr. Benedito Lopes da Fonseca (USP-Ribeirão) pelas interessantes conversas sobre doenças, vírus e imunologia, que despertaram meu interesse pelo estudo de biomoléculas.

À Prof. Dra. Marina F. M. Tavares e seu aluno Fernando G. Tonin pelas medidas de eletroforese capilar realizadas em 2006.

Ao Prof. Dr. Claudimir L. do Lago e sua aluna Renata Mayumi Saito pelas medidas de eletroforese capilar realizadas em 2008.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado, e à União Européia, pela bolsa de estágio de doutorado na Alemanha, através da Marie Curie Fellowship.

Aos sempre prestativos funcionários do IQ.

Ao IQ-USP e ao MPI-P pelas instalações que permitiram a realização deste trabalho.

Resumo

Castro, L. B. R., **Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos**, 2008, 110p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese apresenta o estudo inédito da obtenção e caracterização de filmes finos de xiloglucanas obtidas de duas fontes diferentes, *Hymenaea courbaril* (HXG) e *Tamarindus indica* (TXG) sobre lâminas de Si/SiO₂ e lâminas modificadas com grupos amino, assim como a aplicação desses filmes na imobilização da lectina concanavalina A (Con A) por medidas de elipsometria e microscopia de força atômica (AFM). A diferença na estrutura fina de cada XG influenciou na espessura e morfologia de seus filmes finos. Os oligômeros XXXXG presentes apenas na HXG favorecem as interações com a superfície, assim como já observado para interação entre XG-celulose [Lima e Buckeridge, 2001].

A imobilização de Con A foi realizada sobre filmes de carboximetilcelulose (CMC) de HXG, TXG e poli(metacrilato de metila) (PMMA), lâminas de Si/SiO₂ e partículas poliméricas decoradas com polissacarídeo PMMA/CMC. A adsorção de Con A foi mais pronunciada sobre os filmes de CMC. As camadas de Con A formadas sobre HXG e TXG apresentam potencial utilização no reconhecimento e detecção de carboidratos para desenvolvimento de diagnósticos para algumas doenças, por não comprometerem o sítio de ligação específica da lectina na adsorção. No caso das partículas PMMA/CMC cobertas com uma camada de Con A, a alta estabilidade coloidal do sistema confere às partículas a possibilidade de explorar a propriedade de aglutinação específica da lectina no reconhecimento de carboidratos.

A enzima hexoquinase (HK) foi imobilizada sobre dois diferentes tipos de partículas poliméricas decoradas com polissacarídeo, PMMA/CMC e poliestireno/quitosana (PS/CH). Na primeira, HK perdeu drasticamente sua atividade catalítica, ao contrário do observado quando a mesma enzima foi imobilizada sobre PS/CH, onde a HK manteve aproximadamente 50% de sua atividade enzimática, podendo ser armazenada em temperatura e pressão ambientes por 1 mês e ser reutilizada até 3 vezes. A estrutura da camada de hidratação e a composição química de cada um dos polissacarídeos (CMC ou CH) na superfície das partículas são diferentes, provocando diferenças na conformação das moléculas de HK quando imobilizadas sobre cada tipo de partícula.

Medidas de forças de adesão utilizando as partículas poliméricas coladas na extremidade de *cantilevers* de AFM (*Colloidal Probe Technique*) permitiram medir as espessuras dessas camadas hidratadas de polissacarídeos nas superfícies das partículas PMMA/CMC e PS/CH, da ordem de (20 ± 10) nm e (35 ± 11) nm, respectivamente. Essas medidas de força também evidenciaram o potencial dos dois sistemas estudados (PMMA/CMC – Con A e PS/CH – HK) como métodos qualitativos para a detecção dos açúcares manose, glicose e frutose.

Palavras-chave: polissacarídeos, proteínas, microscopia de força atômica, adsorção.

Abstract

Castro, L. B. R., **Immobilization of proteins onto polysaccharide surfaces**, 2008, 110p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis presents the study on thin film formation and characterization of xyloglucans extracted from two different sources, *Hymenaea courbaril* (HXG) and *Tamarindus indica* (TXG) onto Si/SiO₂ wafers or amino-terminated wafers, as well as the application of these films as substrates for the immobilization of the lectin concanavalin A (Con A) by means of ellipsometry and atomic force microscopy (AFM). The difference in the fine structure of each XG exerted influence on film thickness and morphology. The oligomers XXXXG present only in HXG favor the interactions with the surfaces, as already observed for the interaction between XG-cellulose [Lima and Buckeridge, 2001].

Con A was immobilized onto films of carboxymethylcellulose (CMC), HXG, TXG and poly(methyl methacrylate) (PMMA), Si/SiO₂ wafers and on polysaccharide decorated polymeric particles PMMA/CMC. The adsorption of Con A was more pronounced on CMC films. Con A layers formed on HXG and TXG present potential application in the recognition and detection of carbohydrates for diagnostic development, once the specific sugar binding site is not involved in the adsorption process. In the case of polymeric particles PMMA/CMC covered with a Con A layer, the high colloidal stability of the system confers to particles the possibility to explore the lectin property of specific agglutination with carbohydrates.

The enzyme hexokinase (HK) was immobilized onto two different types of polysaccharide decorated polymeric particles, PMMA/CMC and polystyrene/chitosan (PS/CH). In the first one, HK drastically lost its catalytic activity. The same enzyme immobilized onto PS/CH kept approximately 50% of its enzymatic activity, even after storing

under room temperature and pressure for 1 month. Moreover upon immobilizing HK could be reused up to 3 times. The structure of the hydration layer and the chemical composition due to the presence of each polysaccharide (CMC or CH) on the polymeric particle surface provided different environment, generating differences in the conformation of immobilized molecules of HK on each particle.

Measurements of adhesion forces using the polymeric particles glued on the extremity of AFM cantilevers (Colloidal Probe Technique) allowed to measure the thicknesses of these hydrated polysaccharide layers on the surfaces of the PMMA/CMC and PS/CH particles as (20 ± 10) nm and (35 ± 11) nm, respectively. These force measurements had also evidenced the potential of the two studied systems (PMMA/CMC - Con A and PS/CH - HK) as qualitative methods for detection of the sugars mannose, glucose and fructose.

Keywords: polysaccharides, proteins, atomic force microscopy, adsorption.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química dos açúcares utilizados.....	31
Figura 2 – Estrutura química dos polissacarídeos utilizados.....	33
Figura 3 – Representação esquemática de um AFM.....	42
Figura 4 – Obtenção de gráficos de força com o AFM.....	44
Figura 5 - Conversão das curvas obtidas diretamente do AFM em curvas de força.....	46
Figura 6 - Micrografias eletrônicas de varredura de uma partícula PS/CH grudada na extremidade de um <i>cantilever</i>	47
Figura 7 - Imagens de AFM de HXG adsorvida em condições de equilíbrio sobre superfícies aminadas.....	50
Figura 8 - Imagens de AFM HXG e de TXG depositadas sobre superfície aminada.....	52
Figura 9 - Imagens de AFM: topografias, correspondentes secções transversais e fase de HXG e de TXG sobre Si/SiO ₂	55
Figura 10 – Imagem de AFM da topografia do filme de CMC adsorvido sobre superfície aminada.....	57
Figura 11 – Imagem de AFM da topografia do filme de PMMA sobre Si/SiO ₂	58
Figura 12 - a) Isoterma de adsorção de Con A sobre filmes de CMC e b) Grau de cobertura da superfície ajustado segundo o modelo de Langmuir.....	60
Figura 13 - Isotermas de adsorção de Con A sobre diferentes substratos.....	62
Figura 14 – Imagens topográficas de camadas de Con A adsorvidas sobre diferentes substratos.....	66
Figura 15 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas PMMA/CMC.....	67
Figura 16 - a) Isoterma de adsorção de Con A sobre partículas de PMMA/CMC e b) Grau de cobertura da superfície ajustado segundo o modelo de Frumkin.....	69
Figura 17 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre Si/SiO ₂ . b) Representação esquemática do sistema estudado.....	72
Figura 18 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre filmes de CMC. b) Representação esquemática do sistema estudado.....	74

Figura 19 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Si/SiO ₂ . b) Representação esquemática do sistema estudado.....	75
Figura 20 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre Si/SiO ₂ , na presença de manose 5 mmol/L. b) Representação esquemática do sistema estudado.....	76
Figura 21 - Δ e ψ em função do tempo para adsorção de Con A sobre Si/SiO ₂ até 4h.....	77
Figura 22 - Δ e ψ em função do tempo para placas Con A previamente adsorvida sobre Si/SiO ₂ em solução de manose 14mmol/L.....	78
Figura 23 – Micrografia eletrônica de transmissão de partículas PS/CH.....	80
Figura 24 – a) Isoterma de adsorção de HK sobre partículas PS/CH e b) Esquema da partícula PS/CH-HK.....	81
Figura 25 - Isoterma de adsorção de HK sobre partículas PMMA/CMC.....	83
Figura 26 - Formação de NADPH em função do tempo de estocagem de HK livre e imobilizada sobre PS/CH.....	85
Figura 27 - a) Curva de força obtida para a partícula PS/CH e superfície de HK adsorvida sobre Si/SiO ₂ , em tampão tris-HCl. b) Representação esquemática do sistema estudado.....	88
Figura 28 – Curvas de força obtidas para a partícula PS/CH e superfície de Si/SiO ₂ . a) em água e b) em NaCl 0,01mol/L.....	90
Figura 29 - Representação esquemática dos sistemas estudados, com os elementos fora de escala. a) O meio era o tampão tris-HCl e b) adição de manose, ou glicose ou frutose 25mmol/L.....	91
Figura 30 – Curvas de força obtidas para a partícula PS/CH-HK e superfície de Si/SiO ₂ , antes e após adição de açúcares.....	92
Figura 31 - Histogramas obtidos a partir de curvas de força versus distância para PS/CH-HK contra Si/SiO ₂ em quatro meios diferentes: Tris-HCl, glicose, frutose e manose.....	94
Figura 32 - Histogramas obtidos a partir de curvas de força versus distância para PS/CH contra Si/SiO ₂ em quatro meios diferentes: Tris-HCl, glicose, frutose e manose.....	95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características dos filmes de XG formados sobre superfícies aminadas. Ângulo de contato para água (θ_A), espessura média (d) e rugosidade média a partir de imagens de AFM $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (rms).....	49
Tabela 2: Características dos filmes adsorvidos sobre Si/SiO ₂ ; espessura média obtida por elipsometria (d) e rugosidade média determinada a partir das imagens de AFM ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) com o programa PicoScan 5.3.2 (rms).....	53
Tabela 3: Características das camadas de Con A adsorvidas sobre cada substrato a partir de soluções 10 $\mu\text{mol/L}$. Espessura (d), ângulos de contato de avanço (θ_A), recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) e rugosidade média para imagens de AFM $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ antes (rms _{sup}) e após a adsorção de Con A (rms _{Con A}).....	64

Lista de Abreviaturas

ADP: adenosina 5'-difosfato

AFM: Microscopia de Força Atômica

APS: Aminopropiltriétoxisilano

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CH: Quitosana

CMC: Carboximetilcelulose

Con A: Concanavalina A

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

d: Espessura média obtida por elipsometria

G-6-P: glicose-6-fosfato

G-6-PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

HK: Hexoquinase

HXG: Xiloglucana de semente de *Hymenaea courbaril*

NADP⁺: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

N_p: Densidade numérica de partículas

pI: Ponto isoelétrico

PMMA: Poli(metacrilato de metila)

PS: Poliestireno

rms: Rugosidade expressa em média quadrática

SDS: dodecil sulfato de sódio

Tris-HCl: tris(hidroxiometil) aminometano + HCl, pH = 7,4

TXG: Xiloglucana de semente de *Tamarindus indica*

XG: Xiloglucana

Lista de Símbolos

ζ : potencial zeta

Ψ : Razão entre as amplitudes dos componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico da onda eletromagnética

λ : comprimento de onda

Δ : Diferença de fase entre os componentes paralelo e perpendicular do campo elétrico da onda eletromagnética

Θ : Grau de cobertura da superfície

Γ : quantidade de biomolécula adsorvida em superfícies planas, em mg/m^2

θ_A : Ângulo de contato de avanço

θ_R : Ângulo de contato de recesso

K_{ads} : constante de adsorção

n : índice de refração

Q : quantidade de Con A adsorvida em partículas esféricas, em $\mu\text{mol}_{\text{Con A}}/\text{g}_{\text{Pol}}$

Sumário

1. Introdução	15
2. Considerações gerais sobre as macromoléculas estudadas	21
2.1. Xiloglucanas de <i>Hymenaea coubaril</i> e de <i>Tamarindus indica</i>	21
2.2. Carboximetilcelulose.....	22
2.3. Quitosana.....	24
2.4. Concanavalina A.....	25
2.5. Hexoquinase.....	27
3. Objetivos	30
4. Materiais	31
5. Métodos	34
5.1. Adsorção de polissacarídeos.....	34
5.2. Obtenção de filmes de PMMA.....	35
5.3. Elipsometria.....	35
5.4. Obtenção de isoterma de adsorção de Con A sobre filmes finos.....	36
5.5. Ângulo de Contato.....	37
5.6. Síntese de partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos.....	37
5.7. Obtenção de isoterma de adsorção de biomoléculas sobre partículas poliméricas.....	39
5.8. Medida da atividade enzimática de HK livre e imobilizada.....	40
5.9. Microscopia de Força Atômica.....	41
6. Resultados e Discussão	49
6.1. Adsorção de TXG e HXG sobre superfícies de Si modificado com grupos amina.....	49
6.2. Adsorção de TXG e HXG sobre Si/SiO ₂	53
6.3. Adsorção de Con A sobre superfícies sólidas planas.....	56

6.4. Adsorção de Con A sobre partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos.....	67
6.5. Forças de adesão entre partículas PMMA/CMC e Con A.....	71
6.6. Adsorção de HK sobre partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos.....	79
6.7. Medida da atividade enzimática de HK livre e imobilizada.....	83
6.8. Forças de adesão entre partículas PS/CH e HK.....	87
7. Conclusões.....	98
8. Referências.....	101

1- Introdução

A imobilização de proteínas sobre superfícies sólidas permite a utilização das mesmas em dispositivos biotecnológicos e seu estudo envolve aspectos físico-químicos fundamentais a respeito das interações entre biomoléculas e superfícies, assim como em relação às interações intermoleculares entre biomoléculas.

Interações específicas, como as existentes entre enzima-substrato, lectina-carboidrato, antígeno-anticorpo e oligonucleotídeos complementares, são bastante exploradas na obtenção de biossensores. Tais dispositivos combinam biomoléculas a um detector físico-químico (eletroquímico, óptico, ou piezoelétrico) e são capazes de reconhecer um determinado analito de interesse biológico [Eggins, 1997, Borisov & Wolfbeis, 2008].

Enzimas compõem uma classe de proteína bastante estudada, que possuem a característica de se ligarem através de sítios ativos específicos a determinados substratos, catalisando reações fisiológicas. Essas biomoléculas podem ser imobilizadas sobre superfícies através da simples adsorção física, ou da formação de ligação química covalente. Esta última, apesar de ter a vantagem de ser irreversível, é experimentalmente mais complicada e mais suscetível a gerar mudanças conformacionais que resultam na perda da atividade enzimática [Chibata e col., 1978].

O estudo da adsorção de enzimas sobre superfícies sólidas envolve aspectos físico-químicos complexos, como a cinética de adsorção [Lyklema & Norde, 1996; Ramsden, 1998; Vasina & Dejardin, 2003], as forças de interação enzima-superfície e as eventuais mudanças conformacionais que alteram a atividade da enzima imobilizada [Chibata e col., 1978]. Por exemplo, Mateo e colaboradores [Mateo *et al.*, 2000] observaram que a enzima lipase manteve 100% de sua atividade catalítica ao ser imobilizada sobre compósitos de agarose e polietileno-imina, e após estocagem por 25 dias em solução tampão pH 7 e a 37°C perdeu

apenas 40% de atividade, enquanto a lipase livre em solução nas mesmas condições perdeu totalmente sua atividade catalítica em apenas dois dias. Os autores ressaltaram o impedimento da agregação das moléculas da enzima como principal vantagem da imobilização. Um estudo prévio do nosso grupo [Pancera *et al.*, 2006b], mostrou que a conformação da enzima creatina fosfoquinase é influenciada pelo pH do meio tanto em solução como quando adsorvida sobre lâminas de silício e que o pH ótimo de atividade catalítica mudou de 6,8 para 9 após a imobilização.

A adsorção de proteínas sobre superfícies sólidas pode se dar por efeitos hidrofóbicos, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio, por isso, na maioria dos casos a superfície deve ser previamente modificada para favorecer as interações desejadas. Muguruma e colaboradores [Muguruma *et al.*, 2006] estudaram a adsorção da enzima glucose oxidase sobre três diferentes superfícies: filmes finos de hexametildisiloxano (i) sem nenhum tratamento, superfície hidrofóbica e neutra; (ii) tratados com plasma (nitrogênio), superfície hidrofílica e positivamente carregada; e (iii) tratados com plasma (oxigênio), superfície hidrofílica e negativamente carregada. A enzima adsorveu cobrindo aproximadamente 60% da superfície (i), completamente a superfície (ii), e apenas poucas moléculas isoladas foram observadas sobre a superfície (iii). Além disso, a enzima sobre a superfície (ii) apresentou melhores propriedades para utilização como um biossensor para glicose.

O grande desafio no desenvolvimento de biossensores está em obter superfícies que favoreçam a imobilização da proteína na melhor conformação possível, de forma que suas características de seletividade, especificidade e atividade catalítica (no caso das enzimas) permaneçam inalteradas. A imobilização ainda contribui para facilitar a manipulação do sensor, possibilitando a sua reutilização e o seu armazenamento em temperatura e pressão ambientes por longos períodos. Recentemente, foi observado por nosso grupo [Kosaka e col. 2007], que a adsorção da enzima lipase sobre filmes finos de ésteres de celulose foi mais

pronunciada quando os filmes haviam passado previamente por um tratamento térmico, que tornava a superfície mais hidrofóbica. A lipase imobilizada sobre estes filmes apresentou atividade catalítica maior do que a mesma livre em solução e ainda pôde ser utilizada até três vezes sem perder atividade. Ao ser estocada em temperatura e pressão ambientes por 30 dias, a lipase imobilizada sobre os filmes hidrofóbicos manteve 70% da atividade, enquanto sobre os filmes hidrofílicos manteve apenas 30% da atividade, evidenciando o papel da natureza da superfície na conformação da enzima imobilizada.

Filmes finos poliméricos, como mostrado nos exemplos acima, são largamente utilizados como suporte para biomoléculas. Eles também possuem aplicações em microeletrônica, no desenvolvimento de biomateriais [Sampath & Lev, 1997; Kumar e col, 2003; Fernandes e col., 2004], e testes diagnósticos [Delair e col., 1999]. Filmes de poliestireno (PS), por exemplo, são utilizados como suporte para o crescimento de células [Walboomers *et al.*, 1999], adsorção de colágeno [Dupont-Gillain & Rouxhet, 2001] e deposição de fosfolipídeos [Elliott *et al.*, 2003].

A formação, morfologia e estabilidade dos filmes poliméricos devem ser cuidadosamente estudadas para assegurar o uso dos mesmos com as finalidades biotecnológicas desejadas. Os métodos mais utilizados para a obtenção de filmes finos poliméricos são os de Langmuir-Blodget [Schwartz, 1997], de revestimento rotacional [Petri, 2002], de adsorção e automontagem (*Layer-by-Layer*) [Decher, 1997].

Além dos filmes finos, outras formas de substratos são exploradas no estudo da imobilização de biomoléculas, como por exemplo, membranas lipídicas, vesículas, hidrogéis, partículas inorgânicas e partículas poliméricas. Estas últimas, por exemplo, apresentam algumas vantagens em relação a filmes finos, tais como a alta mobilidade e habilidade de difusão, o pequeno tamanho e volume necessário para uma grande área superficial, além da possibilidade de reversibilidade na estabilidade coloidal [Okubo & Ahmad, 1998; Kawaguchi,

2000; Huang e col., 2005]. Caruso e Schüler [Caruso & Schüler, 2000] utilizaram partículas de PS previamente recobertas com polieletrólito para imobilizar a enzima glucose oxidase. Esta apresentou um aumento significativo na estabilidade em função do pH do meio (de 3 a 11) e da temperatura (de 20 a 65°C) após a imobilização, ampliando sua aplicação como biocatalisador. Du e Kodaka [Du & Kodaka, 2005] imobilizaram a enzima piruvato-quinase sobre partículas de poli(glicidilmetacrilato-*co*-divinilbenzeno)/poliestireno através de ligação química covalente e a enzima imobilizada se manteve ativa, mesmo após armazenamento a 4°C por 48 dias.

Para serem usadas como suporte para biomoléculas, as partículas poliméricas devem ter alta estabilidade coloidal em condições fisiológicas, porque em muitos casos as interações específicas entre as biomoléculas causam aglutinação, e estas interações podem ser confundidas com a perda de estabilidade coloidal das partículas [Kawagushi, 2000; Lee e col., 2005].

Dentre as inúmeras composições de partículas estudadas, partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos apresentam alta estabilidade coloidal e têm, particularmente, mostrado importantes aplicações como suporte para catalisadores enzimáticos [Caruso e col., 2000; Silva e col., 2007], e também em medicina e biologia, como carreadores de drogas [Marie e col., 2002], testes diagnósticos [Delgado e col., 2001], biosseparação e purificação de proteínas [Chern e col., 1999]. Chern e colaboradores modificaram partículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) com o polissacarídeo quitosana, tornando-as mais estáveis à adição de eletrólitos, possibilitando a investigação das interações dessas partículas com a proteína albumina do soro bovino, e a conseqüente utilização dessas partículas em cromatografia de afinidade para purificação de proteínas [Chern et al. 1999 a e 1999b]. Em um trabalho prévio [Castro e col., 2004], obtivemos partículas de PMMA e PS extremamente estáveis, polimerizadas em complexos formados pelo surfatante brometo de

cetiltrimetilamônio (CTAB) e o polissacarídeo carboximetilcelulose de sódio (CMC). Estas partículas apresentam grande potencial como suporte para imobilização de biomoléculas, porque apresentam superfícies decoradas com polissacarídeo, além de serem sintetizadas e estabilizadas numa única etapa, reduzindo impacto ambiental, uma vez que esse sistema requer menores quantidades de surfatante.

Independentemente da forma do suporte, sejam filmes ou partículas, superfícies de polissacarídeos têm se destacado para fins biotecnológicos em relação aos polímeros sintéticos, pelas vantagens de serem biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis [Sackmann, 1996; Sierakowski *et al.*, 2002; He & Hu, 2004; Cai *et al.*, 2005]. Além dessas vantagens, o reconhecimento dos polissacarídeos por sistemas biológicos e biomoléculas vem sendo largamente explorado. Por exemplo, estudos espectroscópicos revelaram o reconhecimento da lectina concanavalina A (Con A) imobilizada, por resíduos de manose e glicose, presentes em filmes automontados de polissacarídeos, indicando o potencial desses filmes em mimetizar estruturas naturais das superfícies celulares [Revell *et al.*, 1998].

Lectinas, como a Con A, são proteínas geralmente encontradas na membrana celular de plantas, animais e microorganismos, que interagem com carboidratos através de ligações altamente específicas. Estas proteínas são utilizadas como sensores no estudo de detecção e tipagem de carboidratos da superfície de membranas celulares e também em estudos imunológicos, por possuírem a propriedade de aglutinação na presença de determinados eritrócitos *in vitro* [Sharon & Lis, 1972; Montreuil *et al.*, 1996; Gilboa-Garber *et al.*, 1998; Dam & Brewer, 2002]. Por exemplo, a imobilização de jacalina, uma lectina encontrada na semente da jaca, apresenta grande potencial no diagnóstico de câncer, por suas propriedades de se ligar especificamente ao antígeno-T (Gal β 1–3GalNAc), expresso em 85% dos carcinomas humanos [Jeyaprakash *et al.*, 2002].

O estudo da imobilização de proteínas sobre superfícies sólidas possui uma gama inesgotável de pares, pois, devido à complexidade das biomoléculas, não existe apenas um método de imobilização, tampouco uma única superfície que seja excelente para todas as aplicações. Deste modo, ainda há necessidade de se obter novas superfícies que além de serem estáveis, possibilitem a manutenção das propriedades particulares de cada proteína.

2 – Considerações gerais sobre as macromoléculas utilizadas

2.1- Xiloglucanas de *Hymenaea courbaril* e de *Tamarindus indica*

Xiloglucanas (XGs) são polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas, que possuem um esqueleto celulósico (1→4)-β-D-glucopirano, decorado com resíduos α-D-xilopiranosose no carbono 6 e estão ligadas através de ligações de hidrogênio a fibras de celulose na parede celular. Estes polissacarídeos conferem boas propriedades mecânicas à parede celular, possibilitando a expansão, prevenindo a ruptura das células sob estresse osmótico [Carpita e Gibeaut, 1993; Heinze, 2005].

XGs são utilizadas como aditivo na indústria de papel, e o estudo detalhado da adsorção das mesmas sobre superfícies celulósicas evidenciou a presença de dois efeitos aparentemente contraditórios. A adsorção de XG reduz a fricção entre as fibras celulósicas, gerando papéis com a superfície mais lisa e, ao mesmo tempo, aumenta a adesão entre as fibras, resultando em papéis mais resistentes [Lima e col., 2003; Stiernstedt e col., 2006; Zhou e col., 2006].

A investigação do efeito das diferenças na estrutura fina de diferentes xiloglucanas, como massa molar e resíduos laterais, revelou que a interação com a celulose é maior para cadeias menores de XG. [Lima e Buckeridge, 2001; Lima e col., 2004]. Por outro lado, simulações utilizando dinâmica molecular revelaram que a adsorção de XG em celulose não é de natureza específica, ela ocorre independentemente da orientação da cadeia principal e das ramificações [Hanus & Mazeau, 2006].

O estudo da adsorção de XGs sobre superfícies não celulósicas, como lâminas de Si/SiO₂ ou mica foi pouco explorada. Essas superfícies são consideradas modelo, por serem extremamente lisas e homogêneas, tendo potencial aplicação no desenvolvimento de biossensores [Eggins, 1997]. Morris e colaboradores [2004] obtiveram camadas de XG

adsorvidas sobre superfície de mica e sobre pontas de microscópio de força atômica (AFM) para medir as interações com celulose. Os resultados indicam que pelo menos uma ligação do tipo ponte de hidrogênio é formada por resíduo de glicose da cadeia celulósica. Recentemente foram apresentadas isotermas de adsorção de XG e XG modificada com grupos tiol (XG-SH) sobre superfícies recobertas com ouro, utilizadas em micro-balança de quartzo. A quantidade de XG-SH adsorvida foi aproximadamente 10 vezes maior do que a de XG nativa, e as camadas de XG-SH adsorvidas mostraram atividade biológica na presença da enzima endo-xiloglucanase [Nordgren *et al.*, 2008].

A diferença entre as xiloglucanas obtidas das sementes de *Tamarindus indica* (TXG) e de *Hymenaea courbaril* (HXG) está nas ramificações de α -D-xilopiranosose. HXG possui oligossacarídeos do tipo XXXXG, (4 xilose (X) e 1 glicose (G)) em sua estrutura, o que leva a uma maior rigidez das cadeias (maior tamanho de persistência) [Freitas e col., 2005]. Portanto, filmes formados por essas xiloglucanas podem apresentar características diferentes.

Esta tese apresenta a obtenção e caracterização de filmes finos de xiloglucanas de duas fontes diferentes, *Tamarindus indica* e *Hymenaea courbaril*, sobre lâminas de Si/SiO₂ e sobre lâminas com a superfície modificada com grupos amina, assim como a aplicação desses filmes como substrato para imobilização da proteína concanavalina A.

2.2- Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose de sódio, CMC, é um derivado de celulose produzido via reação de Williamson, de celulose com monocloroacetato de sódio na presença de hidróxido de sódio [Just e Majewicz, 1985]. Os grupos hidroxila ligados aos carbonos 2 e 6 são preferencialmente substituídos pelos grupos carboxilato, que conferem ao polissacarídeo solubilidade em água, quando o grau de substituição médio (DS) é maior do que 0,6.

A CMC é um importante produto industrial, muito utilizado como espessante e estabilizante na indústria de alimentos, tintas e papel. Ela pode ser produzida a pressão atmosférica, diferentemente da maioria dos éteres de celulose, e pode ser obtida a partir de biomassa abundante e barata, como o bagaço da cana-de-açúcar proveniente de usinas de açúcar e álcool [Just e Majewicz, 1985].

Além das vantagens comuns a outros polissacarídeos de ser biocompatível e obtida de fonte renovável, a CMC se comporta como um poliânion em $\text{pH} > 3$, por isso, muitos estudos sobre a formação de complexos entre CMC e surfatantes de cargas opostas em solução vêm sendo investigados [Hayakawa, 1983; Guillot, 2003; Naves e col., 2005; Chakraborty e col., 2006; Trabelsi e col., 2007]. Geralmente a adição de um polieletrólito a uma solução de surfatante de carga oposta favorece a formação de complexos, devido à atração eletrostática entre as cadeias de cargas opostas e a conseqüente liberação de contra-íons para o meio [Thalberg & Lindman, 1989; Wallin & Linse, 1996]. Estes complexos se formam na chamada concentração de agregação crítica (cac), a qual é sempre menor que a concentração micelar crítica (cmc) do surfatante puro.

Uma outra fonte de estudos a respeito da CMC está na adsorção e formação de filmes finos sobre substratos sólidos, que estão bem caracterizados e reportados [Hoogendam *et al.*, 1998; Stuart *et al.*, 1998; Fujimoto & Petri, 2001; Fujimoto *et al.*, 2002].

Complexos formados por CMC e o surfatante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram utilizados como sítios para a polimerização de MMA, obtendo-se partículas híbridas PMMA/CMC [Castro e col., 2004]. Estas partículas PMMA/CMC, assim como os filmes finos de CMC serão utilizados como substrato para imobilização da lectina Con A.

2.3 - Quitosana

Quitosana (CH) poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosse] é um polissacarídeo obtido por desacetilação em meio alcalino da quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, o segundo material orgânico mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. A quitosana também ocorre naturalmente na parede celular de alguns fungos, como *aspergillus* e *mucor*, mas em pequenas proporções, quando comparada com a quitina [Muzzarelli, 1977; Roberts, 1992].

A estrutura da quitosana, obtida por desacetilação da quitina ou extraída de fontes naturais, é de um copolímero de unidades N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, sendo distinguíveis pela solubilidade em solução aquosa levemente ácida. Portanto, o pK_a do polissacarídeo depende do grau de desacetilação e da densidade linear de carga. Valores de pK_a reportados na literatura para o monômero D-glucosamina estão na faixa de 7,5 a 7,8, enquanto para quitosana, o pK_a pode variar entre 6,0 e 6,8, devido à repulsão eletrostática entre os grupos -NH₃⁺ adjacentes [Domard, 1987].

A quitosana possui muitas aplicações tecnológicas e é utilizada, por exemplo, no tratamento de efluentes industriais [Rinaudo, 1989], na área farmacêutica como carreador de drogas [Sinha *et al.*, 2004], como material biocompatível na área médica e de cosméticos [Lehr *et al.*; 1992; van der Lubben *et al.* 2001; Rabea *et al.*, 2003], como agente biocida [Vieira *et al.* 2003], suporte para imobilização de enzimas [Krajewska, 2004], estabilizante coloidal [Marie *et al.*, 2002] e ainda como quelante de metais pesados [Micera *et al.*, 1985; Monteiro & Airoidi, 1999].

Neste trabalho, CH foi utilizada na forma de complexos com o surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) para a síntese de partículas híbridas de poliestireno/quitosana

(PS/CH). Estas partículas foram utilizadas como substratos para a imobilização da enzima hexoquinase.

2.4- Concanavalina A

Lectinas são proteínas encontradas em vários tecidos de plantas, microorganismos e animais, conhecidas pela capacidade de aglutinar eritrócitos através de ligações específicas a determinados carboidratos, por isso, também são chamadas de hemaglutininas [Sharon & Lis, 1972]. Devido à alta especificidade, elas possuem aplicações na determinação de tipos sanguíneos, reconhecimento de carboidratos de superfícies celulares, detecção de cromossomos defeituosos e nos diagnósticos de câncer e imunodeficiências [Sharon & Lis, 1998 e 2004; Gilboa-Garber *et al.*, 1998; Dam & Brewer, 2002; Jeyaprakash *et al.*, 2002].

Concanavalina A (Con A) é uma lectina de origem vegetal, pertencente à família das lectinas leguminosas, extraída da semente do feijão, que se liga especificamente às unidades α -D-manose e α -D-glicose de carboidratos complexos. Sua estrutura molecular, reportada por Reeke e colaboradores [Reeke *et al.*, 1975], é composta por duas subunidades idênticas de 237 resíduos de aminoácidos, de 26 000 g/mol cada uma. Ela se apresenta como dímero em pH 4,5 a 6,0, e em pH maior que 7, é predominantemente um tetrâmero [Dam & Brewer, 2002]. O reconhecimento dos carboidratos por Con A ocorre através de ligações do tipo pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos polares Asn14, Arg228, Tyr100 e Asp208 e os átomos de oxigênio do anel glicosídico, formando o chamado “*cluster effect*”. Além disso, para a macromolécula de Con A se ligar aos açúcares, dois íons metálicos, Mn^{2+} e Ca^{2+} , devem estar presentes no meio. Cada íon Mn^{2+} está coordenado aos resíduos Glu8, His24, Asp10 e Asp19 da unidade monomérica da Con A, e a duas moléculas

de água, enquanto Ca^{2+} está coordenado aos resíduos Asp10, Asp19, Tyr12 e Arg228, e também a mais duas moléculas de água. [Grimaldi e Sykes 1975; Loris *et al.*, 1998].

Por ter sido a primeira lectina isolada, a Con A tem estrutura e propriedades bem caracterizadas [Sharon & Lis, 2004], e muitos estudos de imobilização dessa biomolécula vêm sendo realizados. Chern e colaboradores reportaram a adsorção de Con A sobre partículas de PMMA com superfície de dextrana, um polissacarídeo com unidades de glicose. A adsorção da lectina levou à coagulação das partículas e o mecanismo da coagulação não pôde ser descrito apenas pelo efeito de neutralização das cargas negativas da superfície das partículas, portanto a formação de complexos Con A-dextrana via afinidade específica lectina-carboidrato também foi considerada. A isoterma de adsorção de Con A sobre estas partículas seguiu o modelo de Langmuir, com constante de adsorção (K_{ads}) de $3,5 \times 10^7$ L/mol [Chern *et al.*, 1998 e 1999c]. Por outro lado, adsorção de Con A sobre filmes automontados de manose sobre ouro, também descrita pelo modelo de Langmuir, apresentou K_{ads} de $3,9 \times 10^6$ L/mol [Zhang *et al.*, 2006].

Informações mais precisas a respeito das interações moleculares entre Con A e carboidratos têm sido reveladas através de microscopia de força atômica (AFM). Chen e Moy [Chen e Moy, 2000] utilizaram Con A imobilizada em pontas AFM e mediram forças de adesão da ordem de 86 pN entre Con A e açúcares receptores de Con A presentes em células fibroblásticas. Essa força foi atribuída à ruptura de ligações específicas lectina-carboidrato, uma vez que esses eventos não foram observados na presença de moléculas livres de D-manose no meio. Touhami e colaboradores [Touhami e col., 2003b] mediram forças de adesão da ordem de 96 pN entre superfícies de Con A covalentemente imobilizadas sobre filmes de ouro e oligoglicose imobilizada na ponta do AFM. Esse mesmo grupo [Touhami e col., 2003a] mediu forças de adesão lectina-carboidrato envolvidas na floculação de células de

levedura da ordem de 121 pN. A compreensão do evento de floculação dessas células é de suma importância para a tecnologia de fermentação.

A possibilidade de se distinguir as forças intermoleculares entre Con A e diferentes receptores foi estudada por AFM [Leeka *et al.*, 2004], medindo-se forças de adesão entre Con A e as glicoproteínas imobilizadas arilsulfatase A e carboxipeptidase A, e entre Con A e a superfície de células de carcinoma da próstata. Esses sistemas se mostraram promissores na investigação das alterações na expressão de glicoproteínas de membrana celular nos diferentes tipos de câncer.

Será apresentado o estudo da imobilização de Con A sobre filmes finos de polissacarídeos e sobre partículas híbridas de polímero e polissacarídeos, com potencial de posterior utilização dessas superfícies no reconhecimento e detecção de carboidratos.

2.5 - Hexoquinase

Enzimas são proteínas seletivas, catalisadoras das reações metabólicas que ocorrem nos organismos vivos, mesmo que existam outras reações termodinamicamente mais favoráveis. Na via glicolítica, por exemplo, ATP na presença de glicose e água poderia sofrer hidrólise, formando ADP e fosfato, processo termodinamicamente mais favorável do que a fosforilação da glicose, que ocorre graças à enzima hexoquinase (HK) e ao mecanismo “chave-fechadura” conhecido para várias enzimas [Voet e Voet, 1995].

HK é a primeira enzima da via glicolítica, que reside no citosol e catalisa a fosforilação da D-glicose, consumindo ATP, formando glicose-6-fosfato, G-6-P, liberando ADP. Na prática, a enzima necessita da presença de íons Mg^{2+} , que forma o complexo Mg^{2+} -ATP, blindando as cargas negativas do ATP e, conseqüentemente, facilitando o ataque nucleofílico [Jones *et al.*, 1991; Matte *et al.*, 1998].

A estrutura molecular da HK de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é composta por 457 resíduos de aminoácidos, distribuídos em dois domínios de tamanhos diferentes, que formam uma cavidade, onde se encontra o sítio ativo. Nesta cavidade, as cadeias laterais dos aminoácidos polares Asn237, Glu269 e Glu302 formam ligações do tipo pontes de hidrogênio com os átomos de oxigênio da molécula de glicose, nas posições 4, 3 e 1, respectivamente, enquanto o resíduo Asp211 remove o próton da hidroxila da posição 6, onde ocorre a fosforilação [Kuser *et al.*, 2000]. Quando a glicose se liga a esses aminoácidos, ocorre uma mudança conformacional na enzima. O domínio menor se move aproximadamente 8 Å em direção ao maior, fechando a cavidade e diminuindo em 0,9 Å o raio de giração da HK [Bennett *et al.*, 1978; McDonald *et al.*, 1979]. Medidas de estresse osmótico mostraram que aproximadamente 60 moléculas de água são excluídas da cavidade durante a catálise enzimática [Rand e col., 1993].

A HK possui uma relativa especificidade, e apesar de não fosforilar a D-galactose, pode fosforilar além da D-glicose algumas outras hexoses, como D-frutose e D-manose, com afinidades e velocidades diferentes [Viola *et al.*, 1982]. Por conta dessa abrangência de substratos, o uso de HK como catalisador regioseletivo para a síntese orgânica de diversos açúcares fosforilados pôde ser explorado [Chenault *et al.*, 1997].

Além das vantagens como catalisador enzimático, biossensores baseados em hexoquinase imobilizada podem ser muito importantes para fins científicos e até comerciais, uma vez que a disfunção em qualquer etapa do metabolismo de açúcares acarreta uma série de doenças, como diabetes [Pickup e col., 2005a e 2005b, Pancera e col., 2006a]. Cheng e colaboradores [Cheng *et al.*, 1997] desenvolveram um sensor colorimétrico para glicose a partir de HK imobilizada sobre filmes lipídicos obtidos pelo método de Langmuir-Blodgett. HK encapsulada em tetrametilortosilicato (TMOS) poroso apresentou potencial uso como sensor *in vivo* para glicose [Pickup e col., 2005b]. Sensores amperométricos para ATP

também foram desenvolvidos a partir de HK imobilizada sobre eletrodos de platina [Kueng e col., 2004].

Será apresentada a imobilização da enzima HK sobre duas diferentes partículas híbridas, PMMA/CMC e PS/CH, assim como o efeito da imobilização na sua atividade catalítica e na seletividade entre os açúcares D-glicose, D-frutose e D-manose.

3 – Objetivos

O objetivo geral desta tese consiste na obtenção e caracterização de novas superfícies de polissacarídeos para a imobilização de proteínas. Dentro deste, estão compreendidos os seguintes objetivos específicos:

- Verificar o efeito da estrutura fina de xiloglucanas de *Hymenaea courbaril* e *Tamarindus indica* na formação e morfologia de filmes finos desses polissacarídeos.
- Estudo comparativo da imobilização da lectina Con A sobre lâminas de Si/SiO₂, filmes finos de PMMA, filmes finos de três diferentes polissacarídeos, TXG, HXG e CMC e sobre partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos.
- Estudo da imobilização da enzima HK sobre duas diferentes partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos, bem como de sua atividade catalítica após a imobilização.
- Explorar a técnica de microscopia de força atômica na caracterização de partículas poliméricas, bem como no estudo das interações entre proteínas e superfícies e ainda entre a proteína imobilizada e seu substrato específico.

4- Materiais

As biomoléculas, Con A (*Canavalia ensiformis*, C2010, massa molar de 25 583 g/mol, tipo IV) e HK (*Saccharomyces cerevisiae*, H5000, massa molar de 52 000 g/mol, tipo III) assim como todos os reagentes utilizados para a medida da atividade enzimática da HK, β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺, N0505), adenosina 5'-trifosfato (ATP, A3377), D(+)-Glicose (G5250), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH, G4134, *Saccharomyces cerevisiae*) e tris(hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) foram comprados da Sigma, (EUA) e os açúcares D(-)-Frutose e D(+)-Manose obtidos da Fluka (Suíça). Todos os reagentes foram usados sem purificação prévia. As figuras 1a a 1c apresenta as estruturas químicas dos açúcares utilizados.

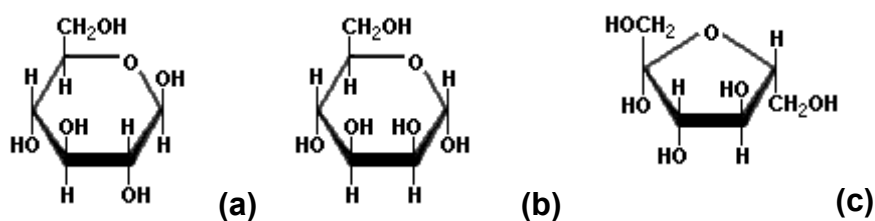


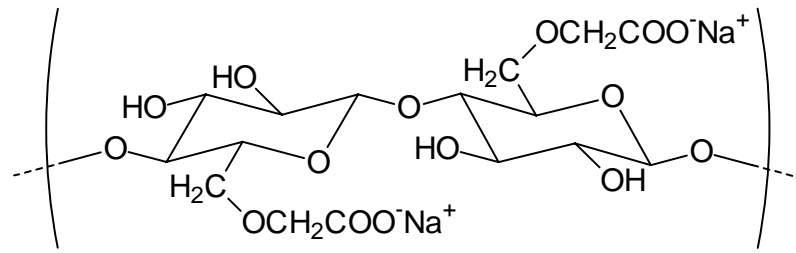
Figura 1 – Estrutura química dos açúcares utilizados: (a) glicose, (b) manose e (c) frutose.

Lâminas de Si (100) recobertas com uma camada nativa de SiO₂ (SiQuest, EUA) foram utilizadas como substrato para a formação de filmes finos, por serem superfícies bem definidas, planas e refletoras. Aminopropiltriétoxissilano, APS (Sigma, EUA), foi utilizado para silanização das lâminas de Si/SiO₂ e posterior adsorção de polissacarídeos.

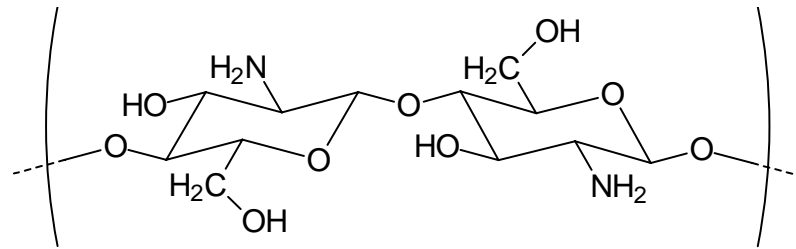
Carboximetilcelulose de sódio (CMC) com massa molar de 90 000 g/mol e grau de substituição (DS) igual a 0,7 foi obtida da Aldrich, EUA. Quitosana, CH, (Fluka, Suíça), apresentou grau de desacetilação nominal (DA) de 20% e massa molar de 219 500 g/mol. Xiloglucanas extraídas de sementes de *Hymenaea courbaril* (massa molar de $2,2 \times 10^6$ g/mol e tamanho de persistência de 10,9 nm) e de *Tamarindus indica* (massa molar de $1,1 \times 10^6$ g/mol e tamanho de persistência de 6,2 nm) foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Maria Rita Sierakowski, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. As estruturas químicas dos polissacarídeos estão esquematicamente representadas na Figura 2.

Partículas híbridas de PMMA/CMC, e de PS/CH sintetizadas em emulsão, segundo método previamente descrito por este grupo [Castro e col. 2004 e 2007], também foram utilizadas como substrato para imobilização das biomoléculas.

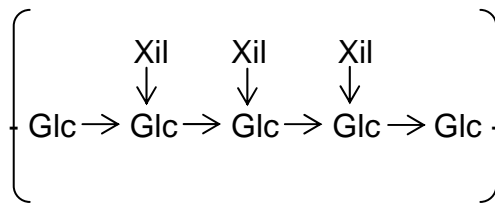
Todos os sais utilizados, NaCl, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, assim como os solventes orgânicos foram adquiridos da Casa Americana, SP, Brasil.



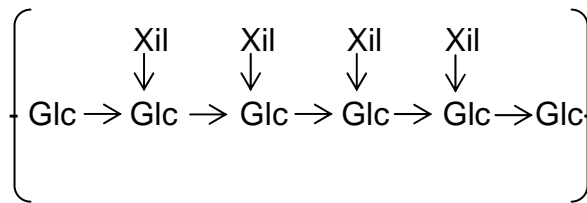
(a)



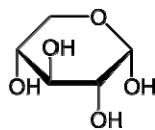
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 2 – Estrutura química dos polissacarídeos utilizados. a) carboximetilcelulose (DS = 1) b) quitosana (DA = 100%) c) oligossacarídeos XXXG, presentes em TXG d) oligossacarídeos XXXXG, presentes em HXG. Em c) e d) Xil representa unidades de xilose, Glc de glicose e as setas indicam as ligações glicosídicas: →, ligação β-(1→4) e ↓, ligação α-(1→6) e) unidade monomérica de α-D-xilopiranosose.

5- Métodos

5.1- Adsorção de polissacarídeos

Lâminas de Si/SiO₂ foram lavadas com uma mistura oxidativa contendo NH₃ (25% v/v), H₂O₂ (30% v/v) e água destilada na proporção (1:1:5) a aproximadamente 80°C por 20 minutos e em seguida foram lavadas com água destilada e secas com jatos de nitrogênio. Em alguns casos foi realizada a reação de silanização na superfície, imergindo as lâminas em uma solução de APS (1% v/v) em tolueno, a 60°C por 5 minutos, e posterior lavagem com tolueno. Nestas condições, uma camada homogênea e plana de APS é formada, deixando a superfície funcionalizada com os grupos de amina primária, que em pH < 4 estão protonados [Petri *et al.*, 1999].

A adsorção de XG sobre lâminas de Si/SiO₂ e sobre lâminas silanizadas com APS foram obtidos por dois métodos: (i) as placas foram imersas em soluções aquosas de XG 0,5 g/L, na faixa de pH de 3 a 7, a (24 ± 1)°C para adsorção de XG em condições de equilíbrio; após 12 horas, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas com jatos de N₂ e caracterizadas ou (ii) 10µL de cada solução de XG (pH~6,5) foi depositada sobre a superfície de Si/SiO₂ com grupos amino ou não. A água evaporou em condições ambiente de temperatura e umidade. Depois que todo o solvente foi evaporado, as amostras foram imersas em água destilada por 24 h para que o material fisicamente adsorvido pudesse desorver.

Para a adsorção de CMC, lâminas de Si/SiO₂ silanizadas com APS foram imersas em soluções de CMC 1,0 g/L, na presença de NaCl 0,001 mol/L e em pH = 3,5, a (24 ± 1)°C por 3 horas, lavadas com água destilada e secas com jatos de N₂.

5.2- Filmes de PMMA

As lâminas de Si/SiO₂ previamente lavadas foram colocadas na base giratória do *spinner* (Spinner EC101DT-R485, Headway), com sucção a vácuo, e sobre as lâminas foi gotejada uma solução de PMMA em tolueno 10 g/L até recobrir toda a superfície. Cada amostra foi submetida à rotação de 3 000 rpm por 30 segundos. Durante a rotação, o tolueno evapora e filmes poliméricos homogêneos são formados na superfície das lâminas [Petri, 2002].

5.3- Elipsometria

A elipsometria consiste em medir a mudança do estado de polarização da luz após a reflexão, a partir de uma superfície isotrópica refletora. As mudanças de fase e de amplitude da radiação após a reflexão são medidas com relação à radiação incidente [Azzam & Bashara, 1979]. Foi utilizado o elipsômetro DRE – ELX02 (Ratzeburg, Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) com ângulo de incidência ajustado em 70,0° cobrindo uma área de aproximadamente 3 mm².

A determinação da espessura dos filmes (d) é realizada através de cálculos a partir dos ângulos elipsométricos Δ e Ψ medidos, com um programa que utiliza as relações de Drude e Fresnel, a equação fundamental da elipsometria (equação 1), cálculos iterativos e matrizes de Jones

$$\tan \psi e^{i\Delta} = R_P/R_S = f(n, d, \phi, \lambda) \quad (1)$$

onde Δ é a diferença entre as mudanças de fase das componentes paralela e perpendicular da onda incidente (δ_i) e refletora (δ_r) ($\Delta = \delta_i - \delta_r$) e Ψ é o ângulo cuja tangente é a razão entre as amplitudes das componentes paralela e perpendicular da onda refletida. R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total de Fresnel para as componentes paralela e perpendicular da onda eletromagnética, respectivamente. Esses fatores variam em função do ângulo de incidência (ϕ) e comprimento de onda (λ) do laser, dos índices de refração (n) e espessura, (d) de cada camada do sistema.

Quando as espessuras das camadas são muito finas ($d < 10$ nm) ou quando o contraste óptico é muito pequeno, não é possível determinar d e n independentemente. Neste caso, utiliza-se valor de índice de refração obtido da literatura ou do fabricante e calcula-se somente d . Neste trabalho, os índices de refração foram fixados nos seguintes valores: Si ($n = 3,88 - 0,018i$) e SiO_2 $n = 1,462$ [Palik, 1985]. Para APS foi considerado o valor fornecido pelo fabricante (Fluka) $n = 1,424$. Para a camada de polissacarídeo, $n = 1,50$ [Just & Majewicz, 1985]; camada de Con A, $n = 1,52$ [Carter & Ho, 1994] e para o ar, $n = 1,0$.

As medidas elipsométricas foram realizadas no ar, a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ em pelo menos três áreas diferentes de cada amostra, para se obter informação sobre a homogeneidade do filme.

5.4- Obtenção de isoterma de adsorção de Con A sobre filmes finos

Soluções aquosas de Con A na faixa de concentração de 0,04 a 24 $\mu\text{mol/L}$ na presença de MnCl_2 0,01 mol/L e CaCl_2 0,01 mol/L em pH 4,5, condições ótimas para o uso da Con A [www.expasy.org], foram colocadas em contato com os filmes de XG, de CMC, de PMMA e lâminas de Si/SiO₂ por 3 horas, lavadas com água destilada e secas com N₂. A quantidade de

material adsorvido, Γ , em mg/m^2 , foi calculada a partir da espessura medida por elipsometria, através da equação (2):

$$\Gamma = \frac{d_{\text{ConA}}(n_{\text{ConA}} - n_0)}{dn/dc} = d_{\text{ConA}} c_{\text{ConA}} \quad (2)$$

onde n_{ConA} e n_0 são os índices de refração da camada de Con A e da solução, respectivamente. n_{ConA} foi considerado 1,52 e n_0 foi medido com um refratômetro Abbé. dn/dc é o incremento de índice de refração determinado com um refratômetro diferencial como 0,17 e c_{ConA} é a concentração média de Con A adsorvida.

5.5- Ângulo de Contato

As medidas de ângulos de contato foram obtidas pelo método da gota séssil, numa montagem construída no laboratório, composta por uma lente de aumento que projeta a imagem da gota na parede, uma câmera digital para capturar a imagem projetada e do aplicativo Corel Draw[®] para medir o ângulo a partir da imagem digital. O ângulo de contato de avanço (θ_A) foi obtido para gota de 6 μL água destilada depositada sobre os filmes e o ângulo de recesso (θ_R) foi determinado após a retirada de 3 μL da gota de água. A histerese, $\Delta\theta$, é dada pela diferença entre (θ_A) e (θ_R) indica heterogeneidade física (rugosidade) ou química da superfície [Adamson, 1990].

5.6- Síntese de partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos

A síntese dos polímeros sintéticos poli(metacrilato de metila) (PMMA), e poliestireno (PS), foi realizada em emulsão [Gilbert, 1995], com o iniciador radicalar, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ sob atmosfera de N_2 , a 82 ± 2 °C. O núcleo hidrofóbico de micelas, normalmente utilizado neste

tipo de reação como sítio de polimerização, foi substituído por sistemas de surfatante/polissacarídeo de cargas opostas. Estes sistemas foram previamente estudados por medidas de tensão superficial, para determinar as respectivas concentrações de agregação críticas, onde ocorre a formação de um complexo surfatante/polissacarídeo [Naves *et al.*, 2005]. O complexo formado entre surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0,25 mmol/L e o polissacarídeo aniônico carboximetilcelulose (CMC), 1 g/L foi utilizado com sítio hidrofóbico para a síntese de PMMA, e as partículas formadas foram chamadas de PMMA/CMC [Castro *et al.*, 2004].

Já o monômero estireno foi polimerizado nos complexos formados pelo surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio, (SDS) 0,10 mmol/L e o polissacarídeo catiônico quitosana (CH), 0,10 g/L, formando partículas chamadas de PS/CH [Castro *et al.*, 2007]. Depois de 3 horas a dispersão formada foi resfriada à temperatura ambiente e dialisada em membrana de acetato de celulose (faixa de corte em 14000 g/mol) com 4 trocas diárias de água, até que a condutividade da água da diálise ficasse próxima a da água destilada. Dessa forma são obtidas partículas híbridas coloidais estáveis com grupos funcionais na superfície, numa única etapa.

As partículas foram caracterizadas por medidas de potencial Zeta (ZetaPlus-Zeta Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation) equipado com um laser de $\lambda = 677$ nm. O valor do potencial zeta, ζ , é determinado a partir da mobilidade eletroforética, μ , e da equação de Smoluchowski: $\zeta = \mu\eta/\varepsilon$, onde η é a viscosidade do meio e ε a constante dielétrica do meio. O diâmetro médio das partículas, D , foi obtido por espalhamento de luz dinâmico, com laser a 90° e por microscopia eletrônica de varredura (LEO 440-I). O teor de sólidos e a taxa de conversão de monômero para polímero foram determinados gravimetricamente. A densidade numérica de partículas (N_p) foi calculada considerando o diâmetro médio obtido por espalhamento de luz dinâmico, teor de sólidos em 1 mL de

dispersão e densidade do polímero $1,0 \text{ g/cm}^3$. A estabilidade coloidal foi testada visualmente, adicionando NaCl $0,3 \text{ mol/L}$ ou $2,0 \text{ mol/L}$ em alíquotas da dispersão.

5.7 - Obtenção de isoterma de adsorção de biomoléculas sobre partículas poliméricas

Soluções aquosas de Con A ou de HK foram colocadas sob agitação por 3 horas com alíquotas da dispersão contendo partículas híbridas. A mistura foi centrifugada a $13\ 000 \text{ rpm}$ por 15 minutos e a absorbância em $\lambda = 280 \text{ nm}$ (comprimento de onda de máxima absorção para soluções de proteínas em geral, devido à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos Tyr, Trp e Phe) do sobrenadante foi medida num espectrofotômetro Beckmann Coulter DU600 e comparada com uma curva de calibração para determinar a concentração de proteína que não foi adsorvida nas partículas. Subtraindo este valor das respectivas concentrações iniciais, obtém-se o valor da concentração de Con A ou HK adsorvida nas partículas.

No caso da lectina Con A, as soluções aquosas foram preparadas na faixa de concentração de $1,5$ a $16 \text{ } \mu\text{mol/L}$ na presença de MnCl_2 $0,01 \text{ mol/L}$ e CaCl_2 $0,01 \text{ mol/L}$ em pH $4,5$ e dispersão contendo partículas de PMMA/CMC na concentração fixa de 1×10^{14} partículas/L (15g/L). A quantidade de material adsorvido, Q , é dada pela concentração de Con A adsorvida em $\mu\text{mol}_{\text{Con A}}$ por massa de partículas em gramas.

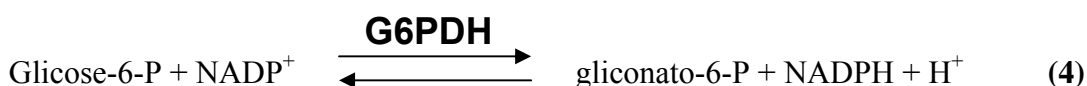
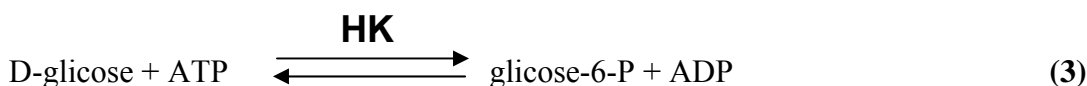
Para a adsorção da enzima HK, soluções na faixa de concentração de $0,05$ a $1,50 \text{ g/L}$ ($1,0$ a $30 \text{ } \mu\text{mol/L}$) em tampão Tris-HCl e MgCl_2 $10,0 \text{ mmol/L}$ foram adicionadas a alíquotas de partículas PMMA/CMC ou PS/CH previamente diluídas em Tris-HCl na concentração de $3,3 \times 10^{12}$ partículas/L.

Testes de dessorção foram realizados redispersando as partículas com proteínas adsorvidas em tampão Tris-HCl e em água. Após 24 horas as dispersões foram centrifugadas

a 13 000 rpm por 15 minutos e a concentração de proteína livre no sobrenadante foi novamente determinada por espectrofotometria em 280 nm.

5.8 - Medida da atividade enzimática da HK

O ensaio padrão da atividade enzimática da HK [Bergmeyer, 1984] se baseia na redução de NADP^+ a NADPH, que absorve em 340 nm, através da reação catalisada pela enzima G-6-PDH:



A atividade da HK foi determinada medindo o aumento da absorbância em $\lambda = 340$ nm em função do tempo. Usando a Lei de Beer-Lambert, a quantidade de NADPH formado foi calculada, considerando a absorvidade do NADPH, $\epsilon = 6,22 \text{ mmol/L cm}^{-1}$ e caminho óptico de 1 cm.

A concentração final em Tris-HCl de cada reagente para a medida da atividade da HK foi a seguinte: MgCl_2 10,0 mmol/L, G-6-PDH $1,4 \times 10^{-5}$ mmol/L, NADP^+ 0,062 mmol/L, ATP 1,50 mmol/L e glicose 50,0 mmol/L. O volume de 1 mL dessa mistura de reagentes foi adicionado às partículas PS/CH recobertas com HK na concentração de aproximadamente $3,3 \times 10^{12}$ partículas/L, e depois de uma hora o sobrenadante foi retirado e a absorbância medida. Como controle, a medida da atividade da enzima livre foi realizada adicionando solução de HK em Tris-HCl para completar o volume final de 1 mL, atingindo a mesma concentração final da HK adsorvida nas partículas. As soluções de HK livre e as partículas PS/CH

recobertas com HK foram estocadas durante um mês no laboratório, sem controle de temperatura ou umidade e as atividades enzimáticas foram medidas periodicamente. Para verificar a possibilidade de reuso, novas alíquotas de reagentes foram adicionadas às mesmas partículas PS/CH recobertas com HK, até três vezes.

5.9 - Microscopia de Força Atômica

Imagens topográficas tridimensionais são geradas através do monitoramento de forças de interação entre a superfície da amostra e uma sonda, que varre a superfície. A sonda geralmente consiste de uma ponta piramidal de nitreto de silício com raio terminal de aproximadamente 50 nm e está suportada num *cantilever* (aproximadamente 200 μm de comprimento) flexível de silício ou nitreto de silício (superfície refletora) cujo comportamento pode ser aproximado ao de uma mola de constante conhecida k que segue a lei de Hooke:

$$\mathbf{F} = -k \mathbf{d} \quad (5)$$

onde F é a força que atua no *cantilever* e d é a deflexão da extremidade livre do *cantilever*. A aproximação ponta-amostra é feita através de um *scanner* piezoelétrico, material que altera sua dimensão quando lhe é aplicado um potencial elétrico, capaz de gerar deslocamento com alta precisão. Um feixe de laser incide sobre a extremidade livre do *cantilever*, reflete em direção a um espelho, e é então novamente refletido ao centro de um fotodiodo de quatro quadrantes, como mostra a figura 3. Durante a varredura, conforme as forças de interação ponta – amostra defletem o *cantilever*, este é atraído ou repelido, deslocando-se verticalmente. Este deslocamento provoca uma mudança no ângulo de reflexão do feixe de laser, que resulta

em uma mudança na posição do laser no detector. Um programa de computador converte os dados provenientes do *scanner* em coordenadas (x,y) e da deflexão em altura no eixo z construindo assim imagens topográficas.

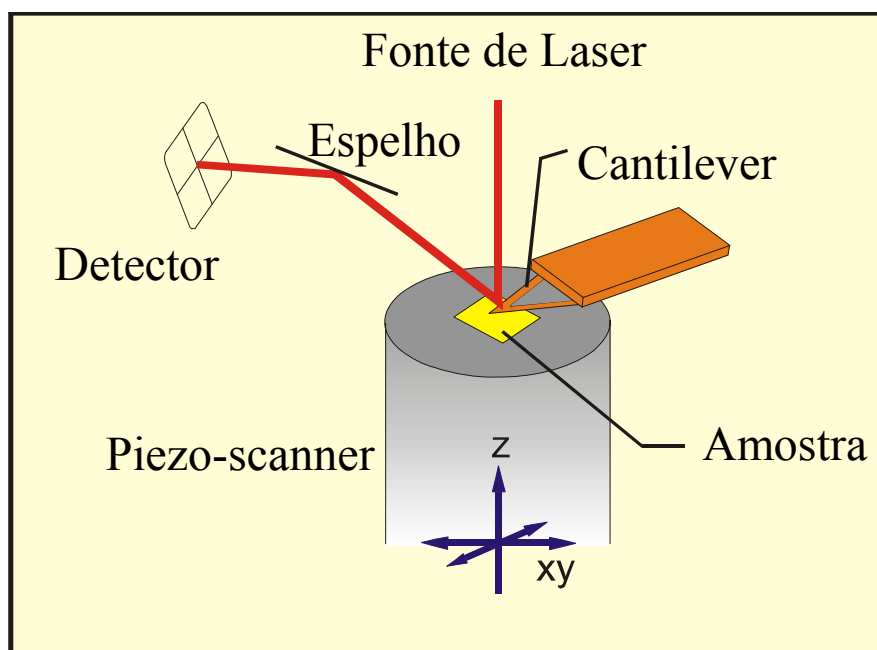


Figura 3 – Representação esquemática de um AFM.

Os filmes de xiloglucanas e de Con A sobre xiloglucanas foram caracterizados no microscópio PicoSPM LE (Molecular Imaging), operando no ar, no modo de contato intermitente em temperatura ambiente. Neste modo de operação, o *cantilever* oscila próximo à superfície da amostra, a uma amplitude definida, pré-determinada pelo valor do *setpoint*. Este modo permite a análise de amostras mais delicadas, como polímeros e biomoléculas, sem danificar a superfície. Quando a ponta do *cantilever* oscilante toca a superfície da amostra, os efeitos das forças adesivas e capilares se somam aos das forças repulsivas. Assim a interação da ponta – amostra gera além da mudança na frequência, uma mudança de fase na oscilação do *cantilever*. A distribuição dessa mudança de fase durante a varredura da amostra reflete as características do material analisado, de forma que heterogeneidades presentes na superfície

que não são observadas na imagem de topografia podem ser observadas nas imagens de fase [Maganov, 2004]. Cada *cantilever* operou um pouco abaixo da frequência de ressonância de aproximadamente 300 kHz. Pelo menos duas amostras de cada material foram analisadas em diferentes áreas da superfície. A rugosidade foi calculada através da média quadrática (rms) dos valores das alturas em cada ponto da superfície pelo programa do equipamento sobre as áreas totais varridas de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

As imagens das superfícies de Con A sobre Si/SiO₂, CMC e PMMA foram obtidas no Laboratório de Filmes Finos do IFUSP num equipamento Nanoscope IIIA (Veeco) operando nas mesmas condições acima descritas.

Microscopia de força atômica também pode ser utilizada para obtenção de curvas de força, que medem as interações entre ponta-amostra em um determinado ponto, sem a varredura nos eixos x e y. Essas curvas são muito utilizadas para caracterização de novos materiais, pois trazem informações a respeito da elasticidade, dureza, adesão e carga superficial. É também uma ferramenta essencial para medir forças intermoleculares, eletrostática, e de van der Waals envolvidas em processos bioquímicos.

O esquema na figura 4 mostra como o gráfico de curva de força é obtido. Conforme o *piezo-scanner* se expande, a amostra se aproxima da ponta (1) até que em (2) o gradiente de forças atrativas entre ponta-amostra se torna maior do que a constante de mola do *cantilever* e ocorre uma aceleração do *cantilever* em direção à amostra, o chamado “*jump in*”, e em (3) a ponta realmente entra em contato com a amostra. Logo após o contato, ocorre adesão entre a ponta e a superfície em (4). A partir deste ponto o *piezo-scanner* se contrai para que a ponta se afaste da superfície e o *cantilever* é então movido em direção contrária à amostra (5) [Butt, 1991, Ducker e col., 1991, Butt e col., 2005].

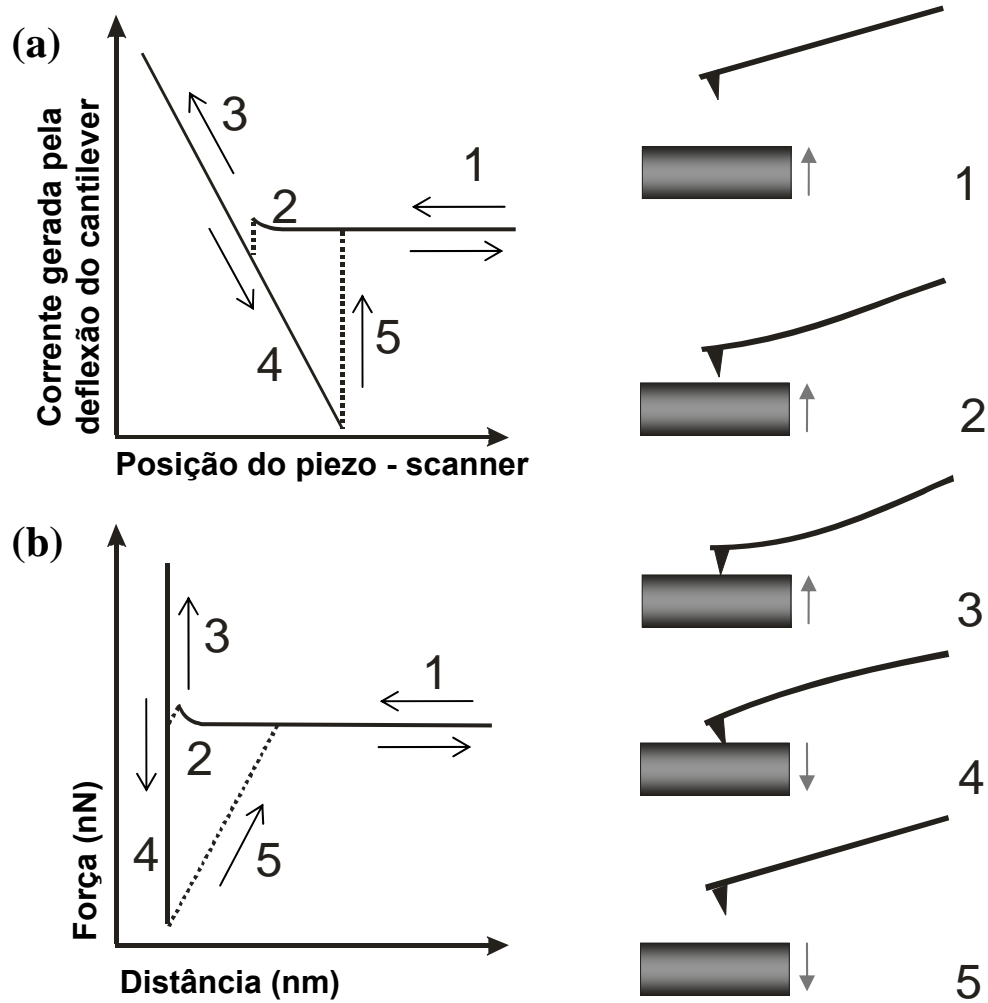


Figura 4 – Obtenção de gráficos de curvas de força com o AFM. a) deflexão do *cantilever* versus posição do scanner e b) força versus distância.

A curva de afastamento raramente se sobrepõe à de aproximação. Geralmente observa-se uma histerese, devido algum tipo de adesão da ponta à amostra. Quanto maior a adesão, maior é a histerese observada. O tipo de adesão varia conforme o sistema estudado. Em temperatura e pressão ambiente, a principal fonte de adesão está relacionada à força de capilaridade, devido à formação de um pequeno menisco de água na superfície, formando um filme líquido entre a ponta e a amostra. Portanto, para que a ponta ultrapasse essa camada de água, é necessário romper a barreira da tensão superficial. Em meio líquido, não existe essa

barreira da capilaridade e forças de adesão específicas como as existentes entre biomoléculas complementares podem ser medidas.

O gráfico que se obtém diretamente do AFM é de corrente gerada pela deflexão do *cantilever* versus posição do *piezo - scanner* (figura 4a) e este é então convertido em curva de força versus distância (figura 4b). O primeiro passo para efetuar essa conversão é definir a região de contato para obter-se a real distância ponta - amostra. Para um sistema em que não existem forças de longo alcance entre duas superfícies idealmente rígidas, a curva de deflexão do *cantilever* versus posição do *piezo - scanner* consiste de duas partes lineares (figura 4a): a primeira, onde ainda não há contato, apresenta força nula, se sobrepondo ao eixo x, e portanto, define a deflexão nula do *cantilever*; a segunda parte apresenta um aumento linear da deflexão do *cantilever* após o contato. O ponto de contato, ou de deslocamento nulo do *piezo - scanner* (z_p) é definido pela intersecção entre as duas retas. A inclinação da segunda parte da curva fornece a sensibilidade (relação entre a variação da corrente gerada pela deflexão do *cantilever* e o movimento do *piezo - scanner*). O valor da corrente gerada pela deflexão do *cantilever* dividido pela sensibilidade fornece deslocamento do *cantilever* (z_c) e a distância real ponta - amostra é a soma de $z_c + z_p$. Em amostras reais, a elasticidade e rugosidade do material, assim como a presença de forças de longo alcance entre ponta - amostra tornam mais difícil determinar do regime de contato, e faz-se uma extrapolação das partes lineares das curvas, como nos exemplos das figuras 5b a 5d [Butt *et al.*, 2005].

Tendo a distância ponta - amostra definida, é necessário saber a constante de mola do *cantilever* para obter o valor da força, através da lei de Hooke (equação 5).

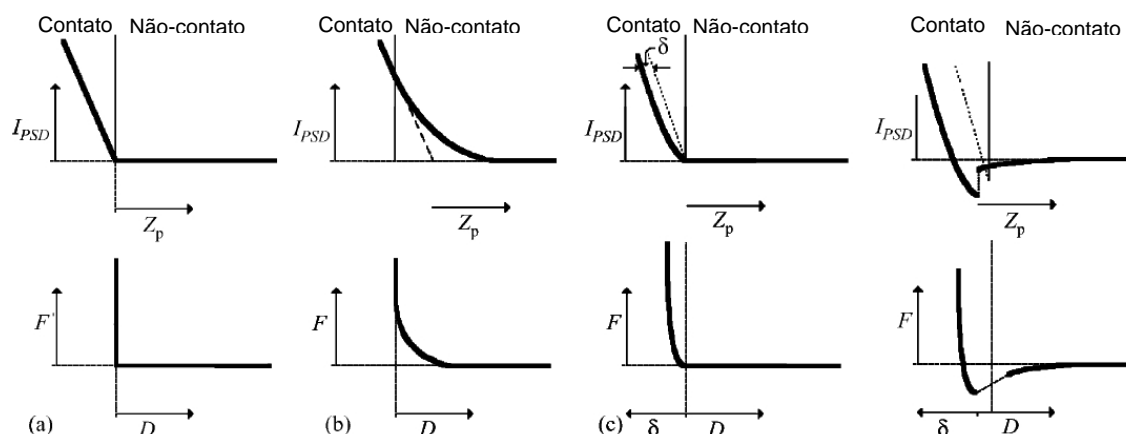


Figura 5 – Conversão das curvas obtidas diretamente do AFM em curvas de força: a) ausência de forças de longo alcance entre duas superfícies idealmente rígidas; b) presença de forças repulsivas de longo alcance entre duas superfícies idealmente rígidas; c) ausência de forças de longo alcance entre duas superfícies deformáveis e d) presença de forças atrativas e adesivas entre duas superfícies deformáveis. Modificado a partir de Butt *et al.*, 2005.

Os experimentos relacionados às medidas de forças foram realizados no “Max Planck Institut für Polymerforschung”, MPI-P, em Mainz, Alemanha, sob orientação do Dr. Michael Kappl e do Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt. A técnica empregada (“*Colloidal Probe*”) consiste na utilização de partículas coloidais de interesse grudadas na extremidade de *cantilevers* no lugar da ponta de nitreto de silício. Essa técnica permite uma análise quantitativa das forças de interação mais precisa, uma vez que a partícula tem um raio maior e melhor definido do que as pontas de AFM, gerando forças de interação maiores e, portanto, mais sensíveis a eventos que podem ocorrer no meio, como a formação ou ruptura de ligações entre a partícula e a amostra.

As partículas híbridas PMMA/CMC e PS/CH foram coladas com cola epóxi (UHU plus) na extremidade de *cantilevers* de nitreto de silício sem ponta (Veeco NP-OW), como mostra a figura 6, com a ajuda de um micromanipulador (MMO 203, Narishige Co. Tóquio, Japão) e de um microscópio óptico (Leica AxioTech).

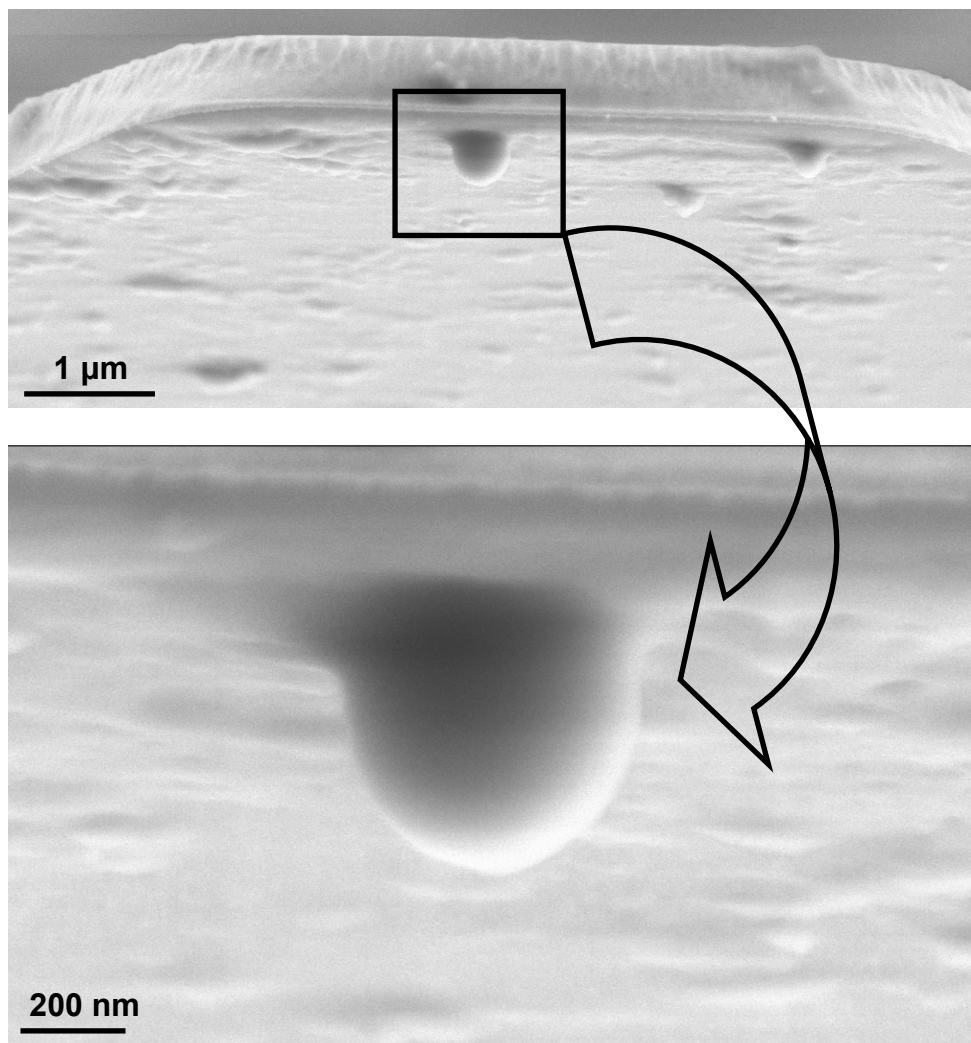


Figura 6 – Micrografias eletrônicas de varredura de uma partícula PS/CH grudada na extremidade de um *cantilever*.

A constante de mola de cada *cantilever* foi determinada utilizando o método de ruído térmico [Hutter & Bechhoefer, 1993], com o equipamento Molecular Force Probe (MFP-1D, Asylum Research, Santa Barbara, CA). Este método considera o *cantilever* como um oscilador harmônico, que possui uma deflexão (ΔZ_c) causada pela energia térmica, $k_B T$ (k_B é a constante de Boltzmann). Na prática, primeiramente, obtém-se uma curva de força contra uma superfície dura, geralmente uma placa de vidro. Faz-se então o ajuste linear da parte da curva que determina o contato, para caracterizar a sensibilidade, e então se obtém um espectro do ruído da deflexão. Esse espectro mostra o pico na frequência de ressonância do *cantilever*, que corresponde ao primeiro modo de vibração. Ajusta-se então uma função Lorentziana ao

espectro e integra-se a área sob o pico, resultando na deflexão média do *cantilever* (ΔZ_c), e finalmente calcula-se a constante de mola do *cantilever* (k_c) a partir da equação (6):

$$k_c = k_B T / \Delta Z_c \quad (6)$$

Os *cantilevers* com as partículas híbridas foram montados numa cela de fluidos com capacidade de 50 μL , acoplada ao AFM Multimode Nanoscope IIIa com o acessório PicoForce para obtenção de curvas de força em líquido.

Curvas de deflexão do *cantilever* versus posição do *scanner* foram obtidas através do programa do fabricante a uma frequência de varredura (direção z) de 1 Hz. Essas curvas foram convertidas em curvas de força versus distância utilizando programa que utiliza linguagem *Lab View* desenvolvido pelo Dr. Michael Kappl, no MPI-P (Force Curve Analysis, v 1.031)

A força de adesão é o valor medido no ponto de máxima deflexão do *cantilever* durante o afastamento em relação à superfície. Os valores médios de distâncias e forças de adesão foram calculados a partir de pelo menos 300 curvas de força realizadas com 5 partículas distintas.

Medidas de forças de adesão entre partículas PMMA/CMC e lâminas de Si/SiO₂, filmes de Con A sobre Si e filmes de Con A sobre filmes de CMC foram realizadas em solução de MnCl₂ 0,01 mol/L e CaCl₂ 0,01 mol/L e pH aproximadamente 6,5, na presença ou não de manose. Curvas de forças entre partículas PS/CH e lâminas de Si/SiO₂ foram realizadas em água (pH = 6,5) e em solução de NaCl 0,01 mol/L (pH = 6,5). Partículas PS/CH com hexoquinase adsorvida na superfície (PS/CH - HK) também foram utilizadas contra superfície de Si/SiO₂ em tampão tris-HCl (pH 7,5) ou em soluções 25 mmol/L de manose, glicose ou frutose em tampão tris-HCl.

6 - Resultados e Discussão

6.1 – Adsorção de TXG e HXG sobre superfícies de Si modificado com grupos amina

As xiloglucanas TXG e HXG adsorveram a partir de soluções aquosas (pH 3,5) sobre as superfícies aminadas. As camadas de TXG e HXG adsorvidas apresentam espessura e rugosidade parecidas, da ordem de 1nm, indicando que em condições de equilíbrio, nem a fonte vegetal nem a estrutura fina de cada xiloglucana influencia no processo de adsorção. As camadas de XGs obtidas por evaporação da água da solução apresentaram espessuras bem maiores do que as formadas por adsorção em equilíbrio, como mostram os valores de espessura média obtidos por elipsometria (d) e rugosidade média determinada a partir das imagens de AFM ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) com o programa PicoScan 5.3.2 (rms) na tabela 1.

Tabela 1: Características dos filmes de XG formados sobre superfícies aminadas. Ângulo de contato para água (θ_A), espessura média (d) e rugosidade média a partir de imagens de AFM $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (rms).

Polissacarídeo	Método	θ_A (°)	d (nm)	rms (nm)
HXG	Adsorção	46 ± 3	$1,3 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
TXG	Adsorção	50 ± 2	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
HXG	Evaporação	58 ± 5	8 ± 1	$1,8 \pm 0,1$
TXG	Evaporação	60 ± 5	$6,3 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,3$

As camadas de XGs obtidas por adsorção apresentam pequenos agregados e algumas fibras de comprimento na faixa de 110 a 360 nm, como mostra a figura 7a. Estruturas semelhantes foram observadas para TXG sobre mica [Morris, 2004]. As espessuras das fibras medidas pela secção transversal da figura 7b, de aproximadamente 3,0 nm, provavelmente são

resultado de várias cadeias de XG empacotadas umas sobre as outras. Os experimentos realizados com as placas após 24 horas em água mostraram que não houve desorção.

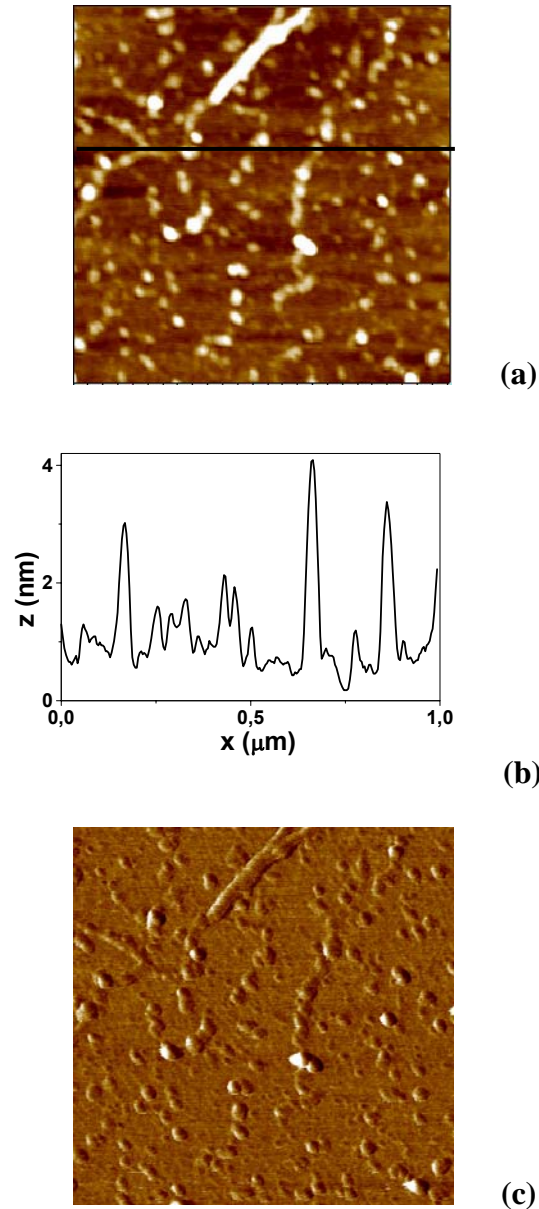


Figura 7 - Imagens de AFM $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ de HXG adsorvida em condições de equilíbrio sobre superfícies aminadas: (a) topografia, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de fase.

As camadas de HXG e TXG obtidas por evaporação do solvente apresentam morfologias semelhantes, evidenciadas pelas figuras 8a e 8d. Os agregados e fibras estão novamente presentes, mas em dimensões maiores. Ao contrário do observado nas camadas de

XG obtidas por adsorção, as camadas formadas por evaporação do solvente desorveram aproximadamente 50%, indicando que havia algumas cadeias de XG que estavam apenas depositadas sobre outras, através de interações muito fracas. Mesmo após a desorção, as espessuras dos filmes de HXG são um pouco maiores do que as de TXG, sugerindo um efeito das massas molares e dos tamanhos de persistência de cada xiloglucana na formação dos filmes (vide seção 4 – Materiais, páginas 32 e 33).

As figuras 8c e 8f são imagens de fase obtidas para HXG e TXG, respectivamente. A principal informação que pode ser obtida através de imagens no modo fase do AFM é a dissipação da oscilação do *cantilever* em cada ponto e contrastes neste modo podem provir de uma diferença de material (dureza, hidrofobicidade, adesão) ou da geometria da superfície. Na maioria dos casos é muito difícil distinguir cada contribuição. Bordas e degraus apresentam contrastes nas imagens de fase, mas pequenas diferenças de altura em superfícies planas não devem contribuir muito [Maganov, 2004].

O contraste observado nas imagens de fase das figuras 8c e 8f pode ser atribuído à topografia da superfície. A presença de agregados e fibras nas camadas de XG em todos os substratos estudados é atribuída à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, comumente observada em polissacarídeos sem carga [Heinze *et al.*, 2005].

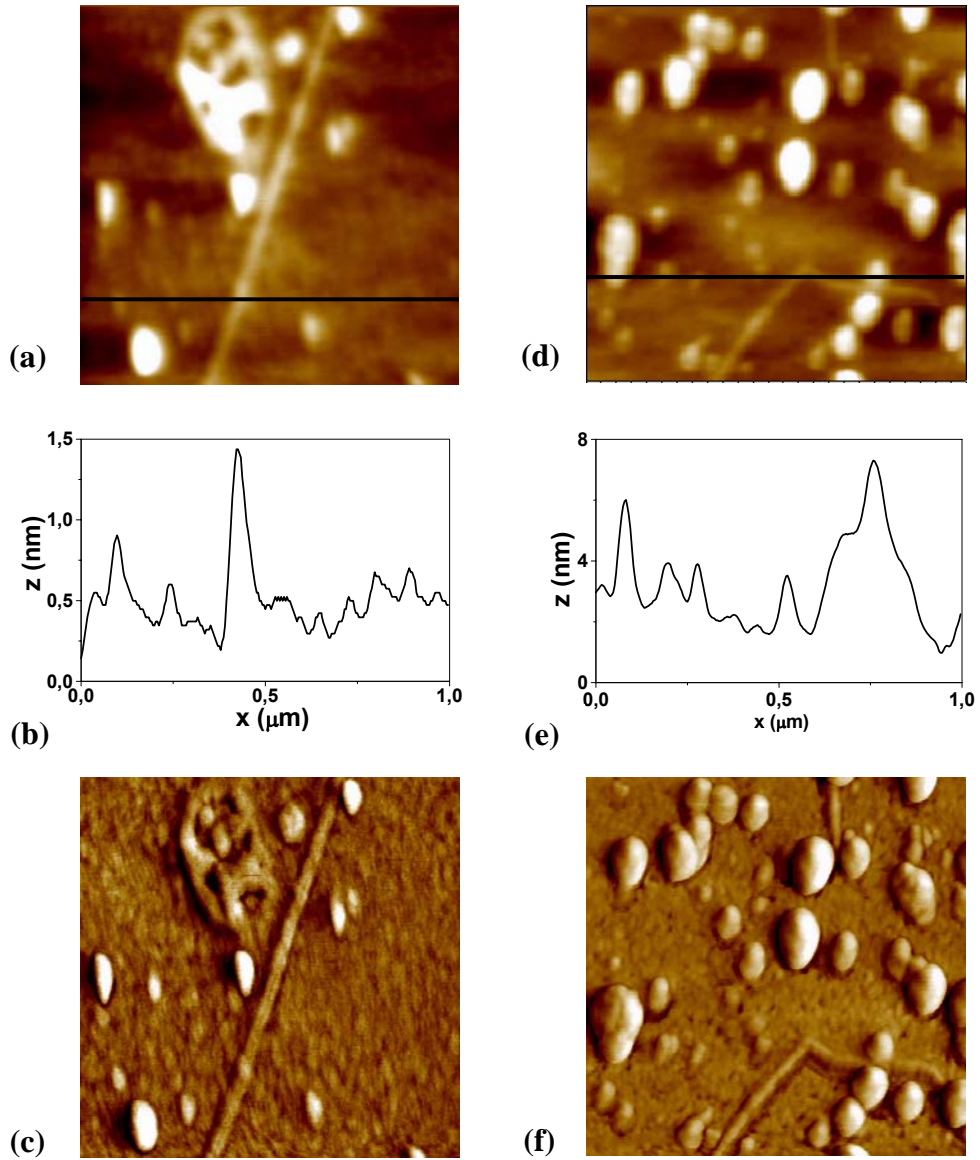


Figura 8 - Imagens de AFM $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$: (a) topografia, (b) a correspondente secção transversal e (c) imagem de fase de HXG depositada sobre superfície aminada; (d) topografia, (e) a correspondente secção transversal e (f) imagem de fase de TXG depositada sobre superfície aminada.

6.2 – Adsorção de TXG e HXG sobre Si/SiO₂

A adsorção de XGs a partir de soluções aquosas em condições de equilíbrio não ocorre sobre superfícies de Si/SiO₂, indicando que esta superfície não atrai as cadeias de XGs da solução, numa faixa de pH de 3 a 7 e de concentração de NaCl de 0,001 a 0,1 mol/L. Nestas condições esses polissacarídeos não possuem cargas e a superfície de Si/SiO₂ é rica em cargas negativas. Se a superfície fosse positivamente carregada, seriam possíveis interações eletrostáticas apenas em meio alcalino, quando os grupos hidroxila das unidades gluco- e xilopiranosose estão desprotonados.

Por outro lado, em condições de não equilíbrio, em que a solução é depositada sobre a superfície e o solvente é lentamente evaporado, observa-se a formação de camadas de XG sobre a superfície do silício. Os grupos SiOH da superfície podem formar interações do tipo ligações de hidrogênio com os grupos OH das cadeias de XG, além de forças de van der Waals que também devem ser consideradas.

As características dos polissacarídeos e dos filmes de XGs formados sobre Si/SiO₂ por evaporação do solvente estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Características dos filmes adsorvidos sobre Si/SiO₂; espessura média obtida por elipsometria (d) e rugosidade média determinada a partir das imagens de AFM (1 x 1 μm²) com o programa PicoScan 5.3.2 (rms).

Polissacarídeo	d (nm)	rms (nm)
HXG	3,8 ± 0,9	0,5 ± 0,1
TXG	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,1

As camadas de HXG possuem espessuras médias de $(3,8 \pm 0,9)$ nm, aproximadamente 50% maior do que a de TXG, de $(2,4 \pm 0,4)$ nm. Esta diferença pode se dar pelo fato de HXG possuir massa molar média maior do que TXG. As rugosidades médias (rms) determinadas a partir das imagens de AFM nas figuras 9a e 9d, de HXG e TXG são $(0,5 \pm 0,1)$ nm e $(1,9 \pm 0,1)$ nm, respectivamente. Após 24 horas imersas em água, as placas foram novamente caracterizadas por elipsometria e AFM, e como não foi observada nenhuma mudança significativa, a adsorção de XG sobre Si/SiO₂ foi considerada um processo irreversível.

Comparando esses dados com os da tabela 1, nota-se que a adsorção de TXG e HXG é mais pronunciada nas superfícies de silício após a modificação com grupos amina. Por outro lado, se considerarmos a dessorção de 50% da espessura dos filmes de HXG e TXG formados por evaporação sobre silício modificado, as espessuras são praticamente as mesmas do que as dos filmes formados sobre silício. HXG adsorve mais do que TXG, sobre as duas superfícies estudadas. Estes resultados mostram que as diferenças na fonte vegetal e na estrutura fina de cada XG influenciam na espessura e morfologia de seus filmes finos. Os oligômeros XXXXG presentes na HXG favorecem as interações com a superfície, assim como observado para interação entre XG-celulose [Lima e Buckeridge, 2001].

As imagens de AFM nas figuras 9a e 9d mostram que as camadas de HXG e de TXG têm a topografia bem rugosa, mas a superfície de HXG (figura 6a) é mais lisa, evidenciada pelas secções transversais (figuras 8b e 8e) e pelos valores de rms na tabela 2. Apenas a HXG possui oligômeros XXXXG (4 xilose (X) e 1 glicose (G)) em sua estrutura, o que leva a um maior tamanho de persistência [Buckeridge *et al.*, 1997, Freitas *et al.*, 2005]. A presença desses oligômeros pode favorecer as interações entre as cadeias de XG e a superfície de Si/SiO₂, dando origem a camadas mais espessas e lisas. Como as imagens de fase nas figuras 8c e 8f apresentam baixo contraste, as superfícies de silício devem estar completamente recobertas com ambas xiloglucanas.

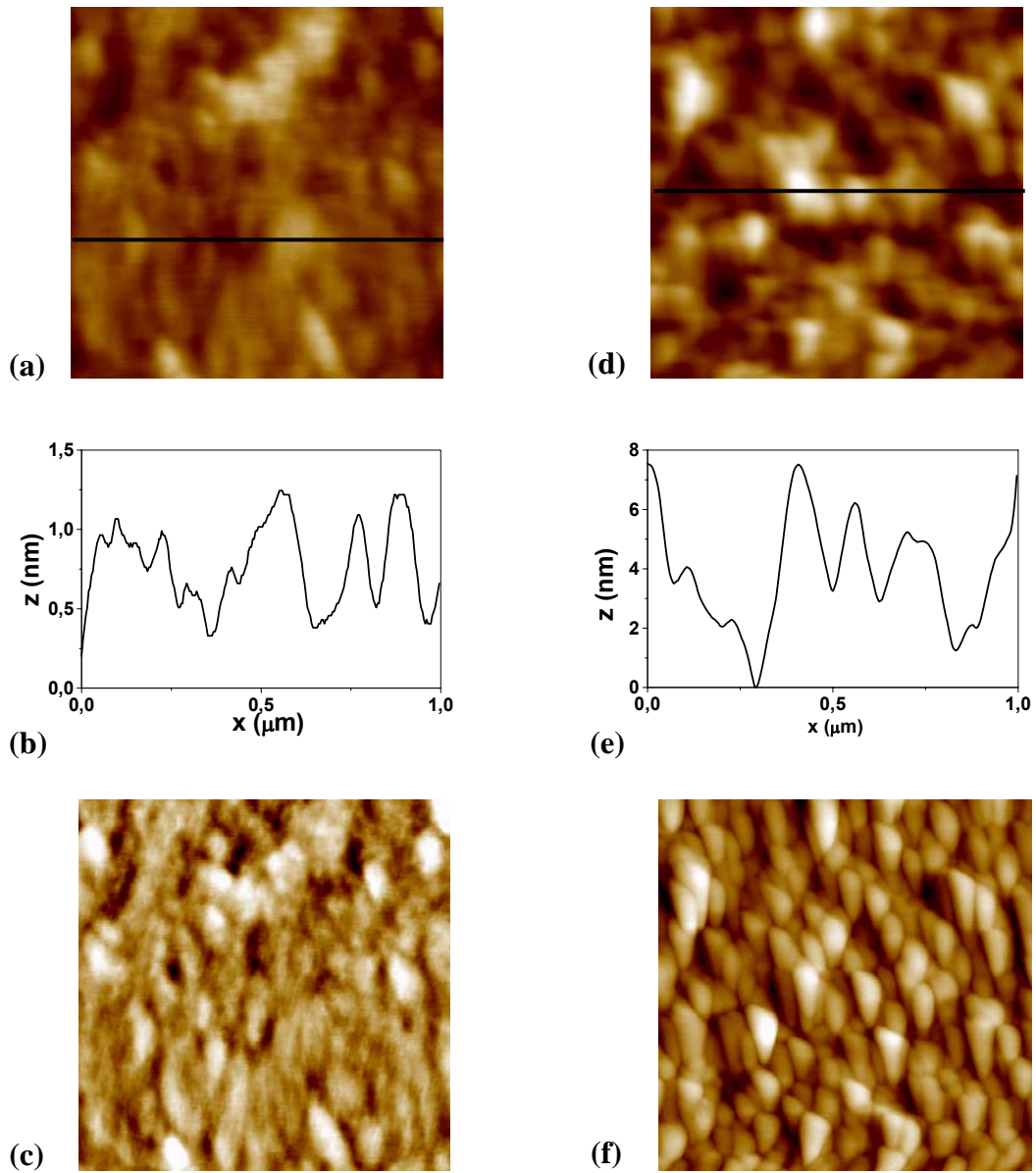


Figura 9 - Imagens de AFM $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$: (a) topografia, (b) a correspondente secção transversal e (c) imagem de fase de HXG sobre Si/SiO₂; (d) topografia, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de fase de TXG sobre Si/SiO₂.

6.3 – Adsorção de Con A sobre superfícies sólidas planas

As superfícies planas escolhidas como substrato para adsorção de Con A foram filmes finos de CMC, de PMMA, de TXG, de HXG e lâminas de Si/SiO₂.

A obtenção de filmes de CMC sobre superfícies aminadas já foi estudada detalhadamente pelo grupo [Fujimoto & Petri, 2001; Fujimoto *et al.*, 2002], mostrando que a adsorção é favorecida para valores baixos de força iônica e em meio ácido. A concentração ótima de NaCl determinada foi de 1 mmol/L, com pH entre 3 e 4, resultados estes que estão de acordo com o regime de redução de adsorção por blindagem de cargas ("screening-reduced adsorption") proposto por Van de Steeg e colaboradores [Van de Steeg *et al.*, 1992]. Neste modelo, os íons provenientes da dissociação do sal que foi adicionado para manter a força iônica do meio blindam não só as cargas dos segmentos do polieletrólito, diminuindo as repulsões intra e intermoleculares, mas também as interações entre o substrato e os segmentos das cadeias, reduzindo assim a quantidade de material adsorvido [Van de Steeg *et al.*, 1992, Fujimoto & Petri, 2001].

A carboximetilcelulose possui alguns grupos hidroxila substituídos por grupos carboxilato, tendo comportamento de polieletrólito negativamente carregado em pH > 3, portanto são formados filmes a partir das interações eletrostáticas entre os grupos carboxilato do polieletrólito e os grupos amina da superfície. A adsorção é descrita inicialmente por um processo de transporte de massa puramente difusivo, seguida de uma etapa mais lenta, em que ocorre um rearranjo das primeiras cadeias de CMC adsorvidas, diminuindo o impedimento estérico e a repulsão eletrostática entre as cadeias, facilitando a adsorção de mais CMC da solução [Fujimoto & Petri, 2001].

Utilizando os parâmetros descritos na parte experimental, foram obtidos filmes de CMC de aproximadamente $(2,2 \pm 0,5)$ nm de espessura medidas por elipsometria e

hidrofilicos, com ângulo de contato médio de $(52 \pm 2)^\circ$ para água. A imagem de AFM na figura 10, obtida para filmes de CMC no ar, mostra o recobrimento total da superfície de silício modificado com grupos amina por espécies globulares. Estes mesmos glóbulos também foram observados em meio líquido (Pancera, 2005, dados não publicados). Este tipo de morfologia indica que durante o processo de adsorção, algumas porções das cadeias de CMC assumem uma conformação enrolada (“*loops*”).

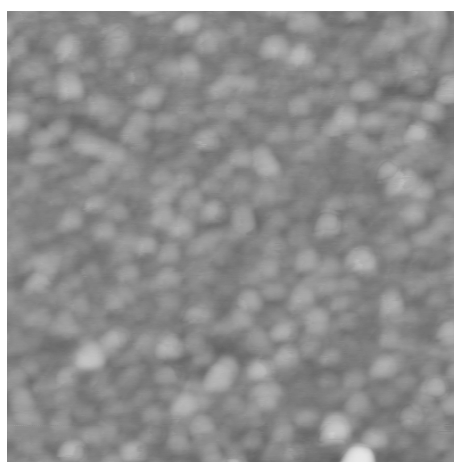


Figura 10 – Topografia do filme de CMC adsorvido sobre superfície de silício modificado com grupos amina. Imagem $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, com escala $Z = 10 \text{ nm}$ e rms de $0,9 \text{ nm}$.

A morfologia de filmes poliméricos obtidos por revestimento rotacional é determinada pela energia de interação polímero-substrato e solvente-substrato [Silberberg, 1968]. Filmes lisos e homogêneos são formados quando as interações polímero-substrato são mais favoráveis do que as interações solvente-substrato, ou quando não há interação preferencial [Petri, 2002].

Os filmes de PMMA obtidos por revestimento rotacional a partir de solução 10g/L em tolueno apresentam espessura de $(50 \pm 4) \text{ nm}$, com a superfície extremamente lisa e homogênea, como mostra a imagem de AFM na figura 11. Medidas de ângulo de contato para

água mostraram relativa hidrofobicidade, com $\theta_A = (65 \pm 3)^\circ$, por isso esses filmes foram escolhidos como substrato para adsorção não específica de Con A, e servem de comparação com outra superfície modelo, as lâminas de Si/SiO₂ não modificadas, que também são lisas (rms = 0,1 nm) e homogêneas, mas são bem mais hidrofílicas ($\theta_A < 5^\circ$).

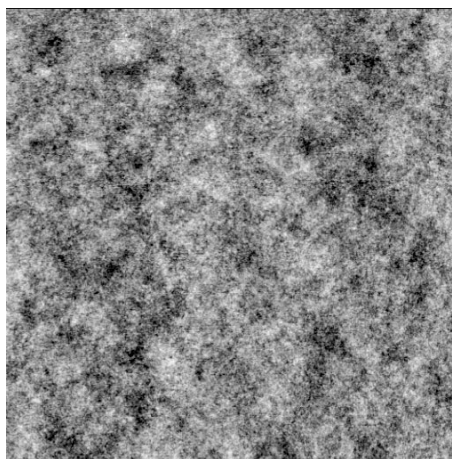


Figura 11 – Topografia do filme de PMMA sobre Si/SiO₂. Imagem de 5 μm x 5 μm , com escala Z = 5 nm e rms de 0,3nm.

A seguir serão apresentadas as isotermas de adsorção de Con A sobre cada um dos substratos apresentados.

A isoterma de adsorção de Con A sobre filmes finos de CMC é apresentada na figura 12a. A quantidade de material adsorvido Γ , obtida a partir das medidas elipsométricas da espessura da camada de Con A adsorvida (equação 2, página 37), aumenta linearmente com a concentração de Con A até atingir um patamar de $(4,9 \pm 0,5) \text{ mg/m}^2$, que corresponde a uma concentração inicial de Con A de $3,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. A espessura do filme de Con A no patamar é de $(4,5 \pm 0,5) \text{ nm}$, que corresponde ao tamanho de um monômero desta lectina [Reeke *et al.*, 1975].

O grau de cobertura, Θ , foi calculado dividindo o valor da quantidade de material adsorvido Γ em cada ponto pelo valor de Γ do patamar. A dependência de Θ com a concentração de Con A (figura 12b) foi descrita pelo modelo da isoterma de adsorção de Langmuir (7):

$$\Theta = \frac{K_{ads} \cdot C_{ConA}}{(1 + K_{ads} \cdot C_{ConA})} \quad (7)$$

onde $C_{Con A}$ é a concentração de Con A na solução e K_{ads} é a constante de adsorção, que é diretamente proporcional à afinidade entre adsorbato e substrato. O valor de K_{ads} obtido foi de $(2.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ L/mol}$.

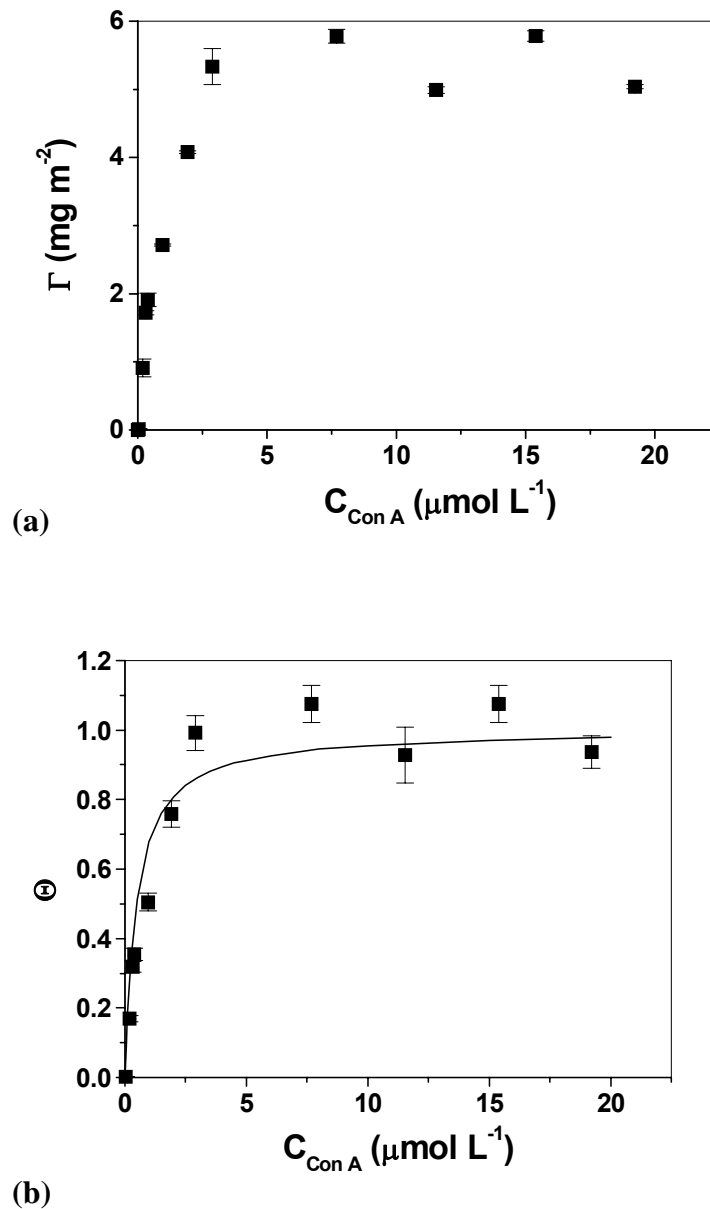


Figura 12 - a) Isoterma de adsorção de Con A sobre filmes de CMC ($t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$) e b) Grau de cobertura da superfície ajustado segundo o modelo de Langmuir.

Smith e colaboradores [Smith *et al.*, 2003] obtiveram um valor de K_{ads} de $(5.6 \pm 1.7) \times 10^6$ L/mol para Con A sobre filmes finos de manose, utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície, SPR, indicando que a afinidade de Con A por resíduos de glicose é comparável àquela observada por manose. Estudos espectroscópicos [Revell *et al.*, 1998] mostram que o reconhecimento molecular de Con A por resíduos de manose e glicose se dá

pela presença de grupos hidroxila, OH, ligados aos carbonos das posições 3, 4 e 6 do anel glicosídico, formando o chamado “*cluster effect*” [Loris *et al.*, 1998]. As cadeias de CMC possuem OH ligados aos carbonos 2 e 3, enquanto o C6 é substituído por um grupo carboxilato. Nos filmes de CMC, muitos dos grupos carboxilatos estão orientados para a superfície aminada do APS, mas alguns podem estar expostos para a solução, podendo interagir eletrostaticamente com os resíduos de aminoácidos positivamente carregados das moléculas de Con A. Além disso, o chamado “*cluster effect*” pode se dar através do grupo OH ligado ao C3, contribuindo para o processo de adsorção.

As isotermas de adsorção de Con A sobre Si/SiO₂, PMMA, TXG e HXG estão representadas nas figuras 13a a 13d, respectivamente. Os filmes de HXG e TXG escolhidos como substrato para imobilização de Con A foram aqueles adsorvidos sobre silício modificado com grupos amina (APS), por serem os mais estáveis. A quantidade de Con A adsorvida sobre qualquer um destes substratos, Γ , é menor do que aquela observada sobre os filmes de CMC. Além disso, os substratos não foram recobertos completamente, portanto nenhum ajuste foi feito nessas isotermas. Sobre as lâminas de Si/SiO₂ Γ aumenta continuamente com a concentração de Con A até atingir um máximo de $(2,5 \pm 0,2)$ mg/m² e sobre PMMA Γ atinge um máximo de $(1,7 \pm 0,2)$ mg/m², para 5,0 μ mol/L de Con A. As isotermas de adsorção de Con A nos filmes de HXG e TXG não apresentam diferenças significativas. Γ aumenta linearmente com a concentração de Con A até atingir um máximo de $(3,3 \pm 0,3)$ mg/m², o que corresponde a espessura de $(2,4 \pm 0,3)$ nm. Assim como sobre superfícies de Si/SiO₂ e de PMMA, a espessura média da camada de Con A adsorvida é menor do que o tamanho da molécula de Con A (4,2 x 4,0 x 3,9 nm) [Reeke *et al.*, 1975], indicando que a cobertura dessas superfícies não foi completa.

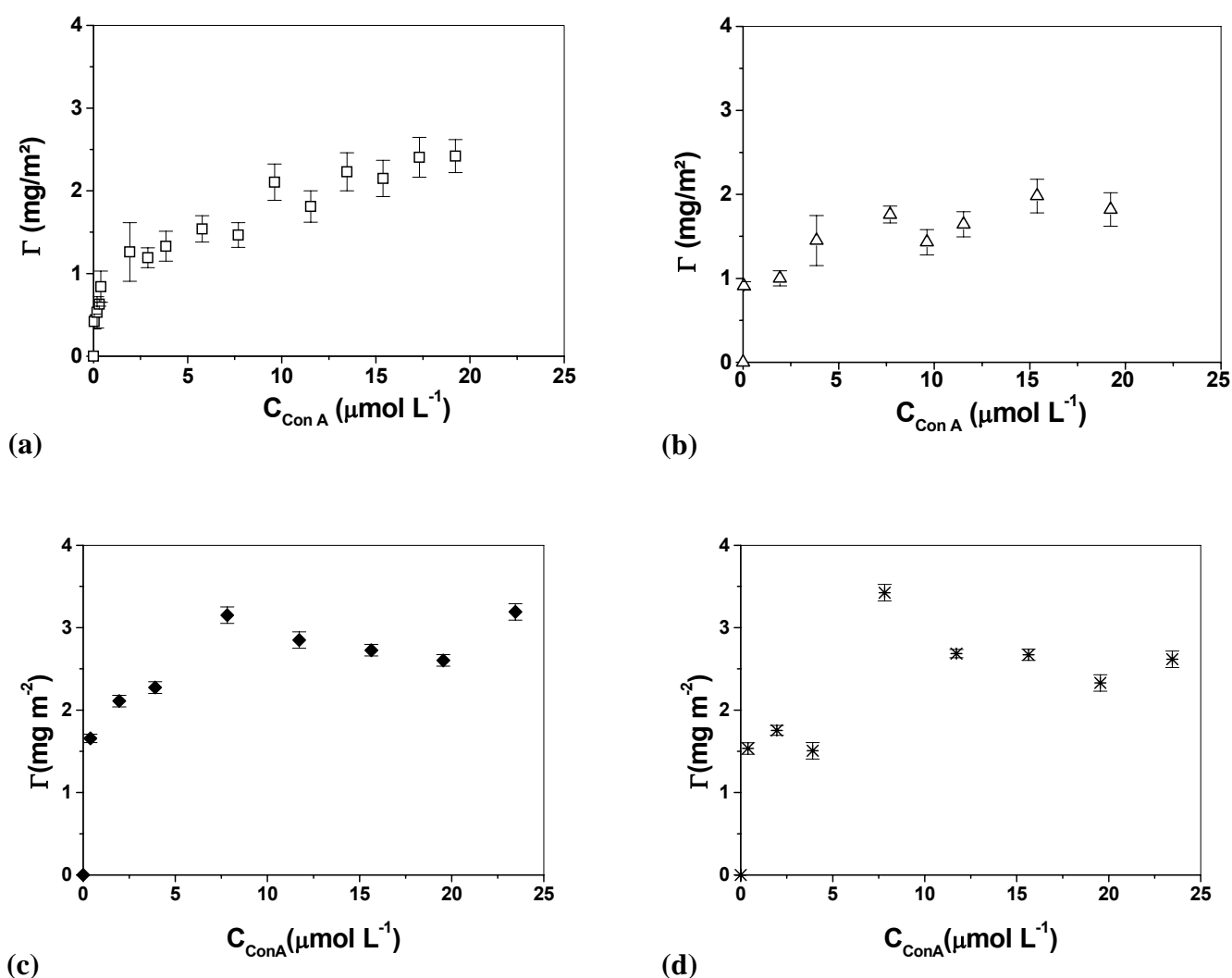


Figura 13 - Isotermas de adsorção de Con A sobre diferentes substratos ($t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$): a) Si/SiO_2 (\square); b) filmes de PMMA (Δ); c) filmes de TXG adsorvidos sobre superfície aminada (\blacklozenge); d) filmes de HXG adsorvidos sobre superfície aminada (*).

A quantidade de Con A adsorvida sobre filmes de PMMA (figura 13b) foi a menor de todas, o que era esperado, por ser uma superfície que não apresenta nenhum grupo OH para interação específica, nem cargas na superfície, que favoreceriam as interações eletrostáticas, apenas os átomos de oxigênio dos grupos carbonila das cadeias de PMMA, que podem formar ligações de hidrogênio com diversos resíduos de aminoácidos da proteína. Apesar de

existirem grupos OH na superfície de Si/SiO₂ em pH 4,5, a interação entre moléculas de Con A e grupos hidroxila em geral é mais fraca do que a interação de Con A com grupos OH ligados ao anel glicosídico, como no caso da CMC (figura 12a, página 60), de acordo com o chamado “*cluster effect*”, no qual tanto o número de resíduos de açúcar como as respectivas proximidades conferem uma melhor afinidade pelas moléculas de Con A.

Nos filmes de TXG e HXG, as ramificações de α -D-xilopiranosose ligadas ao C6 dos resíduos de glicose da cadeia principal podem gerar um impedimento estérico para a Con A se ligar especificamente às hidroxilas da cadeia principal. Como já mencionado, a Con A se liga especificamente a unidades de manose e glicose, que são açúcares epímeros, ou seja, diferem apenas na configuração de um carbono quiral, neste caso o C2. Já a xilose é uma pentose, no lugar do grupo CH₂OH ligado ao C5 existe apenas um átomo de hidrogênio, portanto interações específicas entre as cadeias de Con A e as ramificações das cadeias de TXG e HXG não são esperadas.

Além desses fatores, interações eletrostáticas têm uma grande contribuição para adsorção de proteínas em geral, por serem macromoléculas complexas, que apresentam muitos resíduos de aminoácidos carregados. A quantidade de cargas negativas disponíveis na superfície dos filmes de CMC deve ser maior do que na superfície de Si/SiO₂ favorecendo maior interação eletrostática com as moléculas de Con A, enquanto as cadeias de XGs não apresentam cargas em suas estruturas para interagir com as moléculas de Con A, resultando em menor adsorção da lectina.

A tabela 3 mostra as características das superfícies após a adsorção de Con A 10,0 μ mol/L. O aumento no ângulo de contato de avanço na superfície de Si/SiO₂ e dos filmes de CMC, HXG e TXG indica que essas superfícies se tornaram mais hidrofóbicas. Provavelmente ocorre uma orientação molecular dos resíduos hidrofóbicos (39% de cada unidade monomérica) da Con A para o ar. A superfície dos filmes de PMMA, ao contrário, se

tornou mais hidrofílica após a adsorção de Con A, indicando que a orientação molecular dos resíduos hidrofóbicos da Con A para o PMMA após adsorção pode ser induzida pelo substrato. Este efeito já foi observado anteriormente para a enzima enolase sobre filmes hidrofóbicos de poliestireno [Almeida e col., 2002]. Os altos valores de histerese indicam que após a adsorção de Con A as superfícies se tornaram mais rugosas, numa escala macroscópica, da ordem do diâmetro da gota de água [Adamson, 1990]. Os valores de rms após a adsorção de Con A não diferem significativamente dos iniciais, indicando que não houve aumento de rugosidade, numa escala microscópica.

Tabela 3: Características das camadas de Con A adsorvidas sobre cada substrato a partir de soluções 10 $\mu\text{mol/L}$. Espessura (d), ângulos de contato de avanço (θ_A), recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) e rugosidade média para imagens de AFM 1 x 1 μm^2 antes (rms_{sup}) e após a adsorção de Con A (rms_{Con A}).

Substrato	d _{Con A} (nm)	θ_A (°)	θ_R (°)	$\Delta\theta$ (°)	rms _{sup} (nm)	rms _{Con A} (nm)
CMC	4,5 ± 0,5	74 ± 3	44 ± 2	30 ± 5	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,3
Si/SiO₂	2,0 ± 0,2	54 ± 3	31 ± 3	23 ± 6	0,10 ± 0,02	0,6 ± 0,1
PMMA	1,3 ± 0,2	58 ± 2	29 ± 2	29 ± 4	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2
TXG	2,7 ± 0,2	56 ± 3	24 ± 1	32 ± 4	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
HXG	2,4 ± 0,3	58 ± 2	22 ± 2	36 ± 4	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2

As figuras 14a a 14f apresentam imagens topográficas das superfícies de Con A adsorvida sobre Si/SiO₂, filmes de CMC, de PMMA, de TXG depositada em condições de não equilíbrio sobre superfície aminada, HXG depositada sobre superfície aminada e TXG adsorvida sobre superfície aminada respectivamente. Em todos os casos a Con A foi adsorvida em equilíbrio, a partir de uma solução 10,0 $\mu\text{mol/L}$ por 3 horas. Todas as imagens

apresentam agregados globulares empacotados na superfície, que podem ter se formado durante a secagem da superfície com jatos de N₂, favorecendo as interações laterais entre as moléculas de proteína [Ortega-Vinuesa e col., 1998, Almeida e col., 2002].

O filme de Con A sobre CMC (figura 14a) é formado por glóbulos bem empacotados que parecem recobrir o substrato completamente. As imagens das figuras 14b e 14c mostram que as entidades de Con A sobre Si/SiO₂ e sobre PMMA são menores do que as observadas sobre filme de CMC e tanto a superfície de Si/SiO₂ como a de PMMA não foi completamente recoberta com Con A. Nas figuras 14d e 14e, além dos agregados globulares de Con A observa-se ainda as fibras e agregados de XG, indicando que as moléculas de Con A adsorveram predominantemente nas regiões da superfície onde não havia as fibras do polissacarídeo. Fibras e agregados de XG são formados por fortes interações intermoleculares, portanto o número de grupos OH livres para interagir com moléculas de Con A é diminuído nessas regiões da superfície. Já no caso em que as moléculas da lectina foram adsorvidas sobre filmes de XG previamente formados por adsorção sobre superfície aminada (figura 14f) as moléculas de Con A parecem adsorver de forma mais homogênea, como observado também na figura 14a, para Con A sobre CMC.

A imobilização de Con A foi mais pronunciada sobre filmes de CMC, formando uma camada de $(4,5 \pm 0,5)$ nm. A CMC possui além dos anéis glicosídicos que interagem especificamente com lectinas grupos carboxilatos, favorecendo interações eletrostáticas com os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da Con A. As ramificações de xilose presentes nos filmes de TXG e HXG não interagem especificamente com a Con A e ainda podem dificultar o acesso da lectina aos anéis glicosídicos da cadeia principal. Ainda assim ocorre adsorção e as camadas de Con A formadas sobre essas superfícies podem ser estudadas para o reconhecimento e detecção de carboidratos para desenvolvimento de diagnósticos de doenças, justamente por terem preservado o sítio de adsorção específica da lectina.

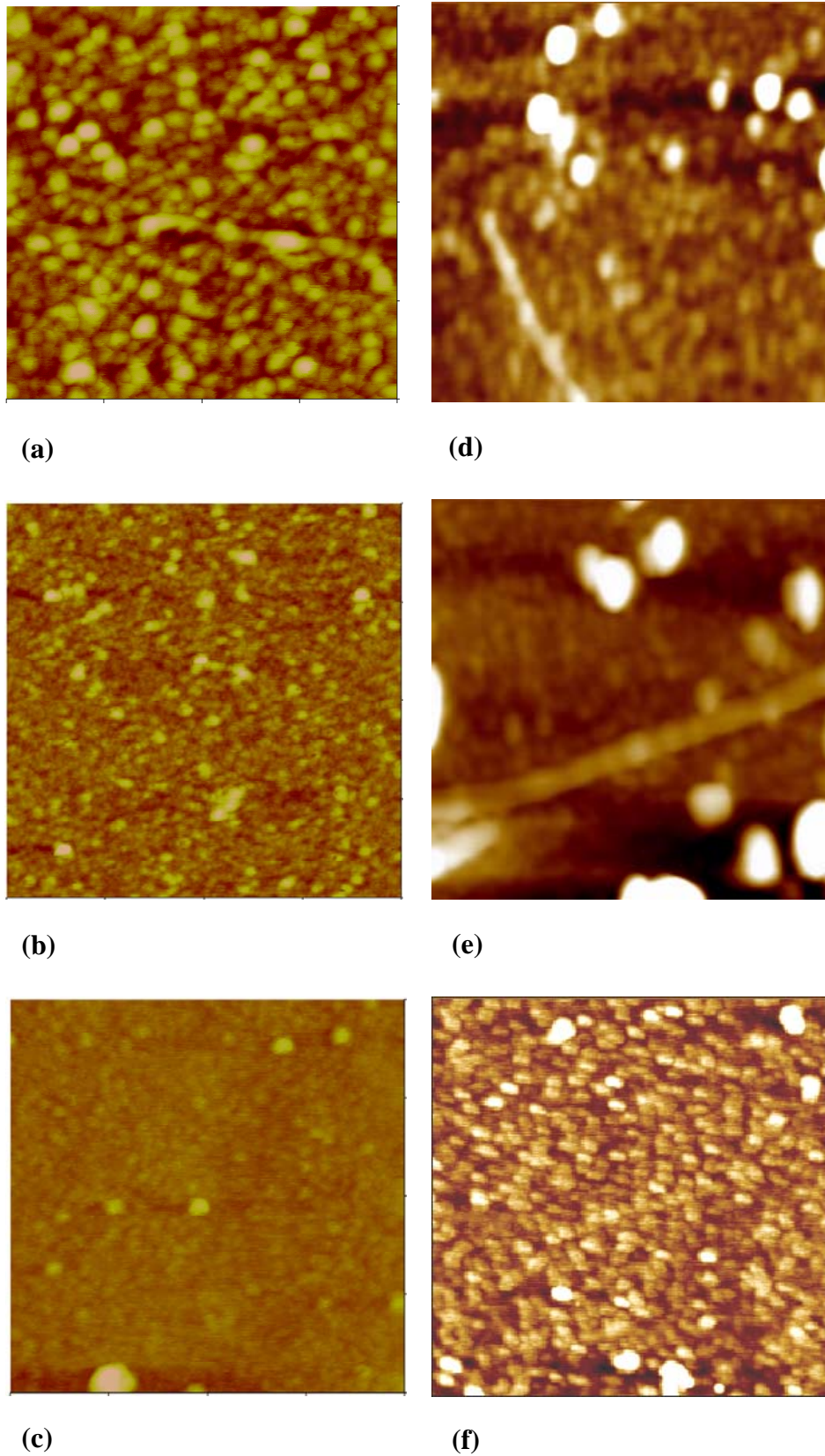


Figura 14 – Imagens topográficas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ de camadas de Con A adsorvidas sobre diferentes substratos. (a) CMC, (b) Si/SiO₂, (c) PMMA, (d) TXG depositada por evaporação (e) HXG depositada por evaporação e (f) TXG adsorvida em equilíbrio.

6.4 – Adsorção de Con A sobre partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos

Partículas poliméricas de PMMA decoradas com CMC foram utilizadas como substratos para adsorção de Con A. A polimerização em emulsão de metacrilato de metila utilizando complexos CTAB/CMC já foi estudada pelo grupo [Castro e col., 2004]. Utilizando as condições reacionais descritas na parte experimental, as partículas híbridas obtidas chamadas de PMMA/CMC possuem diâmetro médio de (300 ± 50) nm, índice de polidispersidade de $0,08 \pm 0,01$ (obtidos por espalhamento de luz) e potencial $\zeta = -(52 \pm 2)$ mV. Esse valor de potencial zeta evidencia a presença dos grupos carboxilato das cadeias de CMC na superfície das partículas, uma vez que o surfactante utilizado é catiônico. A imagem de microscopia eletrônica de varredura representada na figura 15 [Castro e col., 2004] apresenta as partículas secas com diâmetro na faixa de 200 a 400 nm e com a superfície rugosa, o que não é comumente observado para partículas obtidas por polimerização em emulsão convencional, sendo, portanto mais uma evidência da presença das cadeias de CMC na superfície dessas partículas. O teor de sólidos e a densidade numérica de partículas são 150 g/L e 2×10^{15} partículas/L.

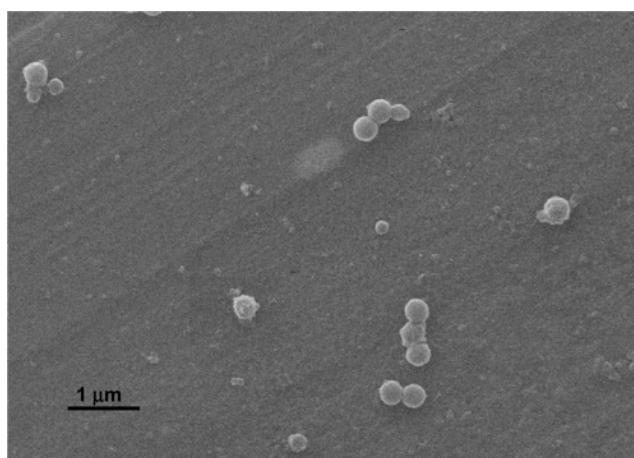


Figura 15 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas secas de PMMA/CMC.

A isoterma de adsorção sobre as partículas híbridas de PMMA/CMC na figura 16a mostra que a quantidade de material adsorvido, Q , aumenta com a concentração de Con A até atingir um patamar de $(1,33 \pm 0,02) \mu\text{mol}_{\text{Con A}}/\text{g}_{\text{Pol}}$, na concentração de $11,5 \mu\text{mol/L}$ de Con A. O grau de cobertura, Θ , foi calculado dividindo o valor da quantidade de material adsorvido Q em cada ponto pelo valor de Q do patamar. A dependência de Θ com a concentração de Con A (figura 16b) não se ajustou ao modelo de Langmuir (equação 7, página 59), sendo descrita pelo modelo da isoterma de adsorção de Frumkin (8):

$$C_{\text{ConA}} = \frac{1}{K_{\text{ads}}} \frac{\Theta}{(1-\Theta)} e^{-2\alpha\Theta} \quad (8)$$

onde $C_{\text{Con A}}$ é a concentração de Con A na solução, K_{ads} é a constante de adsorção e α é o parâmetro de interação de Frumkin, que indica interações laterais entre as moléculas adsorvidas [Smith *et al.*, 2003]. Valores positivos de α indicam interações atrativas e valores negativos indicam interações repulsivas.

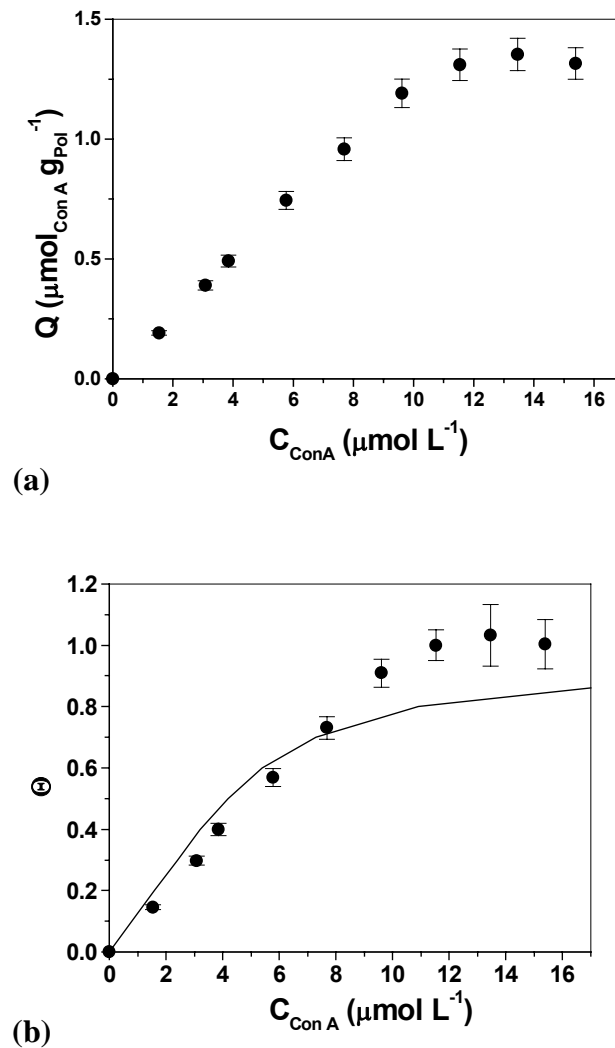


Figura 16 - a) Isoterma de adsorção de Con A sobre partículas de PMMA/CMC ($t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$) e b) Grau de cobertura da superfície ajustado segundo o modelo de Frumkin.

Com o ajuste dos dados da figura 16b na equação (8) os valores de α e de K_{ads} foram de +0,70 e $(1,2 \pm 0,2) \times 10^5$ L/mol, respectivamente. Os valores de Θ até 0,80 foram bem ajustados ao modelo de Frumkin, para graus de cobertura acima deste valor o ajuste sofreu um desvio negativo em relação aos dados experimentais. O parâmetro de Frumkin obtido indica interações laterais atrativas entre as moléculas de Con A. Interações laterais atrativas são esperadas entre moléculas de proteína, uma vez que estas possuem segmentos hidrofóbicos, hidrofílicos e não carregados. O valor de K_{ads} nas partículas PMMA/CMC é uma ordem de

grandeza menor do que K_{ads} nos filmes de CMC. A conformação das cadeias de CMC nas partículas PMMA/CMC certamente é diferente da conformação das cadeias nos filmes, o que pode tornar os resíduos de glicose menos disponíveis para as moléculas de Con A. Além disso, as cargas negativas da CMC na superfície das partículas devem estar menos disponíveis do que nos filmes, proporcionando menor interação eletrostática com as moléculas de Con A.

Existem muitos trabalhos na literatura que reportam diferentes valores de K_{ads} para Con A em diversas superfícies de partículas funcionalizadas. Yoshizumi e colaboradores [Yoshizumi *et al.*, 1999] encontraram valores de K_{ads} de $2,7 \times 10^5$ L/mol e $7,1 \times 10^5$ L/mol para Con A em poli(2-metacrilóiloxietil D-glucopiranoside) e em 2-metacrilóiloxietil D-glucopiranoside, respectivamente. Estes valores estão bem próximos aos encontrados para Con A sobre PMMA/CMC. Esses resultados mostram que a natureza e a geometria do substrato podem influenciar no arranjo dos resíduos de glicose da CMC na superfície, afetando na adsorção da Con A sobre superfícies recobertas por resíduos de açúcares.

Con A é muito utilizada em testes de aglutinação com antígenos para o reconhecimento de diversas doenças. A imobilização de proteínas em partículas poliméricas comuns geralmente leva a uma perda de estabilidade coloidal do sistema, inviabilizando o uso em testes de aglutinação. Partículas híbridas PMMA/CMC com a superfície recoberta de moléculas de Con A apresentam alta estabilidade e, portanto, potencial uso em diagnósticos.

6.5 - Forças de adesão entre partículas PMMA/CMC e Con A

Medidas de força obtidas através do AFM, utilizando *cantilevers* com as partículas PMMA/CMC coladas na extremidade e superfícies de Con A podem fornecer informações mais precisas a respeito das forças de adesão entre as partículas PMMA/CMC e a lectina Con A. As curvas de força obtidas utilizando partículas coloidais podem ainda revelar detalhes sobre a superfície da partícula, que são de suma importância para o entendimento da estabilização de dispersões coloidais. Fazendo uma busca na literatura e em artigos de revisão, não foram encontrados dados publicados sobre a utilização de partículas tão pequenas quanto essas, da ordem de 300 nm [Butt *et al.*, 2005 e Ralston *et al.*, 2005].

A Figura 17a mostra uma curva de força versus distância obtida para a partícula PMMA/CMC colada no *cantilever* contra superfície de Con A adsorvida sobre Si/SiO₂, em solução MnCl₂ 0,01 mol/L e CaCl₂ 0,01 mol/L (esquema representado na figura 17b). Após tocar a superfície, a curva de aproximação (em azul) apresenta diferentes inclinações, indicando que a partícula toca primeiro uma superfície macia e depois o substrato duro. A distância correspondente à camada macia é de aproximadamente (20 ± 10) nm e pode ser atribuída à camada altamente hidratada de CMC envolta da partícula. Esses resultados corroboram com a alta estabilidade coloidal observada para essas partículas [Castro *et al.*, 2004]. A curva de afastamento (em preto), apresenta uma forte adesão, que deve ocorrer em diferentes pontos devido à presença de “dentes” na curva. A força média de adesão de (-11 ± 7) nN, e a distâncias média de (100 ± 40) nm são bem maiores do que as forças de adesão entre pontas de AFM recobertas com Con A e manose, que foram medidas na faixa de 75 a 200 pN [Gad *et al.*, 1997], evidenciando a existência de adesões múltiplas entre a Con A e os segmentos da CMC.

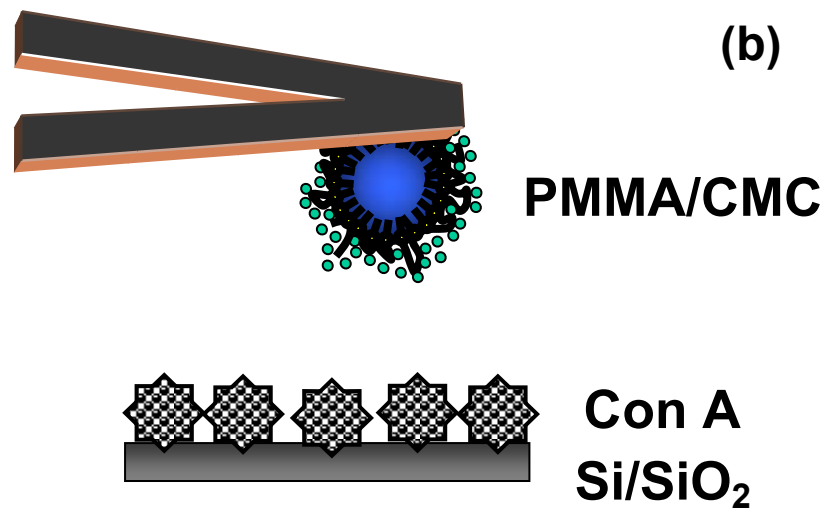
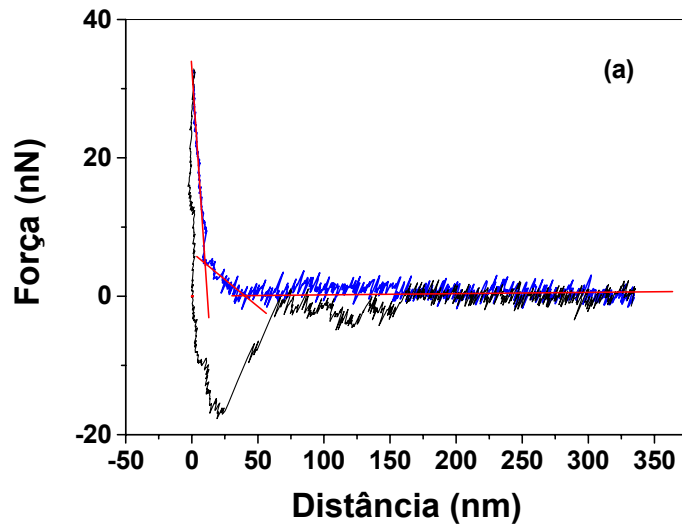


Figura 17 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre Si/SiO₂. b) Representação esquemática do sistema estudado, os elementos estão fora de escala.

Curvas de força versus distância obtidas para partículas PMMA/CMC contra superfície de Con A adsorvida sobre filmes de CMC (gráfico na figura 18a e esquema na figura 18b) apresentam o mesmo perfil do sistema acima descrito, em que a Con A estava adsorvida diretamente sobre Si/SiO₂. A camada macia de (18 ± 10) nm foi observada na curva de aproximação, mas as distâncias e forças de adesão foram bem menores, (37 ± 18) nm e (-3 ± 1) nN, respectivamente, como mostra o gráfico da figura 18a. Uma adesão mais fraca entre a partícula e a superfície indica que as moléculas de Con A imobilizadas em filmes CMC estão menos disponíveis para interagir com a CMC da superfície da partícula do que quando a Con A está imobilizada no Si/SiO₂. A adsorção de Con A sobre Si/SiO₂ ocorre por interações não específicas, como ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas, enquanto que nos filmes de CMC, além dessas forças, podem ocorrer ainda interações específicas com os resíduos de glicose das cadeias de CMC, como já discutido nas páginas 60 a 63.

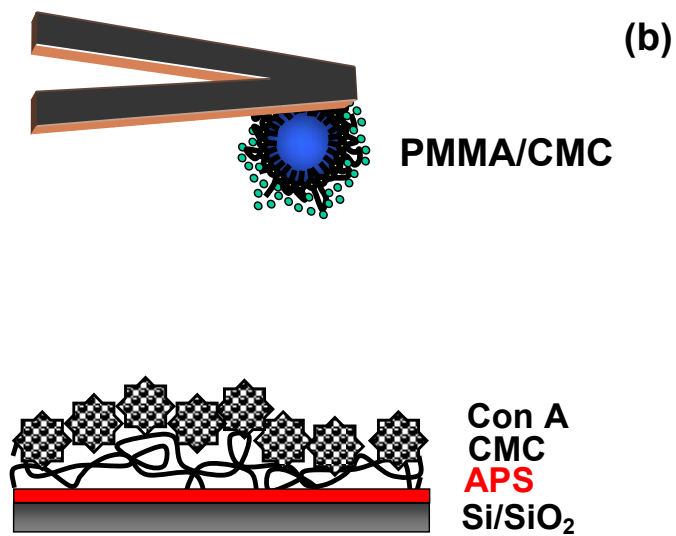
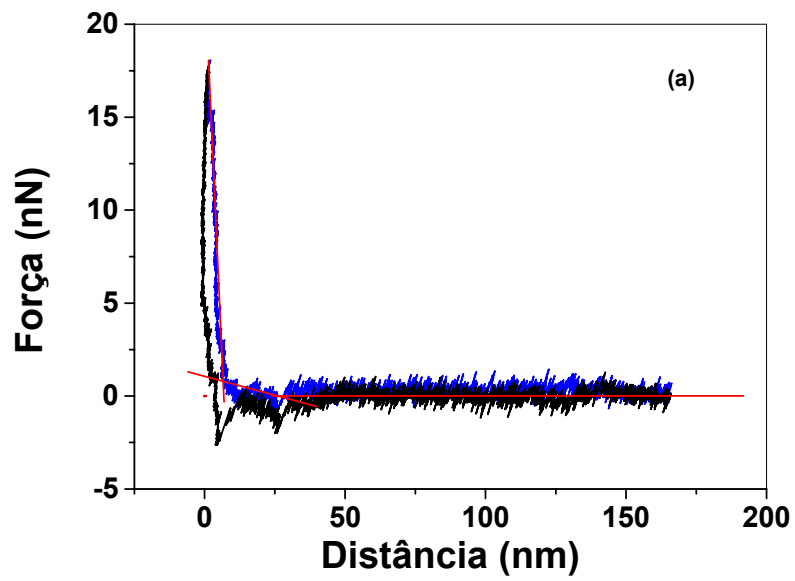


Figura 18 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre filmes de CMC. b) Representação esquemática do sistema estudado, os elementos estão fora de escala.

Como experimento controle, foram obtidas curvas de força para partículas PMMA/CMC diretamente contra superfícies de Si/SiO₂. Mais uma vez, a camada macia e aproximadamente 20 nm foi observada, confirmando que a camada é da partícula PMMA/CMC, e não da superfície. As pequenas distâncias e as forças de adesão observadas no gráfico da figura 19a, de (6 ± 4) nm e (-3 ± 1) nN, respectivamente, são indicativas de fracas interações entre CMC da partícula e a superfície de Si/SiO₂ (esquema na figura 19b).

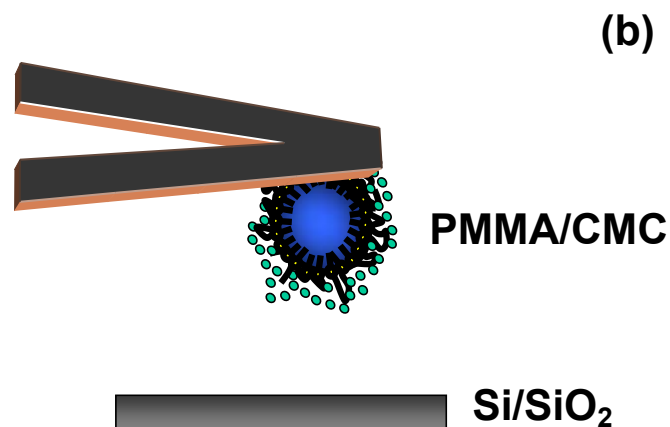
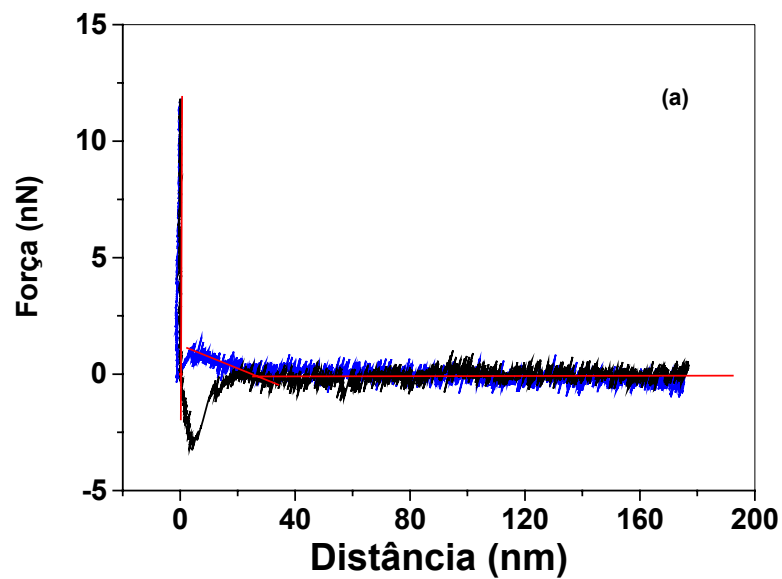


Figura 19 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Si/SiO₂. b) Representação esquemática do sistema estudado, os elementos estão fora de escala.

Uma vez que a Con A é uma lectina manose-específica, investigamos o efeito da presença de manose na adesão entre partículas PMMA/CMC e superfícies de Con A. Foi escolhido o sistema em que as moléculas de Con A são adsorvidas diretamente sobre Si/SiO₂, por apresentar os maiores valores de força (-11 ± 7 nN) e distância (100 ± 40 nm), e portanto, possíveis alterações seriam mais perceptíveis. Como mostra o gráfico na figura 20a, a força e a distância de adesão foram reduzidas drasticamente a (-3 ± 1) nN e (20 ± 10) nm, respectivamente, após a adição de manose (esquema na figura 20b). Duas hipóteses foram formuladas para explicar esse efeito da manose no meio. A primeira considera uma possível dessorção das moléculas de Con A da superfície de Si/SiO₂. Neste caso, seriam formados complexos Con A/manose livres em solução e a partícula PMMA/CMC estaria interagindo diretamente com a superfície de Si/SiO₂. A segunda hipótese seria a adsorção de manose sobre a superfície de Con A, portanto, a partícula PMMA/CMC estaria tocando uma camada de manose, que também levaria a forças de adesão mais fracas.

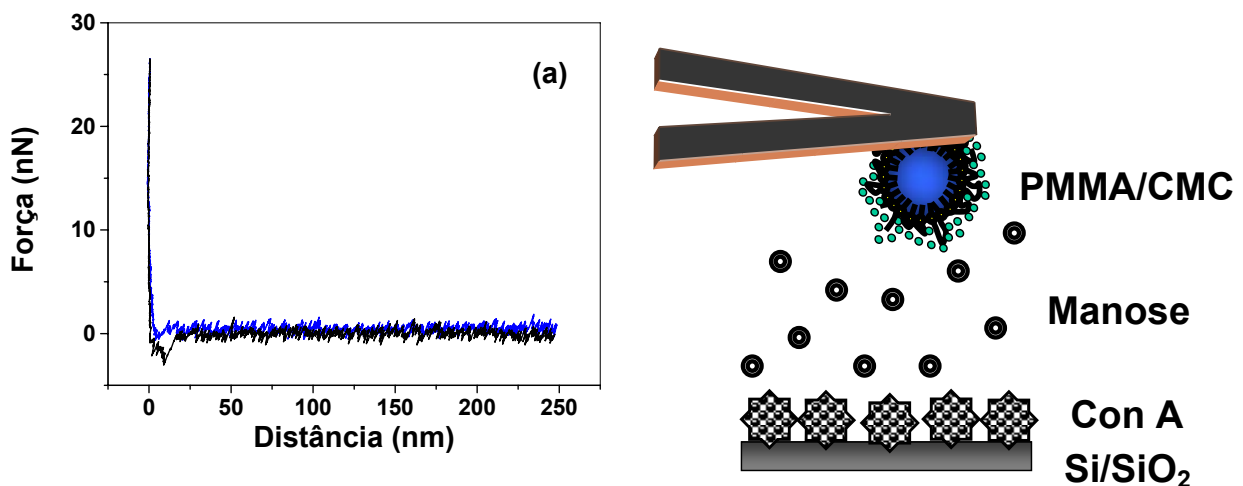


Figura 20 – a) Curva de força obtida para a partícula PMMA/CMC e superfície de Con A adsorvida sobre Si/SiO₂, na presença de manose 5 mmol/L. b) Representação esquemática do sistema estudado, os elementos estão fora de escala.

A primeira hipótese foi verificada por elipsometria. Variações nos ângulos elipsométricos Δ e Ψ decorrem de aumento ou diminuição da espessura da última camada da superfície, resultantes de adsorção ou dessorção de moléculas da superfície. O gráfico na figura 21 mostra uma diminuição de Δ e um aumento de Ψ em função do tempo até 4 horas, evidenciando a adsorção de Con A ($0,04 \mu\text{mol/L}$) sobre Si/SiO₂ na presença de MnCl₂ $0,01 \text{ mol/L}$ e CaCl₂ $0,01 \text{ mol/L}$. Solução de manose foi então adicionada à cela do elipsômetro, na concentração final igual à usada nos experimentos de força de adesão, $5,0 \text{ mmol/L}$. Logo após a adição ocorre um aumento em Δ e Ψ , devido a oscilações de concentração no seio da solução, mas depois os valores de Δ e Ψ voltam aos valores anteriores à adição de manose. Após 2 horas foi realizada mais uma adição de manose, de modo que a concentração final chegou a 14 mmol/L . O mesmo efeito foi observado, aumento de Δ e Ψ , mas depois de aproximadamente 15 minutos os valores voltam aos iniciais. Esses resultados indicam que não ocorre dessorção das moléculas de Con A da superfície de Si/SiO₂ na presença de manose.

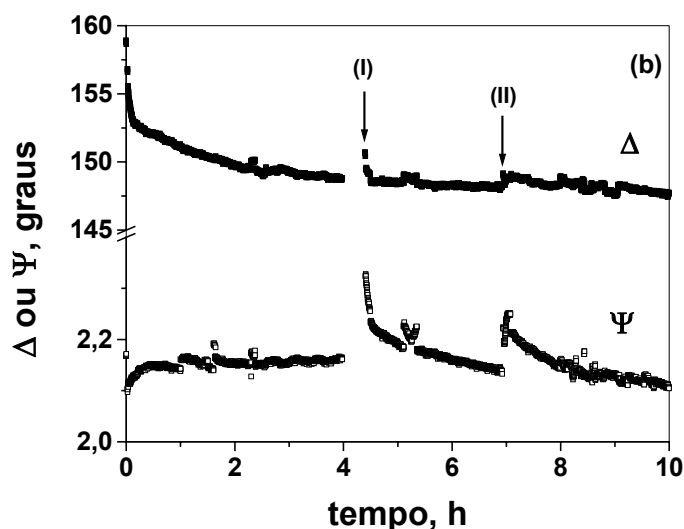


Figura 21 - Δ e ψ em função do tempo para adsorção de Con A sobre Si/SiO₂ até 4h. Em (I) manose foi adicionada a concentração final de 5mmol/L e em (II) segunda adição de manose, até concentração final de 14mmol/L .

Para checar se a dessorção de Con A não ocorreu somente porque havia moléculas de Con A livres em solução para interagir com a manose, foi realizada previamente a adsorção de Con A sobre Si/SiO₂, obtendo-se uma camada de (1,5 ± 0,1) nm de Con A adsorvida. A placa de Si/SiO₂ com a camada de Con A foi colocada na cela elipsométrica com solução de manose 14 mmol/L na presença de MnCl₂ 0,01 mol/L e CaCl₂ 0,01 mol/L. A pequena variação nos valores de Δ e Ψ após 3 horas não evidenciam dessorção de Con A da superfície (figura 22). A espessura da camada de Con A após 3 horas de imersão na solução de manose foi de (1,4 ± 0,1) nm. Além disso, uma alíquota da solução foi retirada da cela e foi medida a absorvância em 280 nm. A absorvância nula confirmou que não houve dessorção de Con A, mostrando que as camadas de Con A sobre Si/SiO₂ são muito estáveis, ao contrário das multicamadas de Con A/glicogênio sobre lâminas de quartzo, estudadas por Sato e colaboradores [Sato *et al.*, 2004 e 2005], que mostraram dessorção de 80% e 50% na presença de manose 20 mmol/L e glicose 20 mmol/L, respectivamente.

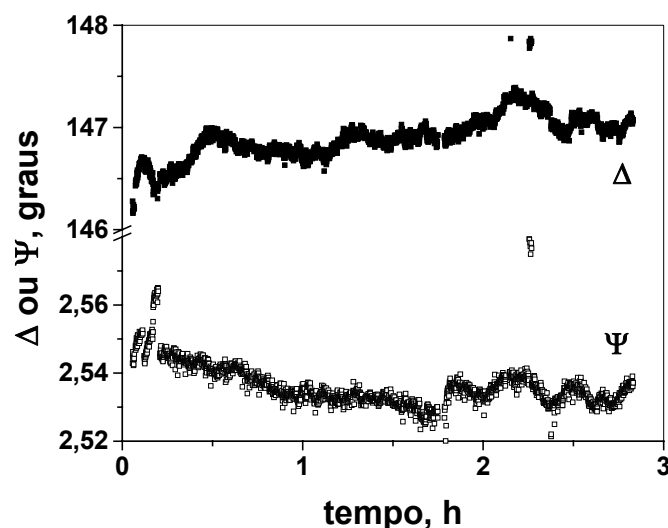


Figura 22 - Δ e ψ em função do tempo para placas Con A previamente adsorvida sobre Si/SiO₂ em solução de manose 14 mmol/L.

Estudar a segunda hipótese, de adsorção da manose sobre camada de Con A é um pouco mais complicado utilizando técnicas de análise convencionais, devido à baixa concentração do açúcar no meio. Foi realizada uma tentativa de detectar a diminuição na concentração de manose na solução após 1 hora em contato com a placa de Si/SiO₂ com uma camada de Con A adsorvida por eletroforese capilar. Primeiramente foi feita uma curva de calibração para manose na concentração de 0,5 a 5,0 mmol/L, e uma placa de Con A sobre Si/SiO₂ foi imersa em 100 µL de uma solução de manose 5,0 mmol/L. Após 1 hora a solução foi analisada por eletroforese capilar e nenhuma variação em relação à concentração inicial foi observada, provavelmente por ser uma variação menor do que o limite de detecção.

Apesar de a segunda hipótese não ter sido provada por elipsometria nem por eletroforese capilar, a adsorção da manose sobre camada de Con A é uma explicação plausível para a diminuição da força de adesão. A formação de complexos manose/Con A já é bem estabelecida [Naismith & Field, 1996; Loris *et al.*, 1998; Sharon & Lis, 2004] e as forças de interação entre a CMC da partícula e os complexos Con A/manose formados na superfície devem ser fracas.

6.6 - Adsorção de HK sobre partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos

Além das partículas PMMA/CMC já apresentadas, foram utilizadas como substratos para adsorção HK partículas de poliestireno decoradas com CH. A polimerização em emulsão de estireno foi realizada nos complexos SDS/CH, gerando partículas PS/CH com diâmetro médio de (480 ± 40) nm, polidispersidade de $(0,11 \pm 0,03)$ e potencial zeta, $\zeta = - (18 \pm 2)$ mV. Este potencial zeta indica que as cargas dos grupos sulfato, provenientes do iniciador radicalar e do surfatante foram parcialmente blindadas pelas cargas positivas da quitosana. Geralmente, partículas de PS sintetizadas em SDS apresentam $\zeta = - (60 \pm 5)$ mV. O teor de

sólidos obtido foi de 41 g/L, e a densidade numérica de partículas calculada foi $N_p = 6,6 \times 10^{14}$ partículas/L. As partículas híbridas PS/CH permaneceram estáveis na presença de NaCl 0,3 mol/L e 2,0 mol/L NaCl por 8 meses e 1 mês, respectivamente. Essa alta estabilidade coloidal pode ser atribuída à superfície altamente hidratada de quitosana, que impede a agregação das partículas, promovendo uma estabilidade hidro-eleto-estérica [Castro, 2004 e 2006].

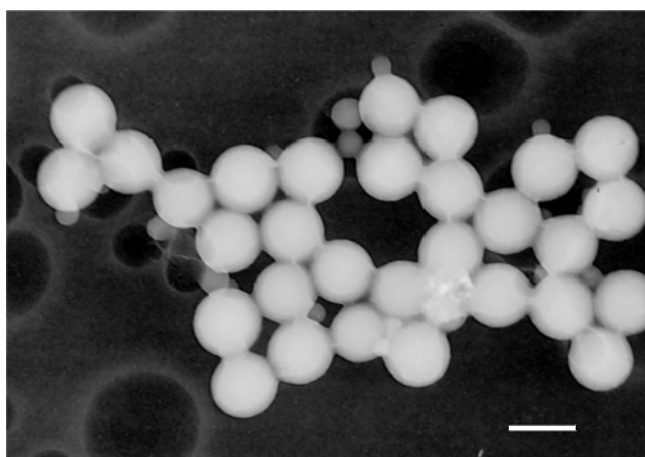


Figura 23 – Micrografia eletrônica de transmissão de partículas secas de PS/CH. A barra corresponde a 500 nm.

A isoterma de adsorção de HK sobre partículas híbridas PS/CH está representada na Figura 24a. Esta isoterma pode ser dividida em três regiões diferentes: (i) um aumento inicial de quantidade de HK adsorvida em função do aumento da concentração inicial de HK, $[HK]_{in}$; (ii) um patamar de adsorção em $[HK]_{ads} = (0,18 \pm 0,02)$ g/L HK para 0,40 g/L de $[HK]_{in}$; (iii) um aumento contínuo na $[HK]_{ads}$ para $[HK]_{in}$ maiores do que 0,70 g/L. A primeira etapa é normalmente observada em regimes bem diluídos de adsorbato. A quantidade de material adsorvido aumenta até a saturação do substrato (segunda etapa). O patamar de adsorção geralmente corresponde à formação de uma monocamada. A terceira região na isoterma mostra um aumento contínuo na concentração de HK adsorvida com o aumento da concentração inicial, indicando a formação de multicamadas. Na Figura 24b está o esquema

que representa as moléculas de HK (em amarelo) adsorvidas sobre as partículas PS/CH. Os círculos azuis representam as moléculas de água de hidratação da partícula recoberta por HK, que será chamada de PS/CH-HK.

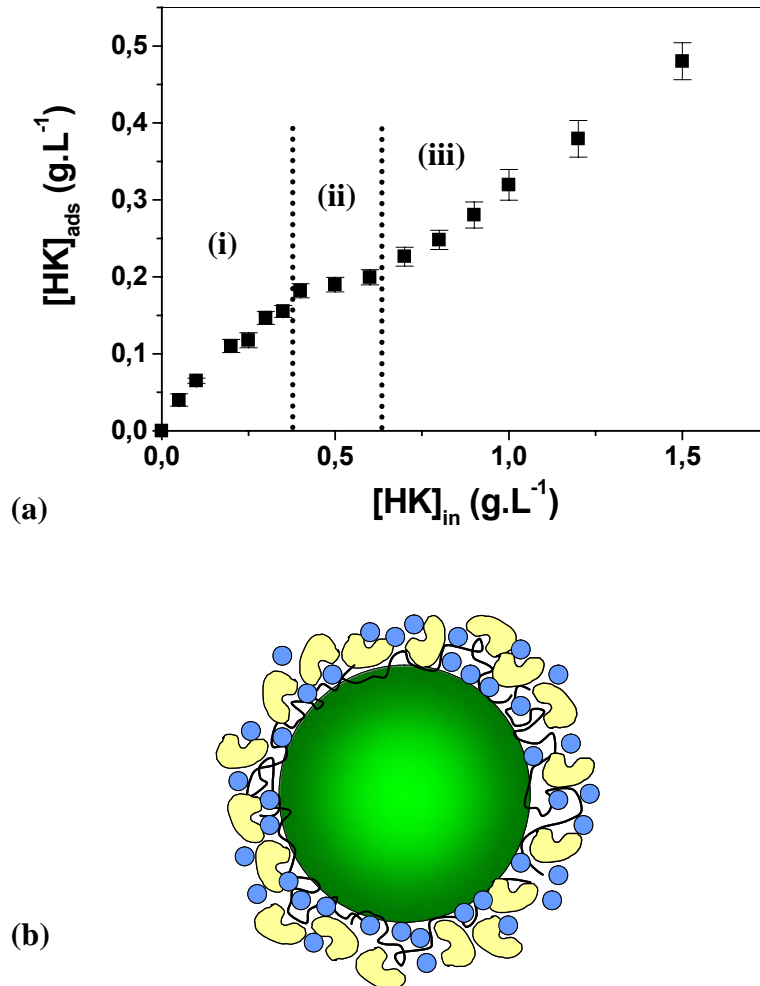


Figura 24 – a) Isoterma de adsorção de HK sobre partículas PS/CH ($t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$) e b) Esquema da partícula PS/CH-HK

Considerando a massa molar do monômero de HK de 52 000 g/mol [Cárdenas e col., 1998] e o número de Avogadro, no patamar ($[\text{HK}]_{\text{ads}} = 0,18 \text{ g/L}$) existem aproximadamente $2,1 \times 10^{18}$ moléculas de HK/L adsorvidas. A densidade numérica de partículas, N_p , usada na adsorção foi $3,3 \times 10^{12}$ partículas/L, portanto no patamar existem aproximadamente $6,4 \times 10^5$ moléculas de HK em cada partícula PS/CH. Considerando o raio médio das partículas PS/CH

e das moléculas de HK como 240 nm e 3,2 nm [Pancera e col., 2004], as áreas superficiais médias das partículas e das moléculas de HK podem ser estimadas em aproximadamente 754 000 nm² e 128 nm², respectivamente, resultando numa razão entre as áreas de aproximadamente 5900. Portanto, a formação de uma monocamda seria esperada para $[HK]_{ads} \sim 0,002$ g/L, bem abaixo da concentração encontrada. É válido ressaltar que a área superficial das partículas pode ter sido subestimada, uma vez que as cadeias de quitosana podem formar uma conformação enrolada, com “*loops*” na superfície, aumentando a área superficial real das partículas PS/CH.

Todos os experimentos foram realizados em pH = 7,4, por ser considerado pH ótimo de atividade da HK, que é acima do seu ponto isoelétrico de 5,0 [www.rcsb.org/pdb PDB ID: HK = 1HKG]. Nessas condições, as moléculas de HK possuem carga líquida negativa, enquanto as moléculas de quitosana não estão carregadas. Portanto o processo de adsorção deve ser dirigido por pontes de hidrogênio entre os grupos NH₂ da quitosana e os grupos OH dos resíduos hidrofílicos das moléculas de HK.

O comportamento da adsorção de HK sobre partículas PMMA/CMC difere daquele observado sobre partículas PS/CH, como mostra a isoterma na figura 25. A quantidade de HK adsorvida aumenta com a concentração inicial até a formação de um patamar de $[HK]_{ads} = (0,40 \pm 0,03)$ g/L HK para 0,70 g/L de $[HK]_{in}$, que geralmente é atribuído a formação de uma monocamada de HK sobre as partículas, mas como discutido acima para as partículas PS/CH, considerando as áreas das partículas e das moléculas de HK, a monocamada deveria se formar em concentrações menores de proteína. Provavelmente na região do patamar observado deve existir multicamadas de HK, devido ao efeito de adsorção cooperativo, comum a algumas proteínas [Almeida e col., 2002]. Experimentos de dessorção mostraram que as moléculas de HK dessorvem aproximadamente 50% das partículas PMMA/CMC e adsorvem irreversivelmente nas partículas PS/CH.

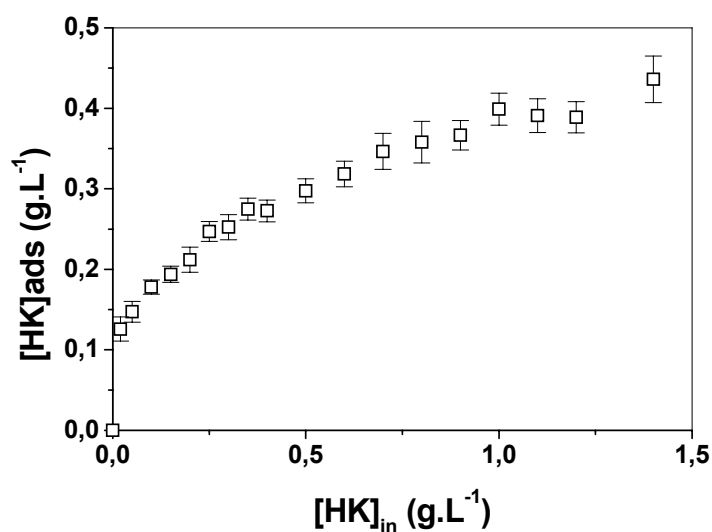


Figura 25 - Isoterma de adsorção de HK sobre partículas PMMA/CMC ($t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$).

6.7 - Medida da atividade enzimática de HK livre e imobilizada

A HK imobilizada sobre partículas PMMA/CMC apresentou perda total de sua atividade enzimática. Existem algumas hipóteses para esse efeito indesejado no processo de imobilização de enzimas. A primeira atribui uma mudança conformacional com perda da estrutura terciária, induzida pela superfície das partículas no processo de adsorção. Com a imobilização moléculas de HK podem ter sofrido mudanças conformacionais, de modo a expor os resíduos de aminoácidos positivamente carregados para a superfície negativamente carregada da partícula, perdendo atividade catalítica. Neste caso, não necessariamente os aminoácidos do sítio ativo precisam estar interagindo com a partícula para comprometer a atividade da enzima, mas qualquer um que impeça a entrada da molécula de glicose na cavidade formada pelo sítio ativo, como por exemplo, o resíduo positivamente carregado Lys173, que está na extremidade do menor domínio e contribui para o movimento em direção ao maior domínio e, conseqüente fechamento da molécula de HK durante a catálise [Kuser e

col., 2000]. Outra hipótese consiste na formação de multicamadas de HK sobre as partículas PMMA/CMC, de forma que a sobreposição das macromoléculas forme um bloqueio para a molécula de glicose entrar no sítio ativo da enzima. A terceira hipótese está no procedimento experimental utilizado para a determinação da atividade da HK, que consiste na medida da formação de NADPH envolvendo uma seqüência de reações enzimáticas altamente específicas. Como existem muitos reagentes no meio, pode ocorrer adsorção de algum deles sobre a superfície das partículas PMMA/CMC, impossibilitando a formação do NADPH, mesmo que moléculas de HK imobilizadas estejam aptas a realizar a função de catalisar a fosforilação da D-glicose.

A atividade catalítica da HK livre e imobilizada sobre as partículas PS/CH foi estudada considerando as três diferentes regiões da isoterma de adsorção (figura 24a, página 81). No primeiro estágio de adsorção, foi escolhida $[HK]_{ads} = 0,07$ g/L. Como controle, mediu-se a atividade de HK livre em solução na mesma concentração. A quantidade de NADPH formado na presença de PS/CH-HK foi 25% da observada para HK livre, após uma hora de reação. No terceiro estágio da isoterma, a concentração escolhida de HK_{ads} e HK livre para verificar a atividade foi 0,34 g/L. Coincidentemente, a quantidade de NADPH formado na presença de PS/CH-HK também foi 25% da observada para HK livre. Ou seja, acima ou abaixo da faixa de concentração de HK correspondente à formação do patamar de adsorção, HK imobilizada conserva apenas 25% da atividade enzimática.

Os resultados mais interessantes foram encontrados para $[HK]_{ads}$ na região do patamar. A concentração de HK adsorvida e livre foi escolhida em 0,17 g/L. A reação de redução de $NADP^+$ foi realizada com as amostras frescas, logo após o preparo de PS/CH-HK e de soluções de HK. Na presença de PS/CH-HK a quantidade de NADPH formado foi aproximadamente 50% da observada para HK livre, nas mesmas condições de reação, como mostra o gráfico na figura 26. Algumas alíquotas de partículas PS/CH-HK e de soluções de

HK livre na concentração de 0,17 g/L, foram preparadas e guardadas por 24h, até serem colocadas para catalisar a reação de redução de NADP^+ , para observar o efeito de estocagem de soluções de HK e de HK imobilizada nas partículas na atividade catalítica da enzima. HK imobilizada nas partículas (PS/CH-HK) permaneceram com a mesma atividade, enquanto HK livre em solução perdeu 50% da atividade. Todos os protocolos recomendam o uso de soluções frescas de HK, uma vez que a perda de atividade com o envelhecimento da solução já é um efeito conhecido. O efeito de estocagem de partículas PS/CH-HK e de soluções de HK livre na concentração de 0,17 g/L foi observado periodicamente por um mês. A atividade enzimática de HK livre em solução é completamente perdida após uma semana (figura 26), enquanto HK imobilizada nas partículas perdeu 50% da atividade inicial após um mês, que é igual a 25% da atividade de HK livre em solução logo após o preparo. Esses resultados mostram que a perda inicial de atividade decorrente da adsorção de HK é compensada pela possibilidade de estocar amostras de PS/CH-HK por um período longo.

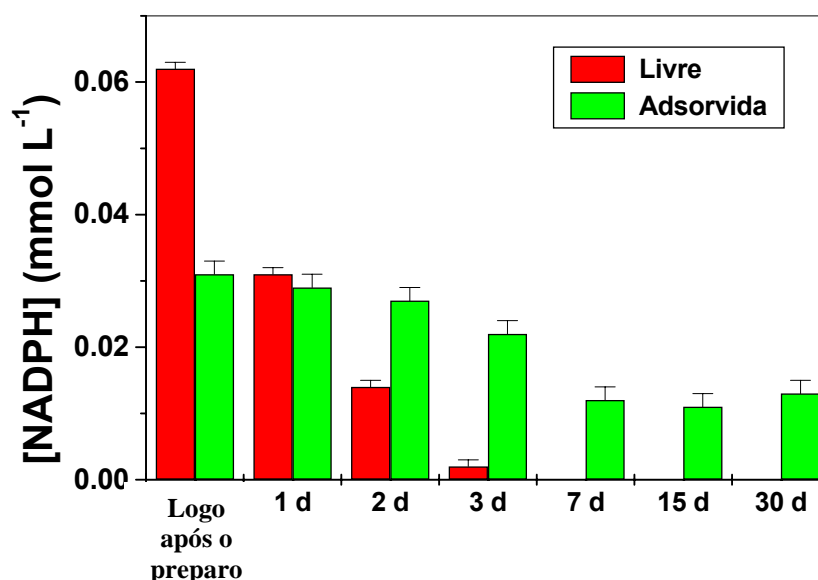


Figura 26 - Formação de NADPH em função do tempo de estocagem, determinado após uma hora de reação na presença de PS/CH-HK (verde) e de HK livre em solução (vermelho).

A possibilidade de reuso de partículas PS/CH-HK na determinação de glicose foi testada com $[HK]_{ads} = 0,17 \text{ g/L}$. A atividade enzimática das partículas PS/CH-HK foi mantida sem perda alguma após uso consecutivo por duas vezes. Na terceira vez, a perda de atividade foi de 50% em relação ao valor inicial. Considerando o alto custo de biossensores baseados em enzimas imobilizadas, HK imobilizada em partículas híbridas PS/CH pode trazer vantagens práticas e econômicas.

A atividade catalítica das enzimas depende da conformação estrutural. O sítio ativo da HK envolve os resíduos polares Asn237, Glu269, Glu302 e Asp 211 [Kuser *et al.*, 2000]. Com a imobilização, HK pode sofrer algumas mudanças conformacionais, expondo parte do seu sítio ativo para a superfície das partículas, ricas em moléculas de quitosana, promovendo a formação de pontes de hidrogênio, responsáveis pelo processo de adsorção. A atividade enzimática de HK imobilizada na concentração do patamar de adsorção é maior do que em concentrações maiores ou menores de HK adsorvida. Abaixo do patamar, a atividade pode ser menor devido à pequena quantidade de HK adsorvida. Em concentrações maiores do que a do patamar, a formação de multicamadas de HK adsorvida sobre partículas PS/CH pode favorecer o processo de desnaturação da enzima. Esses resultados indicam que provavelmente ocorre a formação de uma monocamada de HK adsorvida nas partículas, na faixa de concentração do patamar, e que as áreas superficiais (página 82) foram subestimadas.

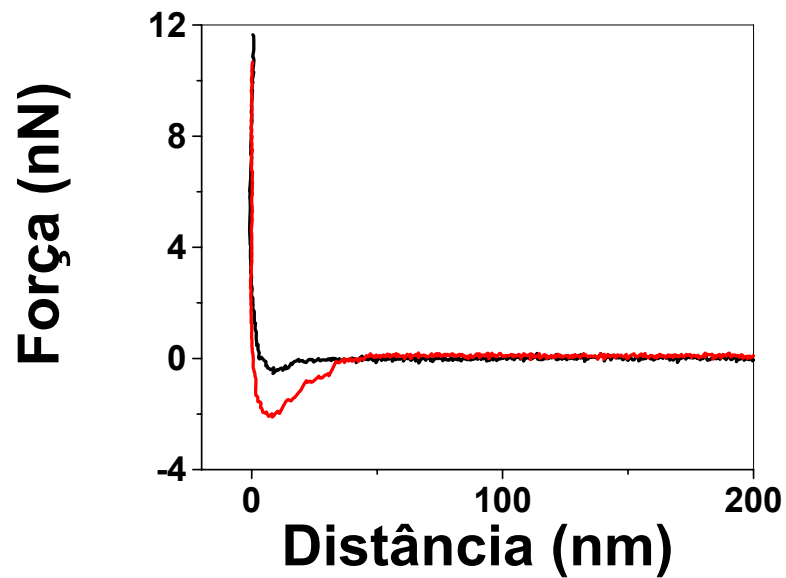
Outro ponto importante a ser discutido se refere às forças que mantêm a conformação das moléculas de HK imobilizadas nas partículas, de forma a manter a atividade enzimática por longos períodos e uso contínuo, enquanto a enzima em solução perde a atividade. Uma possível explicação se baseia nas forças de hidratação, que são diferentes na HK imobilizada, em relação à HK livre em solução [Leikin *et al.*, 1993 e Marcelja, 1997]. No caso de HK livre em solução, medidas de estresse osmótico mostraram que aproximadamente 60 moléculas de água são excluídas da cavidade que forma o sítio ativo da HK durante a catálise enzimática

[Rand e col., 1993]. Esse estudo revelou que a diminuição da atividade da água no meio aumenta a afinidade da enzima por glicose, portanto a água pode se comportar como um inibidor para a interação entre HK e glicose. Já no caso de HK imobilizada as moléculas de água de hidratação da camada de CH na superfície das partículas devem colaborar na preservação da atividade enzimática de HK, uma vez que essas moléculas de água não estão livres para agirem como inibidor, evitando a desnaturação de HK após o uso e a estocagem.

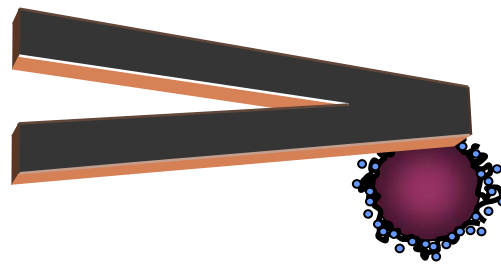
6.8 – Forças de adesão entre partículas PS/CH e HK

Para medir as forças de interação entre HK e as partículas PS/CH, foi realizado um experimento similar àquele realizado para medir a interação entre Con A e partículas PMMA/CMC (páginas 71 e 72). Foram obtidas curvas de força para partículas PS/CH contra superfícies de HK adsorvida sobre lâminas de Si/SiO₂ segundo método descrito por este grupo [Pancera e col., 2006a] em tampão tris-HCl.

A curva na figura 27a mostra uma adesão muito fraca, da ordem de 2 nN, apesar de já ter sido mostrado que HK em solução adsorve irreversivelmente nas partículas PS/CH (isoterma da figura 24a, página 81). As camadas de HK adsorvidas sobre Si/SiO₂ apresentam atividade catalítica por até 48 horas [Pancera *et al.*, 2006a], indicando que após a adsorção, o sítio ativo da enzima está exposto para a solução. Da mesma forma, HK adsorvida sobre as partículas PS/CH mantém a atividade (figura 26, página 85), indicando que os resíduos de aminoácidos responsáveis pela adsorção de HK sobre as partículas não são os do sítio ativo. Provavelmente os resíduos que são atraídos pela superfície da partícula no processo de adsorção já estão comprometidos com a adsorção sobre a placa de Si/SiO₂, resultando em fracas forças de adesão.



(a)

**Tris-HCl**

(b)

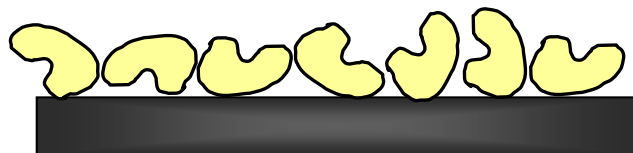
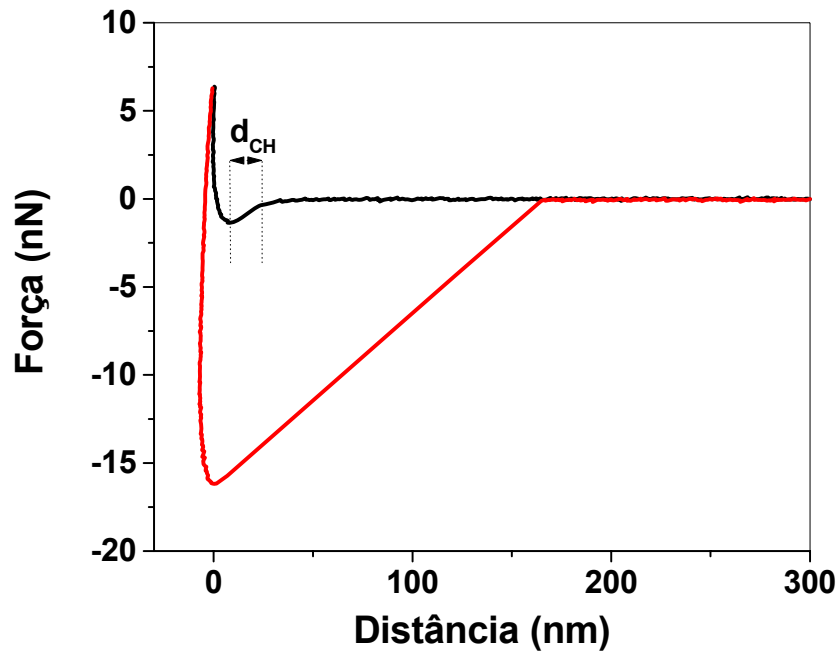


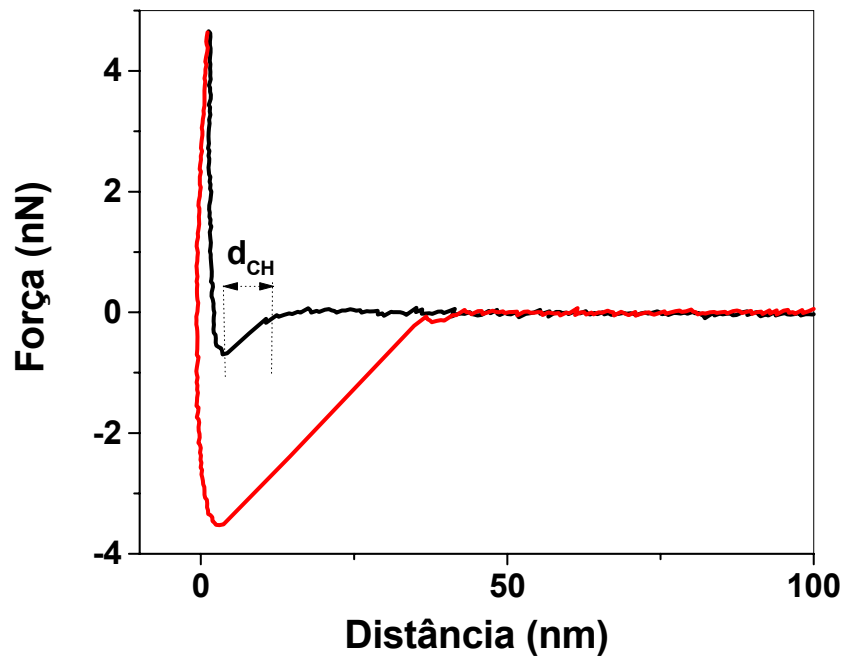
Figura 27 - a) Curva de força obtida para a partícula PS/CH e superfície de HK adsorvida sobre Si/SiO₂, em tampão tris-HCl. b) Representação esquemática do sistema estudado, os elementos estão fora de escala.

A fim de obtermos informações mais detalhadas sobre a superfície das partículas PS/CH, foram obtidas curvas de força com as partículas PS/CH contra superfícies de Si/SiO₂ em água (pH = 6,5) e em NaCl 0,01 mol/L (pH 6,5).

As curvas nas figuras 28a e 28b obtidas em água (pH = 6,5) e em NaCl 0,01 mol/L (pH 6,5), respectivamente, apresentam o mesmo perfil. Ao se aproximar da superfície, o *cantilever* se inclina em direção à superfície, devido às forças atrativas entre os grupos amina e hidroxila das cadeias de CH presentes na superfície da partícula e os grupos hidroxila do silício, até tocar a superfície. A distância em que a superfície da partícula começa a tocar a superfície de Si/SiO₂ até o ponto em que o núcleo rígido do PS é encostado, e as forças repulsivas fazem o cantilever se afastar da superfície de Si/SiO₂ corresponde a espessura da camada macia de quitosana hidratada. Em água, essa distância é de (35 ± 11) nm e corresponde a uma força atrativa de (-2 ± 1) nN. Ao aumentar a força iônica, em NaCl 0,01 mol/L ocorre uma diminuição da distância e da força de atração para (16 ± 6) nm e $(-0,6 \pm 0,2)$ nN, respectivamente. Esse efeito mostra que a maior contribuição nas forças de atração partícula – superfície é de natureza eletrostática, uma vez que em pH 6,5 a superfície da placa de silício é rica em grupos SiO⁻ e as cadeias de CH da partícula possuem alguns grupos amina positivamente carregadas, e o aumento da força iônica do meio gera um efeito de blindagem dessas cargas, diminuindo os valores da distância e força de atração. Pode haver ainda a contribuição da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das cadeias de CH e a superfície de Si/SiO₂. Conforme discutido anteriormente para partículas PMMA/CMC, as camadas macias observadas nas curvas de força correspondem às camadas de polissacarídeo altamente hidratadas envolta das partículas, o que confere a alta estabilidade coloidal observada nas mesmas. As curvas de afastamento nas figuras 28a e 28b confirmam o efeito de blindagem de cargas pelo sal, uma vez que as forças de adesão são reduzidas de (-15 ± 5) nN a (-3 ± 1) nN, ao mudar o meio de água para NaCl 0,01 mol/L.



(a)



(b)

Figura 28 – Curvas de força obtidas para a partícula PS/CH e superfície de Si/SiO₂. a) em água e b) em NaCl 0,01mol/L.

Os esquemas nas figuras 29a e 29b representam os meios em que foram obtidas as curvas de força apresentadas nas figuras 30a a 30c, obtidas com partículas PS/CH - HK contra lâminas de Si/SiO₂ em tampão tris-HCl (pH 7,5) e em soluções 25 mmol/L de manose, glicose ou frutose no mesmo tampão, respectivamente.

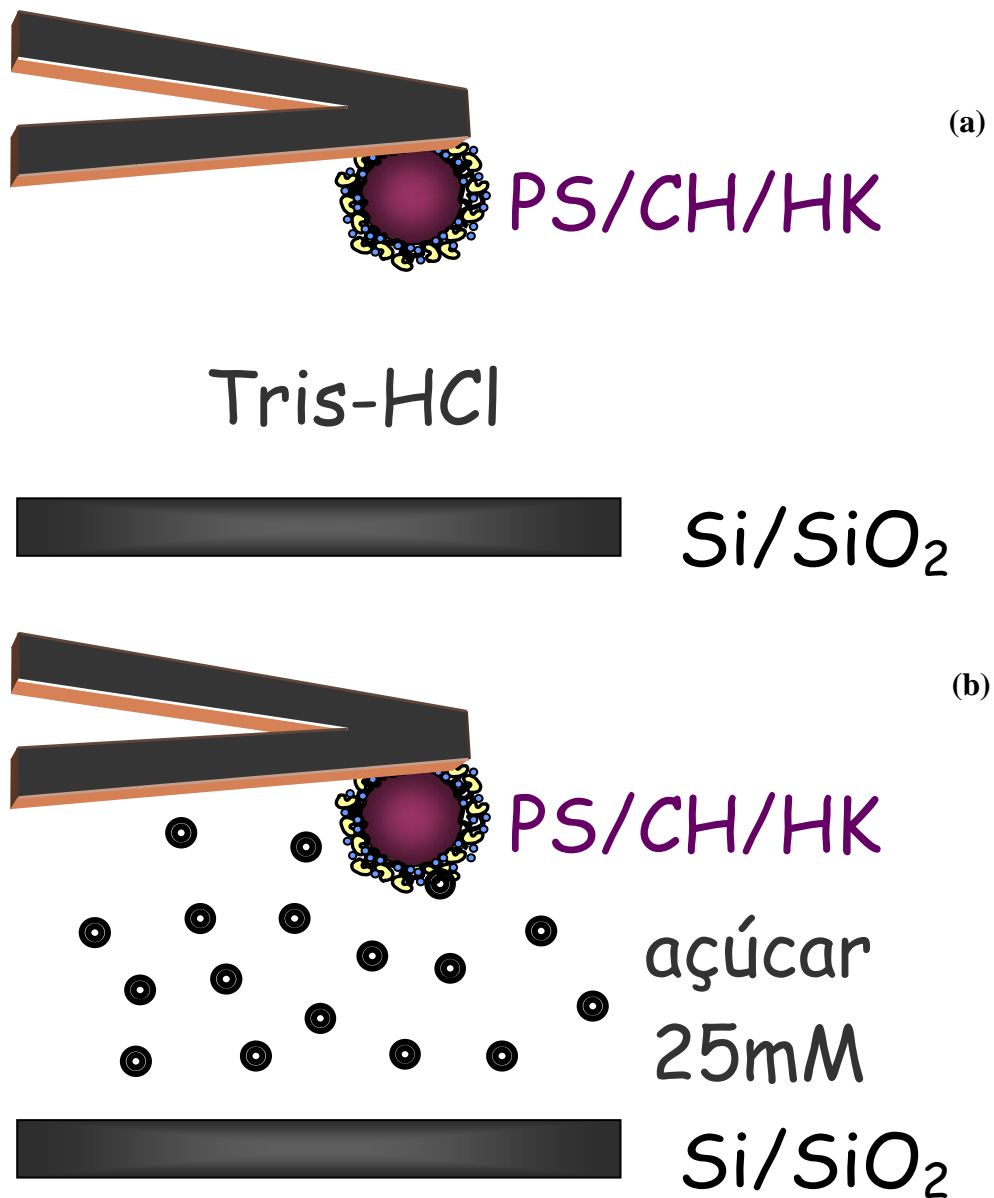
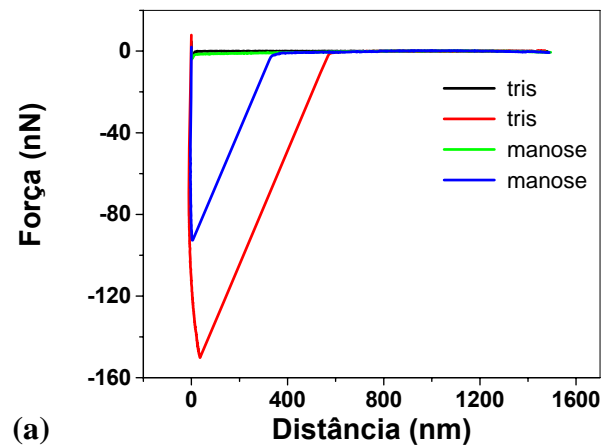
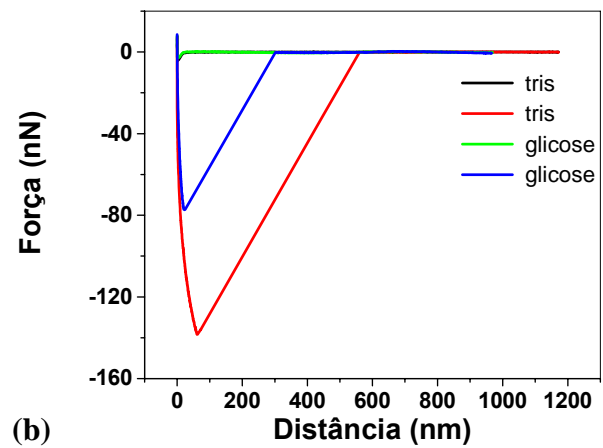


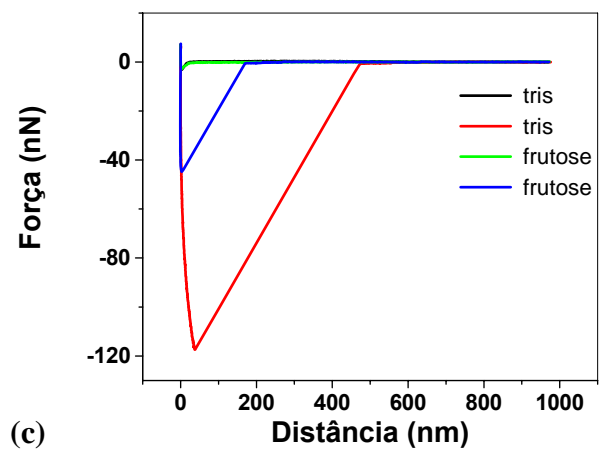
Figura 29 - Representação esquemática dos sistemas estudados, com os elementos fora de escala. a) O meio era o tampão tris-HCl e b) adição de manose, glicose ou frutose 25mmol/L.



(a)



(b)



(c)

Figura 30 – Curvas de força obtidas para a partícula PS/CH-HK e superfície de Si/SiO₂. As curvas pretas e vermelhas foram obtidas em tampão e as verdes e azuis após a adição do açúcar: a) manose, b) glicose e c) frutose.

Em todos os sistemas estudados, durante a aproximação, o *cantilever* sente as forças atrativas e se inclina em direção à superfície até atingir o contato. Essa inclinação ocorre quando o gradiente de forças atrativas entre a camada de HK na superfície da partícula e a superfície de Si/SiO₂ se torna maior do que a constante de mola do *cantilever*. As curvas de afastamento evidenciam forte adesão entre a partícula PS/CH - HK e a superfície de Si/SiO₂, mas ao mudar o meio de tampão para solução de açúcar, instantaneamente houve redução das forças e distâncias de adesão, indicando que as interações atrativas entre superfície da partícula e superfície de Si/SiO₂ diminuíram. Esse efeito pode ser explicado pela adsorção de moléculas de açúcar na superfície da partícula, que contém moléculas de HK ativas na superfície, assim como a adsorção de manose na superfície de Con A mostrada anteriormente. Dessa forma, a superfície da partícula muda e esta nova superfície possui interações mais fracas com Si/SiO₂.

As partículas PS/CH – HK são muito pequenas, da ordem de 400 nm, e a superfície é quimicamente heterogênea, portanto os valores médios de força e distância de adesão variam muito de um *cantilever* pra outro, mas o efeito da redução na adesão após adição de açúcar foi observado em todos os experimentos. Foi realizada uma análise estatística com histogramas construídos a partir de valores normalizados de adesão, para estudar o efeito de cada açúcar no meio. Os histogramas nas figuras 31a e 31b foram normalizados com os valores máximos de força e distância de adesão, respectivamente. Apesar de haver sobreposição dos histogramas dos diferentes açúcares, há uma separação evidente em relação ao meio tamponado sem açúcar. A redução na adesão foi de 70% na presença de frutose, 55% em glicose e 40% em manose. Essas diferenças podem ser relacionadas com a afinidade da HK na partícula por cada tipo de açúcar.

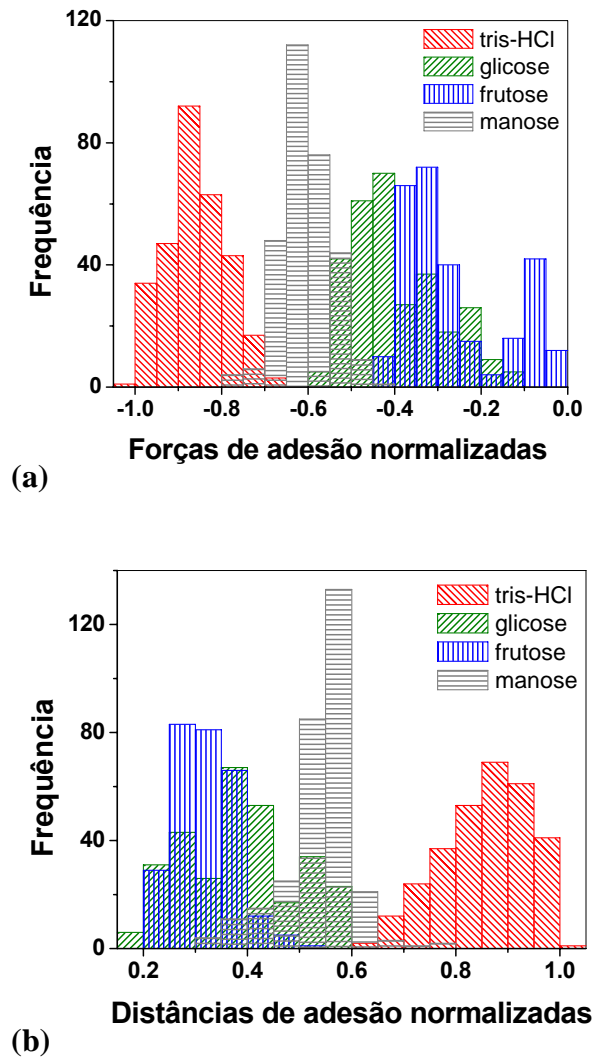


Figura 31 - Histogramas obtidos a partir de curvas de força versus distância para PS/CH-HK contra Si/SiO₂ em quatro meios diferentes: Em vermelho Tris-HCl, em verde glicose, em azul frutose e em cinza manose. a) Forças de adesão e b) Distâncias de adesão.

Como experimento controle, foram obtidas curvas de força para partículas PS/CH, sem HK adsorvida, contra superfície de Si/SiO₂, em tampão tris-HCl e em solução de glicose 25 mmol/L. Esse experimento foi realizado com 5 partículas diferentes, e mesmo após 3 horas em contato com a solução de glicose, não foi observada nenhuma mudança significativa nas curvas de força como mostram os histogramas nas figuras 32a e 32b. Esses resultados evidenciam que a redução nas forças de adesão observado nas figuras 30a a 30c se deve à presença de moléculas ativas de HK na superfície das partículas PS/CH.

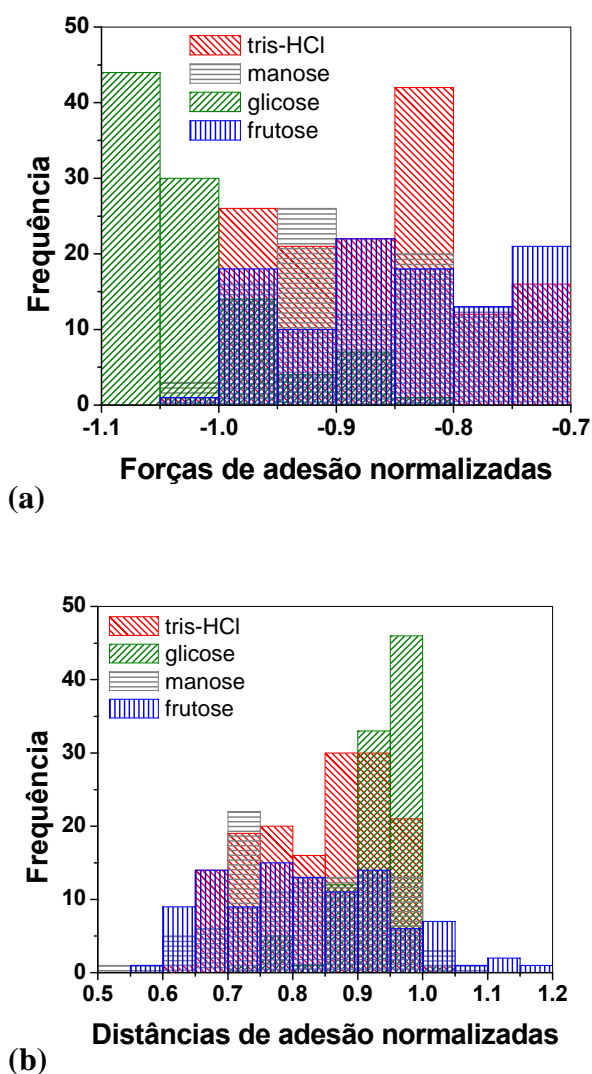


Figura 32 - Histogramas obtidos a partir de curvas de força versus distância para PS/CH-HK contra Si/SiO₂ em quatro meios diferentes: Em vermelho Tris-HCl, em verde glicose, em azul frutose e em cinza manose. a) Forças de adesão e b) Distâncias de adesão.

Provar experimentalmente que a redução na adesão se deve a adsorção de moléculas de açúcar do meio na superfície da partícula PS/CH-HK não é uma tarefa trivial. A primeira tentativa seria medir a frequência de ressonância de cada *cantilever* antes e depois de cada experimento com solução de açúcar. Se as moléculas adsorvem na partícula que está grudada no *cantilever*, ocorre um aumento na massa do mesmo, que alteraria sua frequência de ressonância. Considerando o número de moléculas HK estimado na superfície de cada partícula de $6,4 \times 10^5$ e a hipótese de que cada molécula de HK pode adsorver uma molécula de glicose, o aumento de massa no *cantilever* seria de aproximadamente $1,9 \times 10^{-16}$ g, bem abaixo do mínimo necessário suficiente para causar uma diminuição mensurável na frequência de ressonância, que é da ordem de nanogramas.

Uma outra tentativa de medir a adsorção dos açúcares nas partículas PS/CH-HK foi através de medidas de eletroforese capilar. Os experimentos foram realizados em equipamento de eletroforese capilar *labmade* com detecção condutométrica sem contato (550kHz, 2Vpp) [da Silva e do Lago, 1998; Carvalho e col., 2003]. Foi utilizado como eletrólito de corrida solução contendo NaOH 10mM, Na_2HPO_4 4,5mM e CTAB 0,2mM (pH 11,4). Empregou-se capilar de sílica fundida de 50 μm de diâmetro interno, 60cm de comprimento total, 50cm de comprimento efetivo. O potencial de corrida aplicado foi de -15kV e cada amostra foi injetada hidrodinamicamente a 100mm de altura por 10s. Alíquotas das dispersões das partículas PS/CH-HK na concentração de $3,3 \times 10^{12}$ partículas/mL foram adicionadas a soluções de glicose ou frutose 50 mmol/L. Após 3 horas as dispersões foram centrifugadas e o sobrenadante injetado no capilar. As áreas dos picos referentes à cada açúcar, que são proporcionais às concentrações de açúcar no meio, foram comparadas a uma curva de calibração. A redução na concentração de açúcar no meio após a interação com as partículas foi de aproximadamente (5 ± 1) % em relação à concentração inicial. Esses resultados se referem à média de 12 amostras com glicose e 12 com frutose, não tendo sido

possível observar uma adsorção preferencial entre eles, ao contrário do que indicaram as curvas de força nas figuras 30a a 30c (página 92) e os histogramas 31a e 31b (página 94). Assim como mostrado anteriormente para o sistema PMMA/CMC e Con A, as medidas de forças de adesão obtidas por AFM utilizando partículas coloidais coladas na extremidade do *cantilever* podem fornecer informações em menor escala a respeito das interações intermoleculares entre biomoléculas.

7 – Conclusões

A formação de filmes finos de duas xiloglucanas obtidas a partir de fontes diferentes, *Hymenaea courbaril* (HXG) e *Tamarindus indica* (TXG) sobre lâminas de Si/SiO₂ modificadas ou não com grupos amino, assim como a caracterização dos mesmos foi estudada pela primeira vez, por medidas de elipsometria e AFM. A adsorção de TXG e HXG é mais pronunciada nas superfícies de silício após a modificação com grupos amina. Além disso, HXG adsorve mais do que TXG sobre as duas superfícies estudadas. Estes resultados mostram que as diferenças na fonte vegetal e na estrutura fina de cada XG influenciam na espessura e morfologia de seus filmes finos. Os oligômeros XXXXG presentes na HXG favorecem as interações com a superfície, assim como observado para interação entre XG-celulose [Lima e Buckeridge, 2001].

A adsorção de Con A sobre filmes de CMC foi mais pronunciada do que sobre lâminas de Si/SiO₂, filmes de HXG, TXG e PMMA. As cadeias de CMC possuem além dos anéis glicosídicos que interagem especificamente com lectinas grupos carboxilatos, favorecendo interações eletrostáticas com os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da Con A. As camadas de Con A formadas sobre HXG e TXG apresentam potencial para posterior utilização no reconhecimento e detecção de carboidratos para desenvolvimento de diagnósticos para algumas doenças, justamente por não comprometerem o sítio de ligação específica da lectina na adsorção.

As partículas poliméricas decoradas com polissacarídeos PMMA/CMC e PS/CH apresentaram alta estabilidade coloidal, atribuída à presença da camada de polissacarídeo altamente hidratada na superfície das partículas, que confere estabilidade hidro-eleto-estérica. As espessuras dessas camadas foram determinadas (20 ± 10) nm para CMC e (35 ± 11) nm

para CH, por medidas de forças de atração utilizando as partículas coladas na extremidade de *cantilevers* de AFM (*Colloidal Probe Technique*).

As duas partículas resultaram em bons substratos para a imobilização das biomoléculas estudadas, Con A e HK. No caso das partículas PMMA/CMC cobertas com uma camada de Con A, a alta estabilidade do sistema confere às partículas um grande potencial no uso em diagnósticos, com a possibilidade de explorar a propriedade de aglutinação específica da lectina. HK imobilizada sobre PMMA/CMC perdeu drasticamente sua atividade catalítica, ao contrário do observado quando a mesma enzima foi imobilizada em PS/CH. A estrutura da camada de hidratação e a composição química de cada um dos polissacarídeos (CMC ou CH) na superfície das partículas é diferente, gerando diferenças na conformação das moléculas de HK quando imobilizadas sobre cada partícula. A perda inicial de aproximadamente 50% na atividade enzimática da HK imobilizada em PS/CH foi compensada pelas vantagens de (i) as partículas PS/CH – HK poderem ser estocadas por até 1 mês em temperatura ambiente e (ii) reutilizadas até 3 vezes.

As forças e distâncias de adesão entre partículas PMMA/CMC e superfícies de Con A adsorvida sobre lâminas de Si/SiO₂, foram drasticamente reduzidas quando manose 5 mmol/L foi adicionada ao meio. Partículas PS/CH – HK foram usadas com superfícies de Si/SiO₂, e foi observada uma redução de aproximadamente 40% nas forças e distâncias de adesão, ao ser adicionada manose ao meio, 50% após adição de glicose e 70% após adição de frutose. A adsorção preferencial de frutose nas partículas não pôde ser medida por eletroforese capilar, revelando o potencial do uso do AFM para medidas em menor escala de interações intermoleculares específicas, como as existentes entre enzima-substrato e lectina-carboidrato.

Medidas de forças de adesão utilizando as partículas poliméricas coladas na extremidade de *cantilevers* de AFM evidenciaram o potencial dos dois sistemas estudados como métodos qualitativos para a detecção de açúcar. Diferente dos tradicionais sensores

amperométricos baseados na enzima glicose oxidase [Eggins, 1997, Borisov & Wolfbeis, 2008], que tem como substrato específico a glicose, esses sistemas aqui apresentados possibilitam o reconhecimento mais abrangente, de pelo menos três açúcares, glicose, manose e frutose. A obtenção de curvas de força com partículas coloidais coladas em *cantilevers* de AFM começou a ser explorada nos anos 90 [Butt, 1991; Ducker *et al.*, 1991]. Como se trata de uma técnica que mede eventos em escala nanométrica, alguns efeitos não detectáveis com técnicas mais convencionais se potencializam e podem então ser observados, revelando o futuro promissor desta técnica.

8 – Referências

- ADAMSON, W. A. *Physical Chemistry of Surfaces*; John Wiley and Sons, 5a ed., 1990.
- ALMEIDA, A. T.; SALVADORI, M. C.; PETRI, D. F. S. Enolase adsorption onto hydrophobic and hydrophilic solid substrates. *Langmuir*, v. 18, n. 18, p. 6914-6920, 2002.
- AZZAM, R. M. A. e BASHARA, N. M.; *Ellipsometry and Polarized Light*. Amsterdam: North Holland Publication, 1979.
- BENNETT, W. S. e STEITZ, T. A. Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, p. 4848-4852, 1978.
- BERGMAYER, H. U. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Verlag Chemie: Weinheim, p. 222-223, 1984.
- BORISOV, S. M. e WOLFBEIS, O. S. Optical Biosensors. *Chemical Reviews*, v. 108, p. 423-461, 2008.
- BUCKERIDGE, M. S. *et al.* A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea coubaril* L. (Leguminosae) cotyledons. *Carbohydrate Research*, v. 303, p. 233-237, 1997.
- BUTT, H. J. Measuring electrostatic, van der Waals and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophysical Journal*, v. 60, p. 1438-1444, 1991.
- BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, v. 59, 1-152, 2005.
- CAI, K. Y. *et al.* Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, v. 26, p. 5960-5971, 2005.
- CARDENAS, M. L.; CORNISH-BOWDEN, A.; URETA, T. Evolution and regulatory role of the hexokinase. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, v. 1401, n. 3, p. 242-264, 1998.
- CARPITA, N. C. e GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CARTER, D. C. e HO, J. X. Structure of Serum-Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, v. 45, p. 153-203, 1994.
- CARUSO, F. e SCHULER, C. Enzyme Multilayers on Colloid Particles: Assembly, Stability, and Enzymatic Activity. *Langmuir*, v. 16, p. 9595-9603, 2000.

- CARUSO, F., FIEDLER, H., HAAGE, K. Assembly of β -glucosidase multilayers on spherical colloidal particles and their use as active catalysts. *Colloids and Surfaces A*, v. 169, p. 287-293, 2000.
- CARVALHO, A. Z.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2138–2143, 2003.
- CASTRO, L. B. R. *et al.* Immobilization of hexokinase onto chitosan decorated particles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 29, p. 8520-8526, 2007.
- CASTRO, L. B. R. *et al.* Synthesis of stable polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles in the presence of carboxymethyl cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 43, n. 24, p. 7774-7779, 2004.
- CASTRO, L. B. R.; KAPPL, M.; PETRI, D. F. S. Adhesion forces between hybrid colloidal particles and concanavalin A. *Langmuir*, v. 22, n. 8, p. 3757-3762, 2006.
- CHAKRABORTY, T.; CHAKRABORTY, I.; GHOSH, S. Sodium carboxymethylcellulose-CTAB interaction: A detailed thermodynamic study of polymer-surfactant interaction with opposite charges. *Langmuir*, v. 22, p. 9905-9913, 2006.
- CHEN, A. e MOY, V. T. Cross-Linking of Cell Surface Receptors Enhances Cooperativity of Molecular Adhesion. *Biophysical Journal*, v. 78, p. 2814–2820, 2000.
- CHENAULT, H. K.; MANDES, R. F.; HORNBERGER, K. R. Synthetic Utility of Yeast Hexokinase. Substrate Specificity, Cofactor Regeneration, and Product Isolation. *Journal of Organic Chemistry*, v. 62, p. 331-336, 1997.
- CHENG, Q. e STEVENS, R. C. Coupling of an Induced Fit Enzyme to Polydiacetylene Thin Films: Colorimetric Detection of Glucose. *Advanced Materials*, v. 9, p. 481-483, 1997.
- CHERN, C. S., LEE, C. K., HO, C. C. Colloidal stability of chitosan-modified poly(methyl methacrylate) latex particles. *Colloid and Polymer Science*, v. 277, p. 507-512, 1999a.
- CHERN, C. S., LEE, C. K., HO, C. C. Electrostatic interaction between chitosan-modified latex particles and bovine serum albumin. *Colloid and Polymer Science*, v. 277, p. 979-985, 1999b.
- CHERN, C. S., LEE, C. K., TSAI, Y. J., HO, C. C. Colloidal stability of dextran-modified latex particles toward adsorption of concanavalin A. *Colloid and Polymer Science*, v. 276, p. 427-433, 1998.
- CHERN, C. S.; LEE, C. K., TSAI, Y. J. Isothermal equilibrium adsorption of concanavalin A on dextran-modified poly(methyl methacrylate) latex particles. *Colloid and Polymer Science*, v. 277, n. 6, p. 528-534, 1999c.
- CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T., MORI, T. *Immobilized Enzymes*, Wiley & Sons, New York, 1978.

- DA SILVA, J. A. F. e DO LAGO, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 4339-4343, 1998.
- DAM, T. K. e BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical Reviews*, v. 102, n. 2, p. 387-429, 2002.
- DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*, v. 277, p. 1232-1237, 1997.
- DELAIR, T. *et al.* Amino-containing cationic latex-oligodeoxyribonucleotide conjugates: application to diagnostic test sensitivity enhancement. *Colloids and Surfaces A* v.153, p. 341-353, 1999.
- DELGADO, A. D. S., LEONARD, M., DELLACHERIE. Surface Properties of Polystyrene Nanoparticles Coated with Dextrans and Dextran-PEO Copolymers. Effect of Polymer Architecture on Protein Adsorption. *Langmuir*, v. 17, p. 4386-4391, 2001.
- DOMARD, A. pH and CD measurements on a fully deacetylated chitosan – application to Cu II – polymer interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 9, n. 2, p. 98-104, 1987.
- DU, Y-Z. e KODAKA, M. Preparation and characterization of biotinylated and enzyme-immobilized heterobifunctional latex particles as nanobio devices. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 43, p. 562–574, 2005.
- DUCKER, W. A.; SENDEN, T. J.; PASHLEY, R. M. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature*, v. 353, p. 239-241, 1991.
- DUPONT-GILLAIN, C.C. e ROUXHET, P.G. AFM study of the interaction of collagen with polystyrene and plasma-oxidized polystyrene. *Langmuir*, v. 17, p. 7261, 2001.
- EGGINS, B. *Biosensors an Introduction*, Wiley & Sons, New York, 1997.
- ELLIOTT, J.T. *et al.* Phospholipid monolayers supported on spun cast polystyrene films. *Langmuir*, v. 19, p. 2275, 2003.
- FERNANDES, R., *et al.* Thermo-biolithography: A technique for patterning nucleic acids and proteins. *Langmuir*, v. 20, p. 906, 2004.
- FREITAS, R. A. *et al.* Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. *Carbohydrate Chemistry*, v. 60, n. 4, p. 507-514, 2005.
- FUJIMOTO, J. e PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces *Langmuir* v. 17, n. 1, p. 56-60, 2001.
- FUJIMOTO, J. *et al.* Formation of polysaccharides and protein multilayers. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.
- GAD, M., ITOH, A., IKAI, A. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy. *Cell Biology International*, v. 21, n. 11, p. 697-706, 1997.

- GILBERT, R. Emulsion Polymerization: A Mechanistic Approach; Academic Press: London, 1995.
- GILBOA-GARBER, N.; MYMON, H.; OREN, A. Typing of halophilic Archaea and characterization of their cell surface carbohydrates by use of lectins. *FEMS Microbiology Letters*, v. 163, n. 1, p. 91-97, 1998.
- GRIMALDI, J. J. e SYKES, B. D. Concanavalin A – stopped flow nuclear magnetic resonance study of conformational changes induced by Mn ⁺⁺, Ca ⁺⁺, and alpha-methyl-D-mannoside. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 5, p. 1618-1624, 1975.
- GUILLOT S. Surfactant-induced collapse of polymer chains and monodisperse growth of aggregates near the precipitation boundary in carboxymethylcellulose-DTAB aqueous solutions. *Langmuir*, v. 19, p. 230 - 237, 2003.
- HAMMOND, P. T. Form and function in multilayer assembly: New applications at the nanoscale. *Advanced Materials*, v. 16, p. 1271-1293, 2004.
- HANUS, J. e MAZEAU, K. The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers*, v. 82, p. 59-73, 2006.
- HAYAKAWA K.; SANTERRE J. P.; KWAK J. C. T. Study of Surfactant-Polyelectrolyte Interactions. Binding of Dodecyl- and Tetradecyltrimethylammonium Bromide by Some Carboxylic Polyelectrolytes. *Macromolecules*, v. 16, p. 1642-1645, 1983.
- HE, P.L. e HU, N. F. Interactions between heme proteins and dextran sulfate in layer-by-layer assembly films. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, p. 13144-13152, 2004.
- HEINZE, T. (Volume Editor). *Advances in Polymer Science v. 186: Polysaccharides I Structure, Characterization and Use*, p. 1-67. Heidelberg, Springer Verlag, 2005.
- HOOGENDAM, C. W. *et al.* Adsorption mechanisms of carboxymethyl cellulose on mineral surfaces. *Langmuir*, v. 14, p. 3825-3839, 1998.
- HUANG, H., MANCIU, M., RUCKENSTEIN, E. On the Restabilization of Protein-Covered Latex Colloids at High Ionic Strengths. *Langmuir*, v. 21, p. 94-99, 2005.
- HUTTER, J. L. e BECHHOEFER, J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, v. 64 n. 7, p. 1868-1873, 1993.
- JEYAPRAKASH, A. A. Crystal Structure of the Jacalin-T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin-T-antigen Complexes. *Journal of Molecular Biology*, v. 321, p. 637-645, 2002.
- JONES, J. P.; WEISS, P. M.; CLELAND, W. W. Secondary ¹⁸O Isotope Effects for Hexokinase-Catalyzed Phosphoryl Transfer from ATP. *Biochemistry*, v. 30, p. 3634-3639, 1991.
- JUST, E. K. e MAJEWICZ, T. G. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; Wiley, New York, v. 3, 1985.

- KAWAGUCHI, H. Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science*, v. 25, p. 1171-1210, 2000.
- KOSAKA, P. M. *et al.* Catalytic activity of lipase immobilized onto ultrathin films of cellulose esters. *Langmuir*, v. 23, p. 12167-12173, 2007.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139, 2004.
- KUENG, A., KRANZ, C., MIZAIKOFF, B. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 19, p. 1301-1307, 2004.
- KUMAR, G., WANG, Y. C., CO, C., HO, C. Spatially controlled cell engineering on biomaterials using polyelectrolytes. *Langmuir*, v. 19, p. 10550, 2003.
- KUSER, P. R. *et al.* The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 27, p. 20814-20821, 2000.
- LEE, J. Y., CHEONG, I., KIM, J. H. Agglutination study of poly(allyl- α -D-glucopyranose/styrene) latex particles in the presence of Concanavalin A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 41, p. 203-208, 2005.
- LEHR, C. M. *et al.* In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 78, n. 1, p. 43-48, 1992.
- LEIKIN, S. *et al.* Hydration Forces. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 44, p. 369-395, 1993.
- LEKKA, M. *et al.* Probing molecular interaction between concanavalin A and mannose ligands by means of SFM. *European Biophysical Journal*, v. 33, p. 644-650, 2004.
- LIMA, D. U. e BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers*, v. 46, p. 157-163, 2001.
- LIMA, D. U., LOH, W., BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the side chains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 389-394, 2004.
- LIMA, D. U.; OLIVEIRA, R. C.; BUCKERIDGE, M. S. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. *Carbohydrate Polymer*, v. 52, p. 367-373, 2003.
- LIS, H. e SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LORIS, R. *et al.* Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1383, p. 9-36, 1998.
- LYKLEMA, J. e NORDE, W. Interfacial behaviour of biomacromolecules. *Progress in Colloid & Polymer Science*, v. 101, p. 9-17, 1996.

- MAGANOV, S. N. In *Applied Scanning Probe Methods*; BHUSHAN, B., FUCHS, H., HOSAKA, S., eds.; cap 7. Springer Verlag, Heidelberg, 2004.
- MARCELJA, S. Hydration in electrical double layers. *Nature*, v. 385, n. 6618, p. 689-690, 1997.
- MARIE, E.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Synthesis of Chitosan-Stabilized Polymer Dispersions, Capsules, and Chitosan Grafting Products via Miniemulsion. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 475-481, 2002.
- MATEO, C. *et al.* Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, p. 98-105, 2000.
- MATTE, A.; TARI, L. W. e DELBARE, L. T. J. How do kinases transfer phosphoryl groups? *Structure*, v. 6, p. 413-419, 1998.
- MCDONALD, R. C.; STEITZ, T. A.; ENGELMAN, D. M. Yeast hexokinase in solution exhibits a large conformational change upon binding glucose or glucose-6-phosphate. *Biochemistry*, v. 18, p. 338-342, 1979.
- MICERA G. *et al.* Copper(II) complexation by D-Glucosamine – Spectroscopic and Potentiometric Studies. *Inorganica Chimica Acta – Bioinorganic Chemistry*, v. 107, n. 1, p. 45-48, 1985.
- MONTEIRO, O. A. C. e AIROLDI, C. Some thermodynamic data on copper-chitin and copper-chitosan biopolymer interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 212, n. 2, p. 212-219, 1999.
- MONTREUIL, J., VLIEGENTHART, J. F. G., SCHACHTER, H., *Glycoproteins and Disease*, Elsevier, 1996.
- MORRIS, S.; HANNA, S.; MILES, M. J. The self-assembly of plant cell wall components by single-molecule force spectroscopy and Monte Carlo modeling. *Nanotechnology*, v. 15, n.9, p. 1296-1301, 2004.
- MUGURUMA, H. *et al.* Adsorption of Glucose Oxidase onto Plasma-Polymerized Film Characterized by Atomic Force Microscopy, Quartz Crystal Microbalance, and Electrochemical Measurement. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, p. 26033-26039, 2006.
- MUZZARELLI, R. A. A. *Chitin*; Pergamon Press: New York, 1977.
- NAISMITH, J. H. e FIELD, R. A. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 2, p. 972-976, 1996.
- NAVES, A. F. e PETRI, D. F. S. The effect of molecular weight and degree of substitution on the interactions between carboxymethyl cellulose and cetyltrimethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 254, p. 207-214, 2005.

- NORDGREN, N. et al. Top-down grafting of xyloglucan to gold monitored by QCM-D and AFM: Enzymatic activity and interactions with cellulose *Biomacromolecules*, v. 9, p. 942-948, 2008.
- OKUBO, M. e AHMAD, H. Enzymatic Activity of Trypsin Adsorbed on Temperature-Sensitive Composite Polymer Particles. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 36, p. 883–888, 1998.
- ORTEGA-VINUESA, J. L., TENGVALL, P., LUNDSTROM, I. Molecular packing of HSA, IgG, and fibrinogen adsorbed on silicon by AFM imaging. *Thin Solid Films*, v. 324, p. 257-253, 1998.
- PALIK, E. D. *Handbook of Optical Constants of Solids*. Academic Press Inc., New York, 1985.
- PANCERA, S. M. et al. Adsorption behavior and activity of hexokinase. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 302, p. 417-423, 2006a.
- PANCERA, S. M. et al. Effect of pH on the adsorption and activity of creatine phosphokinase. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, p. 2674-2680, 2006b.
- PANCERA, S. M.; ITRI, R.; PETRI, D. F. S. The effect of poly(ethylene glycol) on the activity, structural conformation and stability of yeast hexokinase. *Progress in Colloid & Polymer Science*, v. 128, p. 178-183, 2004.
- PETRI, D. F. S. Characterization of spin-coated polymer films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 5, p. 695-699, 2002.
- PETRI, D. F. S. et al. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, v. 15, n. 13, p. 4520-4523, 1999.
- PICKUP, J. C. et al. Fluorescence-based glucose sensors. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 20, p. 2555-2565, 2005a.
- PICKUP, J. C. et al. In vivo glucose monitoring: the clinical reality and the promise. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 20, p. 1897-1902, 2005b.
- RABEA, E. I., et al. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1457-1465, 2003.
- RALSTON, J. et al. Atomic force microscopy and direct surface force measurements. *Pure and Applied Chemistry*, v. 77, p. 2149–2170, 2005.
- RAMSDEN, J. J. Towards zero-perturbation methods for investigating biomolecular interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 141, p. 287–294, 1998.
- RAND, R. P. et al. Measured change in protein solvation with substrate-binding and turnover. *Biochemistry*, v. 32, n. 23, p. 5925-5929, 1993.

- REEKE, G. N.; BECKER J. W.; EDELMAN, G. M. Covalent and 3-dimensional structure of concanavalin A. 4. Atomic coordinates, hydrogen-bonding and quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 4, p. 1525-1547, 1975.
- REVELL, D. J. *et al.* Self-assembled carbohydrate monolayers: Formation and surface selective molecular recognition. *Langmuir*, v. 14, n. 16, p. 4517-4524, 1998.
- RINAUDO, M. e DOMARD, A. In *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*; Skja'k-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P., Eds.; Elsevier Applied Science:London, 1989.
- ROBERTS, G. A. F. *Chitin Chemistry*; Mac Millian Press: Houndmills, 1992.
- SACKMANN, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, v.271, n.5245, p. 43-48, 1996.
- SAMPATH, S. e LEV, O. 3D organized self-assembled monolayer electrodes: A novel biosensor configuration. *Advanced. Materials*, v. 9, p. 410, 1997.
- SATO K. *et al.* Sugar-induced disintegration of layer-by-layer assemblies composed of concanavalin A and glycogen. *Langmuir*, v. 21, n. 2, p. 797-799, 2005.
- SATO K. *et al.* Sugar-sensitive thin films composed of concanavalin A and glycogen. *Analytical Sciences*, v. 20, n. 9, p.1247-1248, 2004.
- SCHWARTZ, D. K. Langmuir-Blodgett film structure. *Surface Science Reports*, v. 27, p. 245-334, 1997.
- SHARON, N. e LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v. 14, p. 53-62, 2004.
- SHARON, N. e LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science*, v. 177, n. 4053, p. 949-959, 1972.
- SIERAKOWSKI, M. R. *et al.* Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 167-175, 2002.
- SILBERBERG, A. Adsorption of Flexible Macromolecules. IV. Effect of Solvent-Solute Interactions, Solute Concentration, and Molecular Weight. *Journal of Chemical Physics*, v. 48, p. 2835-2851, 1968.
- SILVA, R. A., CARMONA-RIBEIRO, A. M., PETRI, D. F. S. Adsorption behavior and activity of horseradish peroxidase onto polysaccharide-decorated particles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, p. 404-409, 2007.
- SINHA, V. R. *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, n. 1, p.1-33, 2004.
- SMITH, E. A. *et al.* Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 20, p. 6140-6148, 2003.

- STIERNSTEDT, J. *et al.* Friction between cellulose surfaces and effect of xyloglucan adsorption. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 2147-2153, 2006.
- STUART, M. A. C. *et al.* The adsorption of hydrophobically modified carboxymethylcellulose on a hydrophobic solid: Effects of pH and ionic strength. *Colloid and Polymer Science*, v. 276, p. 335-341, 1998.
- THALBERG, K. e LINDMAN, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, v. 93, p. 1478-1483, 1989.
- TOUHAMI, A. *et al.* Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiology-SGM*, v. 149, p. 2873-2878, 2003a.
- TOUHAMI, A. *et al.* Probing specific lectin-carbohydrate interactions using atomic force microscopy imaging and force measurements. *Langmuir*, v. 19, p. 1745-1751, 2003b.
- TRABELSI, S.; RASPAUD, E.; LANGEVIN, D. Aggregate formation in aqueous solutions of carboxymethylcellulose and cationic surfactants. *Langmuir*, v. 23, p. 10053-10062, 2007.
- VAN DE STEEG, H. G. M. *et al.* Polyelectrolyte adsorption: a subtle balance of forces. *Langmuir*, v. 8, p. 2538, 1992.
- VAN DER LUBBEN, I. M. *et al.* Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, n. 2, p. 139-144, 2001.
- VASINA, E. N. e DEJARDIN, P. Kinetics of adsorption, desorption, and exchange of alpha-chymotrypsin and lysozyme on poly(ethyleneterephthalate) tracked film and track-etched membrane. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 304-313, 2003.
- VIEIRA, D. B. *et al.* Competitive adsorption of cationic bilayers and chitosan on latex: Optimal biocidal action. *Langmuir*, v. 19, n. 3, p. 924-932, 2003.
- VIOLA, R. E. *et al.* Substrate synergism and the kinetic mechanism of yeast hexokinase. *Biochemistry*, v. 21, p.1295-1302, 1982.
- VOET, D. e VOET, J. G. *Biochemistry*, Willey, Second Edition, 1995.
- WALBOOMERS, X.F. *et al.* Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 46, p. 212, 1999.
- WALLIN, T. e LINSE, P. Monte Carlo simulations of polyelectrolytes at charged micelles .2. Effects of linear charge density. *Journal of Physical Chemistry*, v. 100, p. 17873-17880, 1996.
- www.expasy.org
- www.rcsb.org/pdb
- YOSHIKAZUMI, A. *et al.* Self-assembled monolayer of sugar-carrying polymer chain: Sugar balls from 2-methacryloyloxyethyl D-glucopyranoside. *Langmuir*, v. 15, n. 2, p. 482-488, 1999.
- ZHANG, Y. *et al.* Carbohydrate-protein interactions by "clicked" carbohydrate self-assembled monolayers. *Analytical Chemistry*, v. 78, p. 2001-2008, 2006.

- ZHOU, Q. *et al.* The influence of surface chemical composition on the adsorption of xyloglucan to chemical and mechanical pulps. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 449-458, 2006.

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Lizandra Belmonte Rodrigues de Castro

Local e data de nascimento: São Paulo (SP) aos 5 de agosto de 1982

EDUCAÇÃO

1989 a 1996 – Ensino Fundamental – Colégio Agostiniano São José

1997 a 1999 – Ensino Médio – Colégio Agostiniano Mendel

2000 a 2003 – Bachelarelado em Química – Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Fevereiro de 2001 a Fevereiro de 2004 – Iniciação Científica – Bolsista do CNPq

Orientadora: Profa. Dra. Denise F. S. Petri

Título: Síntese e caracterização de partículas formadas por polímeros sintéticos e polissacarídeos

2004 a 2008 – Doutorado em Físico-Química - Instituto de Química da Universidade de São Paulo – Bolsista do CNPq

Orientadora: Profa. Dra. Denise F. S. Petri

Título: Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos

Agosto de 2006 a Agosto de 2007 – Estágio de Doutorado – Max Planck Institut für Polymerforschung – Mainz, Alemanha – Bolsista da Comunidade Européia – Marie Curie Fellowship

Orientadores: Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt e Dr. Michael Kappl

Título: Interaction forces between polysaccharide-covered particles and biomolecules

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado: CNPq

Tema: Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. CASTRO, L. B. R.; SILVA, F. F.; CARMONA - RIBEIRO, A. M.; KAPPL, M.; PETRI, D. F. S. . Immobilization of Hexokinase onto Chitosan Decorated Particles. *The Journal of Physical Chemistry. B*, v. 111, p. 8520-8526, 2007.
2. SIERAKOWSKI, M. R.; CASTRO, L. B. R.; LUCYSZYN, N.; PETRI, D. F. S. Assembling of Xiloglucans and Lectin onto Si Wafers and onto Amino-Terminated Surfaces. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1017-1023, 2007.
3. CASTRO, L. B. R.; KAPPL, M.; PETRI, D. F. S. Adhesion Forces between Hybrid Colloidal Particles and Concanavalin A. *Langmuir*, v. 22, p. 3757-3762, 2006.
4. CASTRO, L. B. R.; PETRI, D. F. S. Assemblies of Concanavalin A onto Carboxymethylcellulose. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 05, p. 2063-2069, 2005.
5. CASTRO, L. B. R.; HEINZE, T. ; PETRI, D. F. S. Adsorption Behavior of Concanavalin A onto Thin Solid Films. *Microscopy and Microanalysis*, v. 11, sup 3, p. 70-73, 2005.
6. CASTRO, L. B. R.; ALMEIDA, A. T.; PETRI, D. F. S. The Effect of Water or Salt Solution on Thin Hydrophobic Films. *Langmuir*, v. 20, n. 18, p. 7610-7615, 2004.
7. CASTRO, L. B. R.; SOARES, K. V.; NAVES, A. F.; CARMONA - RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Synthesis of Stable Polystyrene and Poly(methyl methacrylate) Particles in the Presence of Carboxymethyl Cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 43, p. 7774-7779, 2004.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Hybrid Particles of Polystyrene and Chitosan. Abstracts of 6th International Symposium on Polyelectrolytes, Dresden, 2006.
2. Ultrathin Films of Xyloglucans: Characterization and Application.. Proceedings of 41st International Symposium on Macromolecules, v. 41, Rio de Janeiro, 2006.
3. Adhesion Forces Between Hybrid Colloidal Particles and Concanavalin A. Proceedings of Particles 2006 Conference, Orlando, 2006.
4. Adsorption Behavior of Concanavalin A onto Thin Solid Films. Abstracts of III Latin American Symposium on Scanning Probe Microscopy, Ouro Preto, 2005.

5. Amplification of Dengue-3 Virus Genome from Serum Samples of Patients Treated with Latex Particles. XVI National Meeting of Virology, 2005. *Virus Reviews & Research*, v. 10, p. 144, 2005.
6. Efeito da água em filmes finos de poliestireno. Livro de resumos da 27^a Reunião Anual da SBQ e XXVI Congresso Latinoamericano de Química, Salvador, 2004.
7. Síntese de nanocompósitos via polimerização em emulsão. Livro de Resumos da 26^a Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, 2003.
8. Síntese de partículas híbridas estáveis controlada por polieletrólitos. Anais do 11^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, São Carlos, 2003.
9. Formation of chitosan/poly(methyl methacrylate) composites. Fourth International Symposium on Natural Polymers and Composites – ISNaPol, São Pedro, 2002. *Natural Polymers and Composites IV*, p. 491-495, 2002.
10. Obtenção de compósitos de quitosana e PMMA e a interação dos mesmos com biomoléculas.. Livro de Resumos da 25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002.
11. Síntese e Caracterização dos Compósitos de quitosana e PMMA. Anais do 10^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, São Carlos, 2002.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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