

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

Jorge Amim Júnior

*Caracterização e aplicação de filmes finos
de acetato butirato carboximetil celulose*

São Paulo

Data do Depósito na SPG

14/08/2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Jorge Amim Júnior

*CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
FILMES FINOS DE ACETATO
BUTIRATO CARBOXIMETIL
CELULOSE*

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

2009

Jorge Amim Júnior

Caracterização e aplicação de filmes finos de acetato butirato carboximetil celulose

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química – Área: Físico-
Química

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico aos meus pais, Jorge (in memoriam) e Conceição,
ao meu irmão Rafael e minha amada Ana
pelo incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional.*

Agradecimentos

- ★ À Prof. Dra. Denise F. S. Petri pela oportunidade, orientação e incentivo.
- ★ Aos meus amigos do laboratório (Aliny, Priscila, Edla, Íris, Lizandra, Rafael, Rubens, Ingrid, Elielma, Alfredo, Aline, Carol, Thais, Arthur, Leonardo) pela companhia diária, pelos cafés e pelas risadas.
- ★ Aos amigos que fiz em São Paulo, Gustavo, Vanessa, Tamara, Patrícia, Ricardo, Douglas, Júlio, Vinicius e Tânia pelas conversas e pela companhia.
- ★ À Eastman Chemical Company, Brasil, pelas amostras dos ésteres de celulose.
- ★ Aos professores Dr. Luis Henrique Mendes da Silva, Dr. Marcelo Ribeiro Leite de Oliveira, UFV, por terem me iniciado na pesquisa e pela confiança no meu trabalho.
- ★ Ao Prof. Dr. Yoshio Kawano pela orientação na monitoria de físico-química e pelo incentivo.
- ★ À Prof. Dra. Rosangela Itri pelo apoio às medidas de SAXS no LNLS.
- ★ Ao Prof. Paulo B. Miranda e ao Francisco C. B. Maia pelo apoio às medidas de SFG no Instituto de Física da USP de São Carlos.
- ★ À FAPESP pelo apoio financeiro.
- ★ Ao Instituto de Química da USP pelas instalações.

Resumo

Amim Júnior, J. **Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de Acetato Butirato Carboximetil Celulose**, 2009, Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese apresenta o estudo do efeito do solvente acetato de etila e acetona no comportamento em solução dos polímeros acetato butirato celulose (CAB) e acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) e nas características dos seus filmes finos obtidos pela técnica de revestimento rotacional ou por adsorção. As medidas de viscosidade e espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) mostraram que o acetato de etila é um melhor solvente para CAB e CMCAB do que a acetona. A caracterização dos filmes foi feita através de medidas de elipsometria, microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia vibracional por geração de soma de frequências (SFG) e medidas de ângulo de contato. Os filmes de CMCAB obtidos por revestimento rotacional são mais espessos quando preparado em acetona do que em acetato de etila. Imagens de AFM mostraram que os filmes de CMCAB oriundos de soluções em acetato de etila são mais homogêneos e lisos do que aqueles preparados a partir de acetona. Medidas de SFG comprovaram a forte afinidade da acetona com SiO₂/Si, mostrando que esse solvente cria uma nova camada para os filmes de CAB e CMCAB. Os valores de energia superficial calculados para CAB e CMCAB foram semelhantes $\sim (49,0 \pm 0,5)$ mJ/m², sendo a contribuição da componente dispersiva maior que a da componente polar. A adsorção das proteínas lisozima, albumina do soro bovino (BSA), concanavalina A e jacalina foram mais pronunciadas sobre os filmes de CMCAB do que sobre CAB. Indicando que a presença do grupo carboximetil (CM) contribui significativamente no processo de adsorção das biomoléculas. O efeito da

rugosidade dos filmes de CAB e CMCAB sobre o processo de adsorção das proteínas foi estudado. No caso do CMCAB, a adsorção das proteínas foi mais pronunciada sobre o filme rugoso do que sobre o filme mais liso. Entretanto, para os filmes de CAB a rugosidade não teve um efeito significativo na adsorção das proteínas.

Palavras-chave: éster de celulose, elipsometria, AFM, energia superficial, adsorção de proteínas

Abstract

Amim Júnior, J. **Characterization and application of thin film of carboxymehtylcellulose acetate butyrate** 2009, PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The effect of ethyl acetate and acetone on the solution behavior of cellulose acetate butyrate (CAB) and carboxymehtylcellulose acetate butyrate (CMCAB) and on the characteristics of films obtained either by spin coating or adsorption was investigated. Viscosity and small angle X-ray scattering (SAXS) measurements showed that ethyl acetate is a better solvent than acetone for CAB e CMCAB. Films were characterized by means of ellipsometry, atomic force microscopy (AFM), sum frequency generation (SFG) and contact angle measurements. Spin-coated films of CMCAB from ethyl acetate solutions were thicker than those deposited from acetone solutions. AFM images revealed that CMCAB spin coated films from ethyl acetate solutions were homogeneous and flat. However, films obtained from solutions in acetone were very rough. SFG spectra showed that acetone binds strongly to SiO₂/Si wafers, creating a new surface for CAB and CMCAB films. Surface energy values determined for spin-coated CAB and CMCAB were similar $\sim (49,0 \pm 0,5)$ mJ/m² with the dispersive component larger than the polar component. The adsorption of lysozyme, bovine serum albumin (BSA), concanavalin A and jacalin was more pronounced onto CMCAB films than that onto CAB films. Indicating that carboxymethyl group favored the adsorption process. The influence of surface roughness of CAB and CMCAB on protein adsorption has been investigated. In the case of CMCAB, protein adsorption was morepronounced onto rough films than that onto flat films. However, the roughness of CAB films exerted no significant influence on proteins adsorption.

Keywords: cellulose ester, ellipsometry, AFM, surface energy, protein adsorption

Lista de Ilustrações

Figura 1. Representação da estrutura química do acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) onde $R = H, COCH_2CH_2CH_3, COCH_3$ e/ou $R = CH_2COOH$ e do acetato butirato celulose (CAB) onde $R = H, COCH_2CH_2CH_3$ e/ou $COCH_3$.

Figura 2. Ilustração de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida sendo θ o ângulo de contato com a superfície, γ_{LV} é a energia superficial do líquido, γ_{SL} é a energia interfacial entre o líquido e o sólido e γ_S é a energia superficial do sólido.

Figura 3. Ilustração da silanização das lâminas de silício (SiO_2/Si) com APS.

Figura 4. Imagem de AFM (80×80) μm^2 do ilustrando a medida da espessura do filme de CMCAB, a linha vermelha é a seção transversal.

Figura 5. Ilustração da montagem experimental utilizada para a medida de ângulo de contato dos filmes finos.

Figura 6. Viscosidade reduzida das soluções de (a) CAB e (b) CMCAB em (■) acetato de etila e em (●) acetona em função da concentração dos polímeros, a $25^\circ C$.

Figura 7. Curvas de SAXS obtidas para as soluções de CAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

Figura 8. Curvas de SAXS obtidas para as soluções de CMCAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

Figura 9. Gráficos de Guinier obtidos para as soluções de CAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

Figura 10. Gráficos de Guinier obtidos para as soluções de CMCAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

Gráfico da espessura dos filmes de CMCAB (sem recozimento) em acetato de etila (■) e em acetona (●) obtido por elipsometria.

Figura 11. Espessura dos filmes de CMCAB medidos por elipsometria (D_{ELI}) em função da concentração de CMCAB em soluções preparadas em acetato de etila (■) e em acetona (●), (a) sem tratamento térmico e (b) após 15h de tratamento térmico.

Figura 12. Gráfico da espessura dos filmes de CMCAB (sem recozimento) em acetato de etila (■) e em acetona (●) obtido por AFM.

Figura 13. Difratoograma de raio-X obtido para o acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB). Os símbolos em preto representam os dados experimentais, a curva em vermelho é o ajuste matemático (Lorentz) e as curvas em azul representam as áreas das regiões cristalinas e do halo amorfo oriundos da deconvolução da curva teórica.

Figura 14. Imagens topográficas de AFM (5×5) μm^2 obtidas no modo contato intermitente para filmes de CMCAB preparados por spin coating em (a) acetona, $Z = 10$ nm, (10mg/mL) e (b) acetato de etila, $Z = 10$ nm, (10mg/mL), sem tratamento térmico.

Figura 15. Imagens de AFM (5×5) μm^2 dos filmes de CMCAB preparados por spin coating em soluções de acetato de etila nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L com os respectivos tempos de recozimento.

Figura 16. Imagens topográficas de AFM (5×5) μm^2 obtidas no modo contato intermitente para filmes de CMCAB preparados por spin coating em (a) acetona, $Z = 10$ nm, (10mg/mL) e (b) acetato de etila, $Z = 10$ nm, (10mg/mL), sem tratamento térmico.

Figura 17. Valores de rugosidade média (RMS) dos filmes de CMCAB preparados em acetato de etila em diferentes tempos de recozimento.

Figura 18. Valores de rugosidade média (RMS) dos filmes de CMCAB preparados em acetona em diferentes tempos de recozimento.

Figura 19. Isotermas de adsorção obtidas para (a) CAB e (b) CMCAB utilizando acetato de etila como solvente em duas superfícies diferentes, (●) silício (SiO_2/Si) e (■) para a superfície de SiO_2/Si funcionalizada com grupo amino (APS), a 25°C .

Figura 20. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 para os filmes de CAB sobre (a) Si/SiO_2 , $Z = 4$ nm, (b) APS, $Z = 7$ nm e para os filmes de CMCAB sobre (c) Si/SiO_2 , $Z = 3$ nm e (d) APS, $Z = 3$ nm.

Figura 21. Imagens de AFM (5×5) μm^2 para CMCAB: (a) 0h de recozimento, $Z = 8$ nm, (b) 15h de recozimento, $Z = 10$ nm e para CAB: (c) 0h de recozimento, $Z = 7$ nm e CAB (d) 15h de recozimento, $Z = 9$ nm, sobre superfície de APS.

Figura 22. Espectro de SFG obtido em ar para os filmes de (a) CAB e (b) CMCAB preparados com soluções de acetato de etila.

Figura 23. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 para os filmes de CAB preparado em (a) acetato de etila e em (b) acetona por adsorção.

Figura 24. Espectro de SFG obtido a seco para o filme de CAB preparado com (a) acetato de etila e com (b) acetona sobre quartzo.

Figura 25. Espectro de SFG obtido in situ para (●) acetona e (■) acetato de etila sobre quartzo.

Figura 26. Espectro de SFG obtido em ar para acetona sobre quartzo.

Figura 27. Ilustração da formação de filmes de CAB sobre SiO₂/Si utilizando como solvente (a) acetona e (b) acetato de etila. Onde R em (b) pode ser os grupos OH ou COCH₃.

Figura 28. Valores médios da quantidade de lisozima adsorvida (Γ_{lisozima}) sobre os filmes de CAB e CMCAB depositados sobre APS e SiO₂/Si, a partir de soluções de lisozima (c = 1,0 g/L) preparadas em água pura (coluna vermelha), 0,01 mol/L NaCl (coluna verde), 0,10 mol/L NaCl (coluna azul), a 25°C e pH = 6,4 ± 0,1.

Figura 29. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de lisozima preparados em (a) água, Z = 6 nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 20 nm, sobre CAB/SiO₂/Si e para os filmes preparados em (c) água, Z = 8 nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 9 nm, sobre CAB/APS/SiO₂/Si.

Figura 30. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de lisozima preparados em (a) água, Z = 6 nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 12 nm, sobre CMCAB/ SiO₂/Si e para os filmes preparados em (c) água, Z = 4 nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 3 nm, sobre CMCAB/APS/ SiO₂/Si.

Figura 31. Valores médios da quantidade de BSA adsorvida, Γ_{BSA} (mg/m²), sobre os filmes de CAB e CMCAB depositados sobre APS e SiO₂/Si, a partir de soluções de lisozima (c = 1,0 g/L) preparadas em água pura (coluna vermelha), 0,01 mol/L NaCl (coluna verde), 0,10 mol/L NaCl (coluna azul), a 25°C e pH = 6,4 ± 0,1.

Figura 32. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de BSA preparados em (a) água, Z = 2,5 nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 9 nm, sobre CAB/ SiO₂/Si e para os filmes preparados em (c) água, Z = 2 nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, Z = 12 nm, sobre CAB/APS/ SiO₂/Si.

Figura 33. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de BSA preparados em (a) água, Z = 2,5 nm, e em (b) 0,1 mol/L

de NaCl, $Z = 5$ nm, sobre CMCAB/ SiO₂/Si e para os filmes preparados em (c) água, $Z = 2,5$ nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 7$ nm, sobre CMCAB/APS/ SiO₂/Si.

Figura 34. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de jacalina sobre (a) CAB/ SiO₂/Si, $Z = 6$ nm, (b) CAB/APS/ SiO₂/Si, $Z = 9$ nm e sobre (c) CMCAB/ SiO₂/Si, $Z = 3$ nm e (d) CMCAB/APS/ SiO₂/Si, $Z = 11$ nm.

Figura 35. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de concanavalina A sobre (a) CAB/ SiO₂/Si, $Z = 7$ nm, (b) CAB/APS/ SiO₂/Si, $Z = 12$ nm e sobre (c) CMCAB/ SiO₂/Si, $Z = 9$ nm e (d) CMCAB/APS/ SiO₂/Si, $Z = 10$ nm.

Figura 36. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 25$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 3$ nm, do filme de CAB preparado por spin coating em acetona (5g/L) sobre SiO₂/Si e (d) topográfica, $Z = 100$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 9$ nm, do filme de CMCAB preparado por spin coating em acetona (5g/L) sobre SiO₂/Si.

Figura 37. Quantidade de material adsorvido, Γ (mg/m²), das proteínas : lisozima, BSA, concanavalina e jacalina sobre os filmes lisos e rugosos de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si, a 25°C.

Figura 38. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 27$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, do filme de lisozima sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 30$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 3$ nm, para o filme de BSA sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L).

Figura 39. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 35$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, do filme de Concanavalina A sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 20$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, para o filme de jacalina sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L).

Figura 40. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 80$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 5$ nm, do filme de lisozima sobre

CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, Z = 80 nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, Z= 6 nm, para o filme de BSA sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L).

Figura 41. Imagens de AFM (1 x1) μm² : (a) topográfica, Z = 70 nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, Z = 5 nm, do filme de concanavalina A sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, Z = 70 nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, Z= 6 nm, para o filme de jacalina sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L).

Lista de Tabelas

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

Tabela 2. Viscosidade intrínseca ($[\eta]$), concentração crítica (C^*) e constante de Huggins (K_H) determinados através dos ajustes matemáticos para as soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona a 25°C. Os desvios obtidos nos valores são oriundos das medidas em triplicata da viscosidade das soluções poliméricas em ambos os solventes.

Tabela 3. Valores médios dos raios de giração (R_g) obtidos por SAXS para CAB e CMCAB nas soluções de acetona e acetato de etila.

Tabela 4. Relação entre as viscosidades das soluções de CMCAB preparadas em acetato de etila e em acetona, a 25°C, em diferentes concentrações.

Tabela 5. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de CMCAB preparados em acetona e acetato de etila nos diferentes tempos de recozimento e concentração.

Tabela 6. Ângulo de contato de avanço (θ_a), ângulo de contato de recesso (θ_r) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de CAB e CMCAB sobre SiO_2/Si e APS realizados com gotas de água.

Tabela 7. . Valores das energias superficiais dos líquidos usados no cálculo das componentes dispersiva e polar da energia superficial dos polímeros.

Tabela 8. Ângulos de contato de avanço obtidos para gotas de água e diidometano sobre filme de CAB e CMCAB sobre SiO_2/Si e APS. Os valores dos ângulos de contato para o filme de CAB sobre SiO_2/Si foram retirados da literatura [KOSAKA et al., 2007c].

Tabela 9. Valores da componente dispersiva γ_s^d e polar γ_s^p da energia superficial do CAB e CMCAB determinadas pelo modelo harmônico sobre diferentes superfícies.

Tabela 10. Valores da componente dispersiva γ_s^d e polar γ_s^p da energia superficial dos filmes de CAB preparado em acetato de etila e em acetona determinadas pelo modelo harmônico sobre SiO_2/Si .

Tabela 11. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para lisozima imobilizada sobre as superfícies de ésteres de celulose.

Tabela 12. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para a BSA imobilizada sobre os filmes de éster de celulose.

Tabela 13. Quantidade de material adsorvido, $\Gamma(\text{mg}/\text{m}^2)$, da jacalina e concanavalina A sobre os filmes de éster de celulose, a 25°C.

Tabela 14. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de jacalina e concanavalina A sobre as superfícies de ésteres de celulose.

Tabela 15. Características dos filmes de CAB e CMCAB utilizados para investigar o efeito da rugosidade (RMS) sobre a adsorção de biomoléculas. Onde: (a) filme de CAB adsorvido a partir de acetato de etila ($C = 1,5 \text{ g/L}$, ver item), (b) filme de CAB depositado por revestimento rotacional a partir de acetona ($C = 5 \text{ g/L}$), (c) filme de CMCAB adsorvido a partir de acetato de etila ($C = 1,5 \text{ g/L}$, ver item) e (d) filme de CMCAB depositado por revestimento rotacional a partir de acetona ($C = 5 \text{ g/L}$).

Tabela 16. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para as proteínas imobilizadas sobre os filmes rugosos de CAB e CMCAB preparados por spin coating em solução de acetona (5 g/L).

Lista de Abreviaturas

A_a: Área da região amorfa

A_c: Área da região cristalina

AFM: Microscopia de Força Atômica

BSA: Albumina do soro bovino

CAB: Acetato Butirato de Celulose

CMCAB: Acetato Butirato Carboximetil Celulose

D: Espessura média da camada de éster de celulose

DSac: Grau de substituição para o acetato

DSbu: Grau de substituição para o butirato

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

OH: Grau de substituição para a hidroxila

RMS: Rugosidade quadrática média

T_g: Temperatura de transição vítrea

T_m: Temperatura de fusão

W_{XRD}: Grau de cristalinidade calculado por difração de Raios-X

XRD: Difração de Raio-X

Lista de Símbolos

\overline{M}_n : Massa molar média numérica

χ^{po}_s : Energia de adsorção envolvida na adsorção do polímero no substrato

f_{oo} : Energia de interação solvente/solvente

f_{os} : Energia de interação solvente/substrato

f_{pp} : Energia de interação polímero/polímero

f_{ps} : Energia de interação polímero/substrato

γ^p : Componente polar da energia superficial

γ_{SL} : Energia interfacial entre o sólido e o líquido

γ^d : Componente dispersiva da energia superficial

γ_s : Energia superficial do sólido

γ_{LV} : Energia superficial do líquido

γ^d_s : Componente dispersiva da energia superficial do sólido

γ^d_{LV} : Componente dispersiva da energia superficial do líquido

γ^p_s : Componente polar da energia superficial do sólido

γ^p_{LV} : Componente polar da tensão superficial do líquido

k : Constante de Boltzmann

T : Temperatura

τ : Turbidez

Γ : Quantidade adsorvida de proteína

θ : Ângulo de contato

R_g : Raio de giração

ρ : Densidade

η : viscosidade da solução

ω : velocidade da rotação do spinner

ϕ : taxa de evaporação do solvente.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Fundamentação teórica da determinação da energia superficial de filmes poliméricos através de medidas de ângulo de contato	5
3. Objetivos	9
4. Materiais	10
5. Métodos	10
5.1 - Silanização das lâminas de silício	10
5.2 - Preparação dos filmes finos dos polímeros CAB e CMCAB por revestimento rotacional.....	11
5.3 - Isotermas de adsorção	12
5.4 - Adsorção de proteínas sobre os filmes finos de ésteres de celulose	12
5.5 - Medidas de viscosidade	13
5.6 - Espalhamento de raio - X a baixo ângulo (SAXS).....	13
5.7 - Difração de raio - X.....	14
5.8 - Elipsometria	15
5.9 - Microscopia de força atômica (AFM).....	17
5.10 - Medidas de ângulo de contato	18
5.11 - Espectroscopia vibracional por geração de soma de frequências (SFG)	19
5.12 - Atividade enzimática da lisozima.....	21
6. Resultados e Discussão	21
6.1 - Propriedades dos polímeros CAB e CMCAB em solução	21
6.2 - Caracterização dos filmes finos de CMCAB sobre SiO ₂ /Si	30
6.3 - Isotermas de adsorção de CAB e CMCAB sobre diferentes substratos	46
6.4 - Determinação da energia superficial de CAB e CMCAB	51
6.5 - Adsorção de lisozima sobre os filmes finos de CAB e CMCAB	64
6.6 - Adsorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre os filmes finos de CAB e CMCAB.....	47
6.7 - Adsorção de lectinas sobre os filmes finos de CAB e CMCAB	79
6.8 - Efeito da rugosidade dos filmes de CAB e CMCAB sobre a adsorção de proteínas....	88

7. Conclusões	99
8. Referências Bibliográficas	101

1. Introdução

A interação de proteínas com superfícies determinam o comportamento de uma grande variedade de processos de fundamental relevância para a áreas tecnológica e acadêmica. Entretanto, a adsorção de proteínas é um processo complexo, pois as proteínas são macromoléculas compostas por uma quantidade definida de aminoácidos. Devido à grande variedade das propriedades químicas desses aminoácidos incluindo carga, hidrofobicidade, carácter ácido/base, as proteínas exibirão distintos comportamentos dependendo do meio que se encontram. Vários estudos mostraram que diversos fatores influenciam o comportamento de adsorção das biomoléculas, tais como: a força iônica [BALDWIN, R. L., 1996; TSUMOTO et al., 2007] , pH [DIETERLE et al., 2008] a composição química da superfície [SIGAL, et al., 1998; YUAM, SUN, 2009] e temperatura [KOPAC et al., 2008].

A formação de filmes finos de polissacarídeos sobre superfícies sólidas tem uma significativa importância, devido principalmente à capacidade de aplicação desses filmes na imobilização de biomoléculas [CHARREYRE et al., 1997; WIEGAND et al., 1997] dando condições para o desenvolvimento de biossensores [DELAIR et al., 1999]. Para esta finalidade, superfícies de polissacarídeos têm se destacado em relação aos polímeros sintéticos, por serem biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis [SACKMANN, 1996].

O grande desafio no desenvolvimento de biossensores está em obter superfícies que favorecem a adsorção da proteína de forma que suas características de seletividade, especificidade e atividade catalítica sejam preservadas. Portanto, as propriedades

superficiais dos filmes poliméricos tais como morfologia, molhabilidade e energia superficial devem ser rigorosamente estudadas para assegurar o uso dos mesmos nas pretendidas aplicações tecnológicas.

Os métodos mais utilizados no preparo de filmes finos poliméricos e que posteriormente possibilitam controlar as propriedades superficiais dos filmes são: Langmuir-Blodget [SCHWARTZ,1997], revestimento rotacional [NORMAN et al., 2005], adsorção e automontagem (Layer-by-Layer) [DECHER, 1997].

Ésteres de celulose são polímeros derivados da celulose com maior número de aplicações tecnológicas. O interesse em converter celulose em ésteres de celulose surgiu por dois motivos: (i) a celulose decompõe abaixo do seu ponto de fusão, tornando impossível o processamento no estado fundido e (ii) a celulose é insolúvel em água e em muitos outros solventes por causa das intensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares [MARK; KROSCWITZ, 1986]. As propriedades químicas dos ésteres de celulose dependem do tamanho, do tipo de substituinte e do grau de substituição dos grupos éster ligados à cadeia, visto que existem na celulose três hidroxilas que podem sofrer uma reação de esterificação [EDGAR et al., 2001].

Estes derivados de celulose são largamente utilizados em formulações de tintas e revestimentos à base de solventes orgânicos para melhorar as propriedades de fluxo (viscosidade), a capacidade de polimento, estabilidade a radiação UV, resistência ao amarelecimento, resistência a fissuras no filme, dispersão dos pigmentos. Dentre os ésteres de celulose, os que são mais utilizados em revestimentos são acetato de celulose (CA), propionato acetato de celulose (CAP) e butirato acetato de celulose (CAB). Na formulação de revestimentos metálicos para a indústria automotiva, a presença de CAB ajuda na orientação paralela das partículas metálicas [EDGAR et al., 2001]. No segmento de tintas

decorativas o CAB tem sido usado como compatibilizante e agente promotor de retenção de cor, flexibilidade e resistência à umidade [EDGAR et al., 2001].

Na literatura encontram-se estudos sobre a adesão de proteínas sobre membranas de ésteres de celulose [MURATA, TANIOKA, 1997; MURTINHO et al., 1998]. Entretanto, existem poucos trabalhos sobre a formação de filmes de ésteres de celulose e de uso como biofilmes para adsorção seletiva de proteínas. Recentemente, foi observado no nosso grupo de pesquisa [KOSAKA et al., 2007a] que filmes finos de CA, CAP e CAB poderiam ser aplicados como substratos na imobilização de enzimas. A lipase, uma enzima usada na indústria alimentícia e que catalisa reações de polimerização de poliésteres e policarbonatos, foi imobilizada sobre os filmes finos desses ésteres e apresentou uma atividade catalítica maior do que livre em solução. Além disso, os substratos podiam ser reutilizados até 3 vezes que a lipase não perdia a sua atividade. Estes resultados mostraram que os ésteres de celulose podem ser materiais promissores para a imobilização de biomoléculas.

O acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) é um éster de celulose insolúvel em água, mas solúvel em solventes como acetato de etila, metanol, acetona [EDGAR et al., 2001; EDGAR, 2007] que reúne duas características em um só material: o caráter hidrofílico dos grupos acetato e carboximetil e o caráter hidrofóbico devido ao radical butirato. O CMCAB pode ser obtido a partir da esterificação de carboxialquil celulose [EDGAR et al., 2001]. A diferença na estrutura química entre o CMCAB e o éster de celulose CAB é a presença do grupo carboximetil (CH_2COOH) como é mostrado na Figura 1.

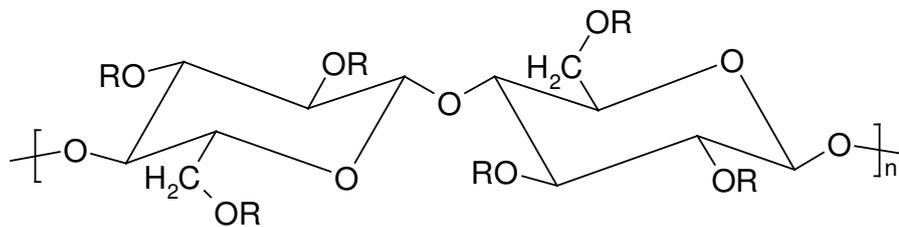


Figura 1. Representação da estrutura química do acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) onde R = H, COCH₂CH₂CH₃, COCH₃ e/ou R = CH₂COOH e do acetato butirato celulose (CAB) onde R = H, COCH₂CH₂CH₃ e/ou COCH₃.

As patentes encontradas sobre CMCAB focam aplicações tecnológicas tais como a aplicação em pinturas automotivas [WALKER et al., 2002], na dispersão de materiais hidrofóbicos em solução aquosa, além de seu uso como aditivo em tintas dando mais durabilidade à impressão da mesma [OBIE, 2004; BAUER, 2005] e mais recentemente, o CMCAB está sendo usado como matriz para formulações farmacêuticas [EDGAR, 2007].

Dentre as referências, nenhuma reporta estudos sobre formação, caracterização e a aplicação de filmes finos de CMCAB como substratos para processos de adsorção de biomoléculas. Por esta razão, este trabalho explorou a obtenção de filmes finos de CMCAB e a aplicação destes filmes como suportes para imobilização de proteínas. Foram escolhidas quatro proteínas com características diferenciadas. A lisozima é uma enzima com ponto isoelétrico alto (pI = 11) e função bactericida [FRANCK, 1992], a albumina de soro bovino é uma proteína globular com larga aplicação no desenvolvimento de kits de diagnósticos [CARTER, HO, 1994], a concanavalina A é uma glicoproteína que interage com a glicose ou manose, com alto poder coagulante e a jacalina é outra glicoproteína aglutinante, porém se liga à galactose [BREWER et al., 1983; KABIR, 1998;].

2. Fundamentação teórica da determinação da energia superficial de filmes poliméricos através de medidas de ângulo de contato

Medidas de ângulo de contato é uma técnica bem conhecida e útil para a caracterização de superfícies sólidas. Uma importante aplicação das medidas de ângulo de contato é avaliação da energia superficial de uma superfície sólida (γ_s) [ADAMSON, 1990; BUTT; GRAF; KAPPL, 2003].

Os líquidos tendem a assumir formas que tornam mínima a sua área superficial, de modo que o número máximo de moléculas fica no interior da fase líquida envolvidas pelas moléculas vizinhas e com elas interagindo. Por isso, gotículas de líquidos tendem a ser esféricas, pois nessa forma adquire uma menor área superficial para um dado volume.

Ao colocarmos uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida plana ela poderá espalhar-se completamente sobre toda a superfície ou permanecer como uma gota com um certo ângulo de contato com a superfície sólida (Figura 2), o qual corresponde à energia mínima do sistema:

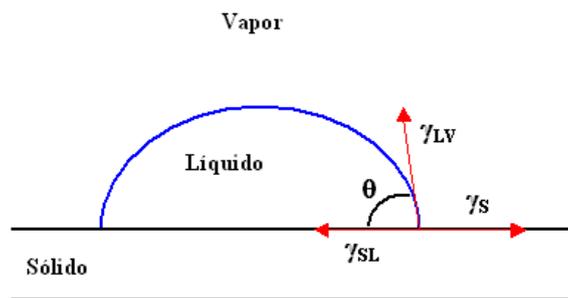


Figura 2. Ilustração de uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida sendo θ o ângulo de contato com a superfície, γ_{LV} é a energia superficial do líquido, γ_{SL} é a energia interfacial entre o líquido e o sólido e γ_s é a energia superficial do sólido.

Considerando que as diversas forças superficiais podem ser representadas por tensões superficiais, atuando na direção da superfície, Young [Young, 1805] mostrou que para uma superfície perfeitamente plana e homogênea:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (1)$$

onde γ_S é a energia superficial do sólido, γ_{LV} é a energia superficial do líquido, γ_{SL} é a energia interfacial entre o sólido e o líquido e θ o ângulo de contato com a superfície.

Um problema é encontrado quando se tenta calcular γ_S a partir da equação 1, uma vez que γ_{SL} é desconhecido e não pode ser medido diretamente. O ângulo de contato θ pode ser medido e γ_{LV} pode ser medido pelo método do anel de Du Noüy ou placa de Wilhelmy ou obtido a partir de dados da literatura.

A equação de Dupré (equação 2) relaciona o trabalho de adesão na interface sólido-líquido (W_{SL}) com γ_S , γ_{SL} e γ_{LV} [ADAMSON, 1990]:

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad (2)$$

A combinação da equação de Young (equação 1) com a equação de Dupré (equação 2) resulta em:

$$\gamma_{LV} (1 + \cos \theta) = W_{SL} \quad (3)$$

Fowkes (1964) considerou que a energia superficial total de uma substância é formada por componentes que correspondem aos diferentes tipos de interações intermoleculares [ADAMSON, 1990].

$$\gamma^{total} = \gamma^d + \gamma^p \quad (4)$$

onde os sobrescritos d e p correspondem às interações dispersiva e polar, respectivamente.

A equação de Good, Girifalco e Fowkes [Adamson 1990] expressa a contribuição dos diferentes tipos de interações intermoleculares e o trabalho de adesão:

$$W_{SL} = 2 \sqrt{\left(\gamma_S^d \gamma_{LV}^d\right)} + 2 \sqrt{\left(\gamma_S^p \gamma_{LV}^p\right)} \quad (5)$$

Combinando as equações (3) e (5) obtém-se a equação geométrica [Adamson, 1990; WU, 1982]

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2 \left[\left(\gamma_S^d \gamma_{LV}^d\right)^{1/2} + \left(\gamma_S^p \gamma_{LV}^p\right)^{1/2} \right] \quad (6)$$

Outra aproximação da equação de Young se baseia no modelo harmônico [WU, 1982]:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 4 \left(\frac{\gamma_S^d \gamma_{LV}^d}{\gamma_S^d + \gamma_{LV}^d} + \frac{\gamma_S^p \gamma_{LV}^p}{\gamma_S^p + \gamma_{LV}^p} \right) \quad (7)$$

Se as medidas de ângulo de contato forem feitas com pelo menos dois líquidos de γ_{LV}^d e γ_{LV}^p conhecidas sobre as superfícies poliméricas, é possível resolver a equação 6 (modelo geométrico) ou equação 7 (modelo harmônico) e calcular as componentes dispersiva (γ_S^d) e polar (γ_S^p) para o sólido [BOUALI et al., 1998; SHIMIZU; DEMARQUETTE, 2000; WU, 1982; WU, 1971]. A partir desses métodos é possível calcular primeiro a componente dispersiva γ_S^d da energia superficial a partir do ângulo de

contato com líquidos apolares, como o diiodometano, e então a componente polar γ_s^p determinada a partir de medidas de ângulo de contato para um líquido polar (água).

Não há nenhum argumento teórico para a escolha do modelo (geométrico ou harmônico) que deve ser usado. Entretanto, Wu (1982) mostrou que o modelo harmônico descreve experimentalmente melhor as interações entre os líquidos testados e a superfície de polímeros. Portanto, este será o modelo adotado aqui para calcular a energia superficial dos polímeros. Em algumas séries de medidas verificamos que a diferença de valores encontrados quando se aplica o modelo geométrico e o harmônico é da ordem de 10%, o que está dentro do erro experimental.

3. Objetivos

- 1) Estudar as propriedades em solução dos polímeros CAB e CMCAB e inferir sobre o efeito da presença do grupo carboximetil do polímero CMCAB sobre as suas propriedades.
- 2) Obter filmes de CMCAB pela técnica de revestimento rotacional e avaliar o efeito do solvente e do tratamento térmico nas características dos filmes.
- 3) Estimar a energia superficial de filmes de CAB e CMCAB preparados por revestimento rotacional sobre diferentes substratos.
- 4) Investigar a adsorção de diferentes proteínas sobre os filmes de CAB e CMCAB.

4. Materiais

Placas de silício (SiO_2/Si) adquiridas da Silicon Quest (Califórnia, EUA) foram usadas como substrato. As placas de silício foram usadas nas dimensões de $1 \times 1 \text{ (cm}^2\text{)}$ para experimentos de obtenção de filmes finos. Os solventes utilizados, acetona, acetato de etila, diidometano são de grau analítico. Os polissacarídeos acetato butirato celulose (CAB) e acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) foram gentilmente cedido pela Eastman do Brasil (Tabela 1). O reagente 3-aminopropiltriétoxissilano (APS) foi adquirido da Sigma-Aldrich. As proteínas lisozima, albumina do soro bovino (BSA), concanavalina A e jacalina foram adquiridas da Sigma-Aldrich e utilizadas sem purificação prévia.

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

Polímero	Código	\overline{M}_n (g/mol)	T_g (°C)	T_m (°C)	DS_{AC}	DS_{BU}	DS_{CM}	OH
Acetato butirato carboximetil celulose	CMCAB 641-0,2	20,000	135	145-160	0,44	1,64	0,33	0,59
Acetato butirato celulose	CAB 381	20,000	125	160	0,95	1,65	-	0,4

Dados fornecidos pelo fabricante (Eastman).

5. Métodos

5.1 Silanização das lâminas de silício

As superfícies das lâminas de silício foram modificadas, seguindo a metodologia encontrada na literatura [Petri, et al., 1999], por meio da introdução de grupos amino após a reação de silanização com 3-aminopropiltriétoxissilano (APS). A figura 3 ilustra a silanização da superfície do silício. As lâminas, previamente lavadas e secas, foram

deixadas em contato a 60°C com uma solução de APS (1%) em tolueno. Os tempos reacionais foram de 20s para a silanização com APS. Em seguida as lâminas foram lavadas com tolueno de modo a eliminar os resíduos dos grupos não ligados à superfície da lamina de silício. O tratamento térmico das camadas de APS foi feito em uma estufa a vácuo a 150°C e a 170°C por 15h.

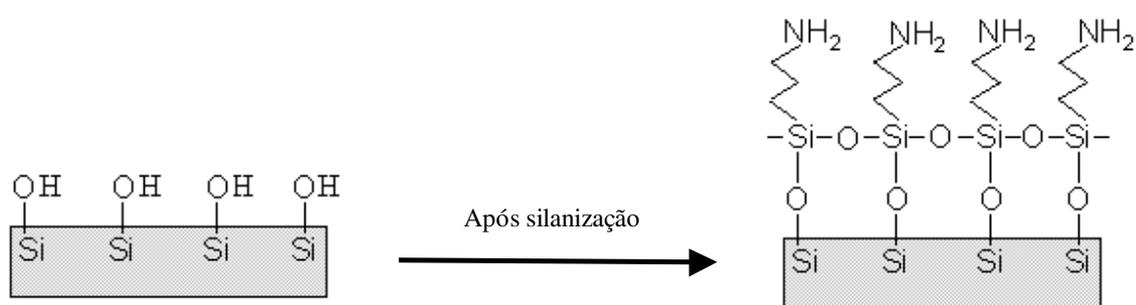


Figura 3. Ilustração da silanização das lâminas de silício (SiO₂/Si) com APS.

5.2 Preparação dos filmes finos dos polímeros CAB e CMCAB por revestimento rotacional

Soluções de CMCAB foram preparadas em acetato de etila e em acetona na concentração variando de 5 a 20 g/L para preparar filmes sobre wafers de silício por spin-coating (revestimento rotacional). Uma única solução de CAB em acetona (5 g/L) foi usada para preparar o filme sobre wafer de silício. Filmes de CAB e CMCAB sobre lâminas de silício silanizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APS) foram obtidas por spin coating somente em soluções preparadas com acetato de etila na concentração de 20 g/L. As lâminas de silício e as silanizadas com APS foram submetidas a uma rotação de 3000 rpm

durante 30s num equipamento Headway a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. O recozimento dos filmes de CMCAB preparados em acetato de etila e acetona sobre lâminas de silício foi feito em uma estufa a vácuo a 150°C em diferentes tempos (4h, 15h, 60h e 168h). O recozimento dos filmes de CAB e CMCAB sobre APS foi feito a 170°C para o CAB e a 150°C para o CMCAB por 15h.

5.3 Isotermas de adsorção

Isotermas de adsorção dos polímeros CAB e CMCAB sobre dois substratos (SiO_2/Si , APS) foram obtidas a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ variando-se a concentração dos polímeros de 0,02 a 2,0 g/L nas soluções de acetato de etila e acetona. O tempo de adsorção foi de 24 horas para que os sistemas alcançassem o equilíbrio termodinâmico. A espessura média da camada polimérica adsorvida sobre os substratos SiO_2/Si e APS foi determinada através de medidas de elipsometria. Os experimentos de dessorção foram realizados deixando os substratos adsorvidos com os polímeros em contato com os solventes puros por 24h.

5.4 Adsorção de proteínas sobre os filmes finos de ésteres de celulose

Os substratos cobertos com os filmes finos de ésteres de celulose foram imersos em soluções das proteínas lisozima, albumina de soro bovino, concanavalina A na concentração de 1g/L e jacalina na concentração de 0,15 g/L, a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 6,4$ por 17 horas. As soluções de concanavalina A foram preparadas na presença de CaCl_2 (0,01 mol/L) e MnCl_2 (0,01 mol/L). O efeito da força iônica sobre a adsorção da lisozima e albumina de soro bovino (BSA) foi investigada preparando soluções dessas proteínas em 0,01 mol/L e 0,1 mol/L de NaCl. Após a adsorção, os substratos foram removidos das soluções, lavados com água destilada e secos com jatos de N_2 . As amostras foram

caracterizadas por elipsometria, microscopia de força atômica (AFM) e ângulo de contato. Os experimentos de dessorção foram realizados deixando os substratos adsorvidos com as proteínas em contato com água pura ou com solução de NaCl na concentração de 0,01 mol/L ou 0,1 mol/L por 17h.

5.5 Medidas de viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas em um equipamento automático (AVS350 Schott) usando um viscosímetro de Ubbelohde calibrado. As soluções de CAB e CMCAB foram preparadas em acetona e em acetato de etila com concentrações variando de 1 g/L a 15 g/L. As soluções foram deixadas imersas por 10 min no banho termostaticado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para atingirem o equilíbrio térmico e em seguida foram feitas as medidas em triplicata.

5.6 Espalhamento de raio - X a baixo ângulo (SAXS)

Experimentos de SAXS foram realizados no laboratório nacional de luz síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) à temperatura ambiente de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, no comprimento de onda $\lambda = 1,608 \text{ \AA}$. As soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona foram preparadas nas concentrações de 5 g/L a 20 g/L.

A intensidade $I(q)$ de SAXS para soluções isotrópicas de partículas esféricas monodispersas é dado por [KOTLARCHYCK, CHEN, 1983]:

$$I(q) = k P(q) \cdot S(q) \quad (8)$$

onde

$$k = y \cdot n_p (\Delta\rho)^2 V^2 \quad (9)$$

onde y é um fator relacionado aos efeitos instrumentais, n_p corresponde a densidade numérica de partículas, $\Delta\rho$ é o contraste de densidade eletrônica entre a partícula espalhadora e o meio e V é o volume da partícula espalhadora. $P(q)$ na equação 1 é o fator forma da partícula e $S(q)$ é o fator de interferência interpartículas, $q=4\pi\text{sen}\theta/\lambda$ é o vetor espalhamento e 2θ é o ângulo de espalhamento.

O valor do raio de giração de uma macromolécula (R_g) pode ser obtido a partir das curvas de espalhamento a baixo q através do coeficiente angular da relação $\ln I(q) \times q^2$, como mostrado pela equação 10 (gráfico de Guinier) [GUINIER, FOURNET, 1995]. Desde que a condição $qR_g < \sim 1$ seja satisfeita.

$$I(q) = k \exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (10)$$

5.7 Difração de raio - X

O difratograma do CMCAB foi obtido em um equipamento Rigaku Miniflex XDR (30kV, 15mA) instalado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP. Os padrões de difração de raios-x foram obtidos com uma radiação monocromática $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$). O grau de cristalinidade do acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB) foi calculado através da equação:

$$W_{\text{XRD}} (\% \text{ cristalinidade}) = [A_c / (A_c + A_a)] \times 100 \quad (11)$$

onde A_a e A_c correspondem às áreas calculadas para as regiões amorfas e cristalinas [MARK; KROSCWITZ, 1986].

5.8 Elipsometria

A elipsometria consiste em medir a mudança do estado de polarização da luz após a reflexão de um feixe de luz, a partir de uma superfície isotrópica refletora. As medidas de elipsometria foram realizadas utilizando o elipsômetro DRE – ELX02 (Ratzeburg, Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) ajustado em um ângulo de incidência de $70,0^\circ$ que cobre uma área superficial de aproximadamente 3 mm^2 da amostra em análise, a temperatura ambiente. Para a interpretação dos dados, pode-se utilizar um modelo de multicamadas formado pelo substrato, uma camada desconhecida e o meio externo. A espessura (d_x) e o índice de refração (n_x) da camada desconhecida podem ser calculados através das variações de fase (Δ) e amplitude (Ψ) relativas à radiação incidente, das relações de Drude e Fresnel, da equação fundamental da elipsometria (equação 12) e de cálculos iterativos através de matrizes de Jones [AZZAM; BASHARA, 1979]:

$$e^{i\Delta} \tan \Psi = R_p/R_s = f(n_k, d_k, \lambda, \phi) \quad (12)$$

onde R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total para as ondas paralela e perpendicular e dependem do ângulo de incidência ϕ , do comprimento de onda λ da radiação, do índice de refração e da espessura de cada camada do modelo, n_k , d_k . A partir dos ângulos elipsométricos Δ e Ψ e de um modelo de multicamadas formado pelo silício, o óxido de silício, a camada de CMCAB ou CAB e ar é possível determinar somente a espessura da camada de CMCAB ou CAB. Inicialmente, a espessura da camada de SiO_2 das lâminas foi

determinada em ar, considerando o índice de refração para o Si como $\tilde{n} = 3.88 - i0.018$ [PALICK, 1985] e sua espessura como infinita. Para o meio externo (ar) o índice de refração foi considerado como 1,00. Como a camada de SiO₂ nativa é muito fina utiliza-se $n = 1,462$ [PALICK, 1985] para calcular sua espessura, que é de aproximadamente $(1,9 \pm 0,2)$ nm. Após a caracterização, as placas de silício foram usadas na silanização com 3-aminopropiltriétoxissilano (APS) e para a obtenção das isotermas de adsorção. A espessura da camada de APS foi determinada no ar considerando os índices de refração de $n = 1,424$ [PETRI, et al., 1999]. A espessura média encontrada para a camada silanizada com APS foi de $(0,9 \pm 0,1)$ nm. A espessura da camada de CAB e CMCAB foi calculada considerando o índice de refração nominal de $n = 1,48$ para ambos os polímeros, típico de ésteres de celulose [KOSAKA, et al., 2007a] para todos os filmes de CAB e CMCAB. A espessura da camada protéica foi calculada considerando o índice de refração nominal de $n = 1,52$ para lisozima, BSA, concanavalina A e jacalina, este valor é típico de proteínas [MALMSTEN, 2000]. A quantidade de polímero ou proteína adsorvido, Γ (mg/m²), pode ser calculada através da equação [ORTEGA-VINUESA; TENGVALL; LUNDSTROM, 1998].

$$\Gamma = d \cdot \rho \quad (13)$$

onde d é a espessura da camada de polímero ou proteína adsorvido e ρ é densidade dos polímeros ou das proteínas. Neste caso, para os polímeros $\rho = 1,20$ g/cm³ (segundo fabricante) e para as proteínas $\rho = 1,37$ g/cm³.

5.9 Microscopia de força atômica (AFM)

A caracterização da superfície dos filmes do CAB e CMCAB e das proteínas imobilizadas sobre o filme desses polímeros foi realizada através de imagens obtidas por medidas de AFM, utilizando o equipamento Molecular Imaging Pico LE Microscope. As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente, a temperatura ambiente, usando cantilevers de silício com frequência de ressonância próxima de 300 KHz. As imagens apresentadas neste trabalho se referem a áreas de varredura de $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$ a $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$ com resolução de 512×512 pixels. O processamento das imagens e a determinação da rugosidade “roughness mean square” (RMS) foram realizadas utilizando o software PicoScan 5.3.2. A rugosidade média (RMS) é definida como o desvio padrão das alturas de uma determinada área do filme (equação 14) e está diretamente relacionada com a topografia do filme [39]:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_i^N (Z_i - Z_m)^2}{N}} \quad (14)$$

onde N é o número de pontos de uma determinada área, Z_i é uma determinada altura e Z_m é a altura média da área.

As espessuras dos filmes de CMCAB foram determinadas por AFM fazendo-se um risco nos filmes e em seguida foram medidos a profundidade do degrau através do programa PicoScan 5.3.2, como mostrado na Figura 4. As medidas foram feitas antes e depois do recozimento em triplicata.

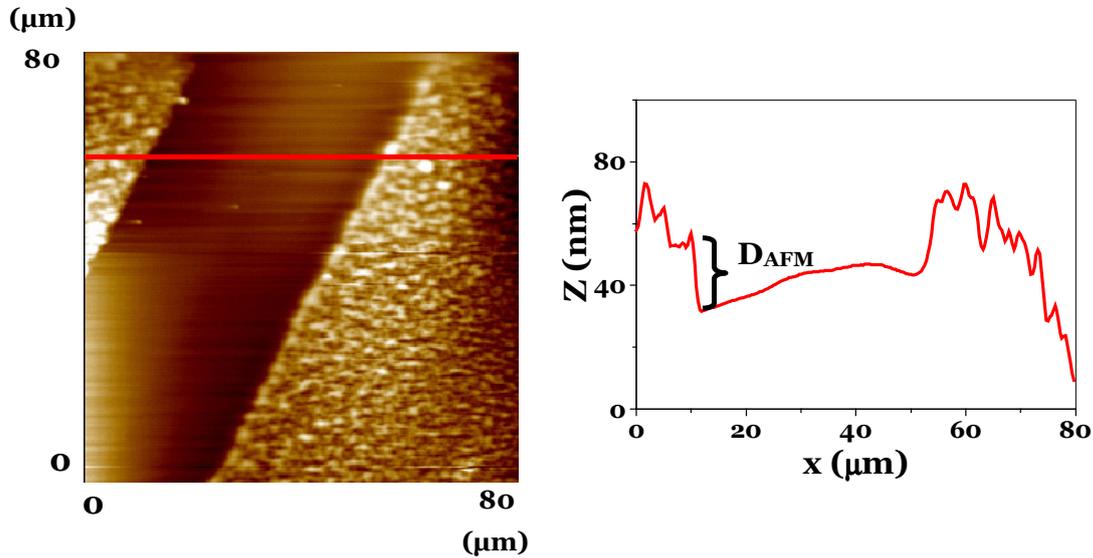


Figura 4. Imagem de AFM (80×80) μm^2 do ilustrando a medida da espessura do filme de CMCAB, a linha vermelha é a seção transversal.

5.10 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram obtidas pelo método da gota séssil, numa montagem construída no laboratório, composta por uma câmera digital Sony, conectada a um computador, como mostra a Figura 5. Gotas de água de 8 μL e 4 μL foram usadas para os ângulos de avanço (θ_A) e recesso (θ_R), respectivamente. A histerese no ângulo de contato ($\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$) nos dá uma idéia da rugosidade da superfície e da heterogeneidade química da superfície [ADAMSON, 1990]. Pelo menos três amostras de cada composição foram analisadas para os filmes poliméricos e após a adsorção das proteínas sobre os filmes ultrafinos de ésteres de celulose.

Para a determinação de energia superficial dos ésteres de celulose (γ_s) os líquidos usados foram: diiodometano e água. Gotas de 8 μL foram usadas para os ângulos $\theta_{\text{Diiodometano}}$,

e $\theta_{\text{Água}}$. Somente filmes poliméricos muito lisos foram utilizados para a determinação de γ_s .

As medidas foram feitas em triplicata.

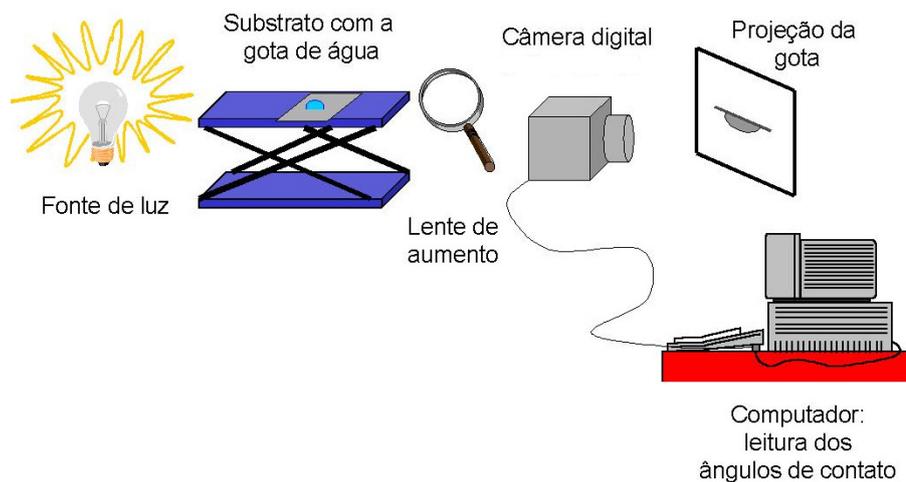


Figura 5. Ilustração da montagem experimental utilizada para a medição de ângulo de contato dos filmes finos.

5.11 Espectroscopia vibracional por geração de soma de frequências (SFG)

A espectroscopia SFG é uma técnica de ótica não-linear baseada na interação de dois fótons na superfície. Na espectroscopia SFG, os fótons de soma de frequências ($\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{IR}} + \omega_{\text{VIS}}$) são gerados pela interação de dois feixes de laser pulsado, um feixe infravermelho sintonizável de frequência ω_{IR} e um feixe visível de frequência fixa ω_{VIS} . Medindo-se o sinal de SFG em função da frequência do feixe de infravermelho obtém-se um espectro vibracional das moléculas na interface [HOLLER et al., 2009]. A aplicação

desta técnica permite a investigação de espectros vibracionais de moléculas presentes em uma determinada interface.

Os espectros de SFG foram obtidos em um comercial espectrômetro (EKSPLA) equipado com um laser pulsado (28ps) de Nd³⁺:YAG e com comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm e que excita uma unidade geradora de harmônicos. Essa unidade produz feixes de 2° harmônico a $\lambda = 532$ nm (visível) e de 3° harmônico a $\lambda = 355$ nm (UV) além de permitir um sinal de saída no comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm (fundamental). Este fundamental e o 3° harmônico excitam um oscilador/amplificador paramétrico óptico que será responsável pela geração do feixe infravermelho (IR) que incidirá sobre a amostra juntamente com o feixe no visível ($\lambda = 532$ nm). Os ângulos de incidência são de 51° o feixe na região do IR e 60° para o feixe na região do visível. O SFG sinal é coletado por um conjunto monocromador/fotomultiplicadora em função da frequência do feixe do infravermelho. A aquisição de dados é feita pelo computador através do programa LABVIEW. Neste estudo os dados foram obtidos na região do IR entre 1600 e 1800 cm⁻¹ e entre 2800 e 3000 cm⁻¹. A combinação da polarização utilizada em todas as medidas foi a ssp. Onde s e p indicam que a luz está polarizada perpendicularmente e paralelamente à superfície, respectivamente. O primeiro s, o segundo s e por último p representam a polarização da luz SFG, do visível e do infravermelho, respectivamente.

Os filmes de ésteres de celulose CAB e CMCAB foram adsorvidos sobre quartzo na concentração de 5 g/L utilizando como solvente acetona e acetato de etila. Após 21h de adsorção o substrato (quartzo) foi retirado das soluções dos polímeros, lavados com os respectivos solventes e secos com N₂. Em seguida foram obtidos os espectros de SFG em ar. Para as medidas *in situ* foi utilizada uma cela de teflon. Todas as medidas foram realizadas a (24 ± 1)°C.

5.12 Atividade enzimática da lisozima

A ação antimicrobiana da lisozima livre em solução (3 g/L) e imobilizada sobre os filmes de éster de celulose foi avaliada usando uma dispersão aquosa de *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), 1,33 g/L, como substrato a 25°C. A atividade enzimática foi medida pelo decréscimo da turbidez da dispersão ($\Delta\tau$) [BERGMEYER, 1984], segundo a equação 15, determinado pela transmitância a 650 nm utilizando um espectrofotômetro Beckmann Coulter DU-600 a 25°C, após 1h da dispersão com a lisozima pura ou com lisozima imobilizada sobre os filmes de éster de celulose.

$$\Delta\tau = (\tau - \tau_0) \times 100 \quad (15)$$

onde τ é a turbidez em um determinado tempo e τ_0 é a turbidez da dispersão da bactéria antes da lisozima ser adicionada à dispersão. Quando maior $\Delta\tau$, maior é a ação bactericida da lisozima.

6. Resultados e Discussão

6.1 Propriedades dos polímeros CAB e CMCAB em solução

O efeito observado quando um polímero é adicionado a um solvente é dependente de sua concentração, massa molar e conformação de sua cadeia. Sendo assim, a viscosimetria é um método adequado para obter informações sobre o tamanho e a forma das macromoléculas em solução. A análise da viscosidade de uma solução polimérica diluída

resulta na obtenção de parâmetros relativos à dimensão da macromolécula isolada. A viscosidade relativa, η_{rel} , determina a contribuição do soluto (no caso, polímero) sobre a viscosidade da solução, ou seja, pode ser considerada como o aumento na viscosidade da solução (η), devido a presença do polímero, em relação à viscosidade do solvente puro (η_0).

$$\eta_{rel} = \eta/\eta_0 \quad (16)$$

A viscosidade reduzida, $\eta_{red} = \eta_{esp}/c$, é uma relação que expressa a viscosidade específica, $\eta_{esp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0$, por unidade de concentração. Quando este parâmetro é extrapolado à diluição infinita, obtém-se um valor de viscosidade (viscosidade intrínseca) em condições onde as moléculas do polímero podem ser consideradas isoladas uma das outras, sendo solvatadas apenas pelas moléculas do solvente.

A partir da medida da viscosidade específica é possível obter a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, por meio de uma extrapolação gráfica à diluição infinita, como mostrada pela equação 17.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp} / c \quad (17)$$

onde η_{sp} é a viscosidade específica e C é a concentração do polímero.

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, está diretamente relacionada com o volume hidrodinâmico do polímero em um dado solvente. Quanto maior a solvatação, maior será o volume hidrodinâmico e conseqüentemente maior será o valor de $[\eta]$.

A concentração crítica de entrelaçamento, C^* , é o inverso da viscosidade intrínseca (equação 17), que corresponde a concentração a partir do qual ocorre o entrelaçamento entre as cadeias poliméricas em um dado solvente. Em concentrações mais baixas do que C^* os novos poliméricos estão livres para se movimentarem individualmente (regime diluído), acima dessa concentração os novos se entrelaçam mudando todo o arranjo molecular em solução.

$$C^* = \frac{1}{[\eta]} \quad (18)$$

Algumas relações têm sido propostas para determinar a viscosidade intrínseca a partir da medida de viscosidade uma solução polimérica diluída. Um dos modelos mais usados é a equação desenvolvida por Huggins (equação 19) [HUGGINS, 1942].

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] + K_H[\eta]^2 c \quad (19)$$

Neste modelo uma relação linear entre a viscosidade específica e a concentração do soluto (no caso, polímero) deve ser encontrada. Através do coeficiente angular da equação obtida, é possível calcular a constante de Huggins (K_H). Esta constante fornece informações sobre as interações entre polímero e solvente. Quanto menor for o seu valor, melhor deverá ser o solvente (bom solvente), ou seja, mais solvatada estará a macromolécula [SAKAI, 1968].

Para a determinação dos parâmetros viscosimétricos dos polímeros CMCAB e CAB as soluções foram preparadas em regime diluído e em dois tipos de solventes, acetona e acetato de etila. A Figura 6 apresenta a variação entre a viscosidade reduzida (η_{red}) com a concentração (C) desses dois polímeros nos dois solventes utilizados.

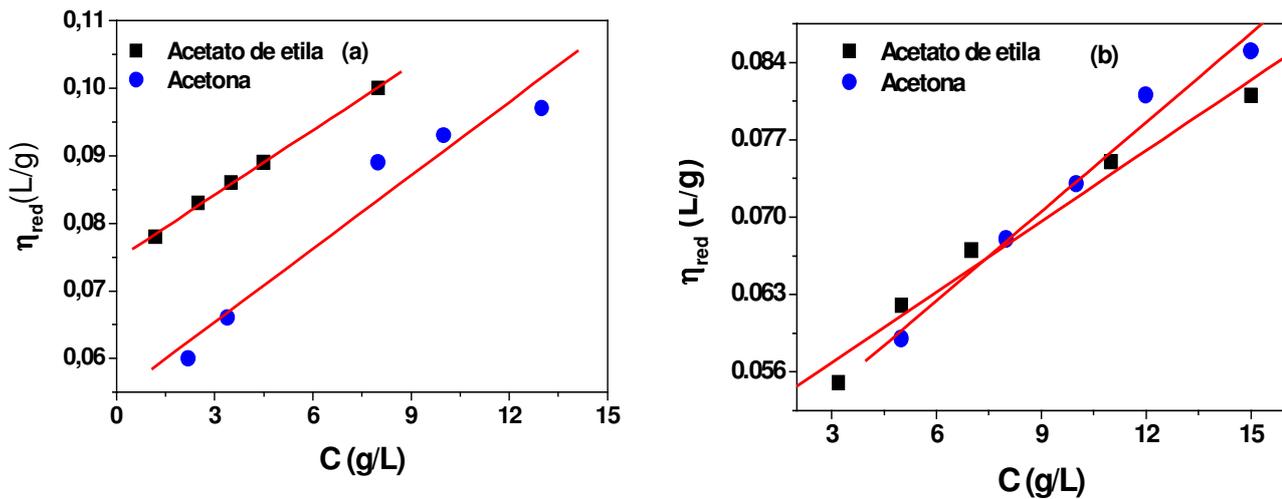


Figura 6. Viscosidade reduzida das soluções de (a) CAB e (b) CMCAB em (■) acetato de etila e em (●) acetona em função da concentração dos polímeros, a 25°C.

Através dos ajustes lineares para a dependência da viscosidade reduzida com a concentração para ambos os polímeros, foi possível obter $[\eta]$, C^* e K_H modelo de Huggins para se determinar os parâmetros viscosimétricos. As equações dos ajustes lineares são mostradas abaixo para CAB e CMCAB.

- Ajustes para CAB:

Acetato de etila : $\eta_{red} \text{ (L/g)} = 0,07 \text{ (L/g)} + 0,0032 \text{ (L}^2\text{/g}^2) C \quad (\mathbf{R} = 0,99) \quad (20)$

Acetona : $\eta_{red} \text{ (L/g)} = 0,054 \text{ (L/g)} + 0,0036 \text{ (L}^2\text{/g}^2) C \quad (\mathbf{R} = 0,97) \quad (21)$

- Ajustes para CMCAB:

$$\text{Acetato de etila : } \eta_{\text{red}} (\text{L/g}) = 0,05(\text{L/g}) + 0,0021(\text{L}^2/\text{g}^2) C \quad (\mathbf{R} = 0,99) \quad (22)$$

$$\text{Acetona : } \eta_{\text{red}} (\text{L/g}) = 0,046(\text{L/g}) + 0,0027(\text{L}^2/\text{g}^2) C \quad (\mathbf{R} = 0,99) \quad (23)$$

A Tabela 2 mostra os parâmetros $[\eta]$, C^* e K_H calculados através dos ajustes para as soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona.

Tabela 2. Viscosidade intrínseca ($[\eta]$), concentração crítica (C^*) e constante de Huggins (K_H) determinados através dos ajustes matemáticos para as soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona a 25°C. Os desvios obtidos nos valores são oriundos das medidas em triplicata da viscosidade das soluções poliméricas em ambos os solventes.

Polímeros	Acetato de etila			Acetona		
	$[\eta]$ (L/g)	C^* (g/L)	K_H	$[\eta]$ (L/g)	C^* (g/L)	K_H
CAB	$0,070 \pm 0,005$	$14,3 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,05$	$0,054 \pm 0,005$	$18,5 \pm 0,2$	$1,23 \pm 0,05$
CMCAB	$0,050 \pm 0,005$	20 ± 1	$0,84 \pm 0,02$	$0,046 \pm 0,005$	$21,7 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,1$

Pode-se notar na Tabela 2 que o melhor solvente para os polímeros CAB e CMCAB é o acetato de etila. As constantes de Huggins obtidas para as soluções dos polímeros preparadas neste solvente são menores do que aquelas obtidas a partir de soluções de acetona. Este solvente (acetato de etila) tem, portanto, melhor interação (maior solvatação) com as cadeias poliméricas. Os valores de $[\eta]$ e C^* para o CMCAB não apresentaram uma diferença significativa entre os solventes. Entretanto para o CAB, a diferença foi mais acentuada mostrando que a melhor solubilidade em acetato de etila é também observada pelo maior valor de $[\eta]$ e pelo menor valor da concentração crítica (C^*). Nota-se também que o grupo carboximetil (CM) do CMCAB contribuiu para aumentar os valores de C^* em relação ao CAB em ambos os solventes.

Medidas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas para complementar o estudo dos polímeros CAB e CMCAB em solução diluída. As curvas experimentais de SAXS obtidas para as soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona são mostradas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Todas as curvas apresentadas são caracterizadas por um forte espalhamento a baixos valores do vetor de espalhamento q e decrescem para altos valores do mesmo. Nota-se também que não houve efeito da concentração e dos solventes (acetato de etila e acetona) usados sobre o perfil das curvas de SAXS para as soluções de CAB e CMCAB.

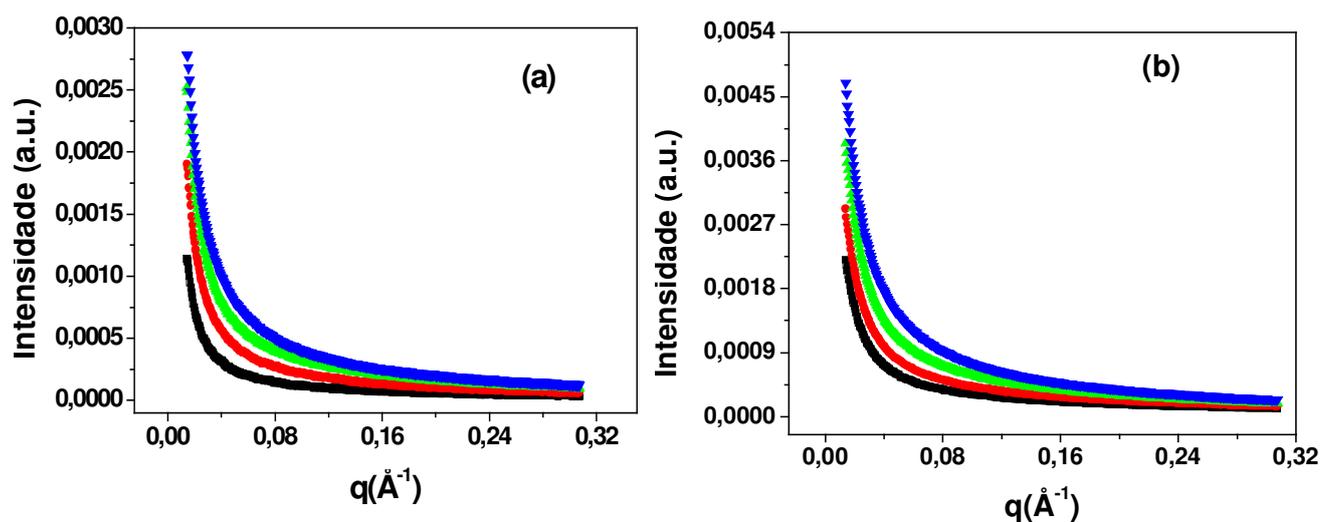


Figura 7. Curvas de SAXS obtidas para as soluções de CAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

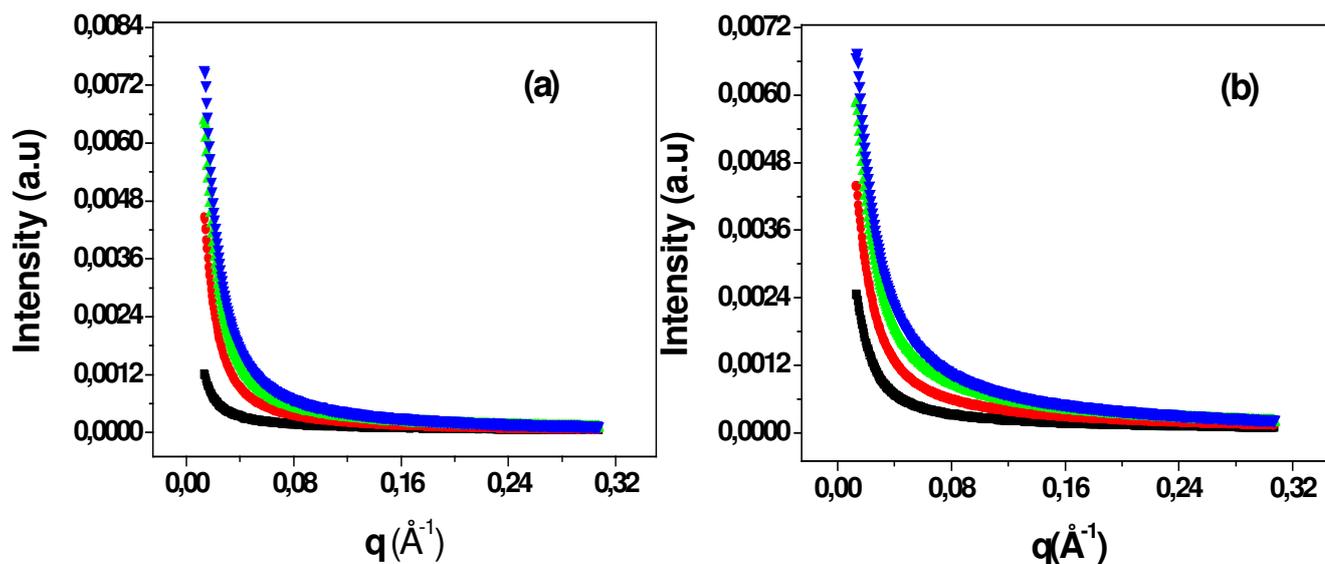


Figura 8. Curvas de SAXS obtidas para as soluções de CMCAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

O raio de giração R_g dos polímeros CAB e CMCAB nas soluções de acetato de etila e acetona foram obtidos através de gráficos de Guinier em diferentes concentrações (5 g/L a 20 g/L). As Figuras 9 e 10 mostram os gráficos de Guinier ($\ln I \times q^2$) obtidos através das curvas experimentais de SAXS nas regiões de baixo q para CAB e CMCAB, respectivamente.

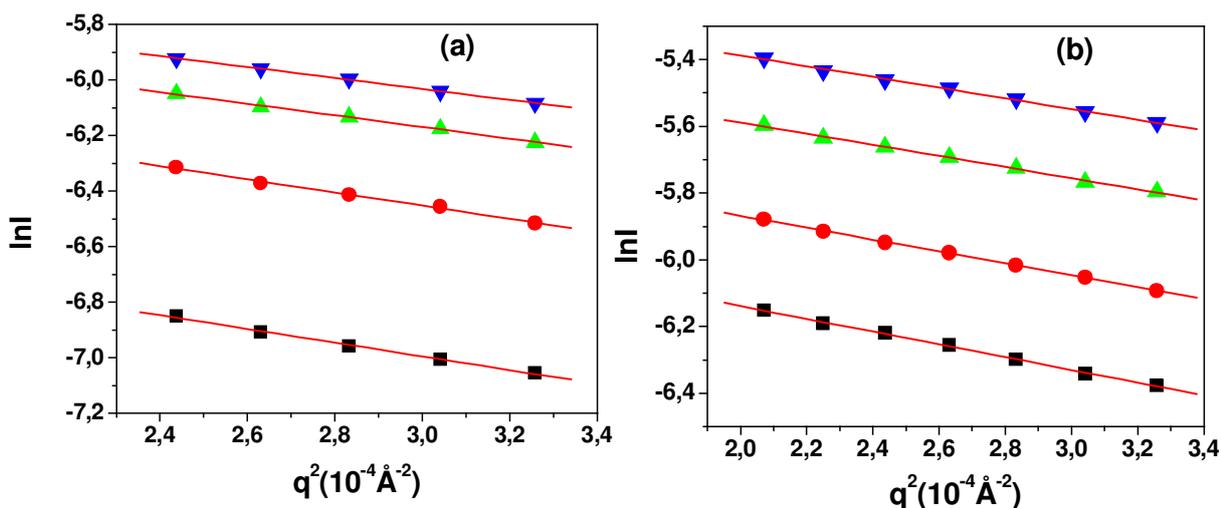


Figura 9. Gráficos de Guinier obtidos para as soluções de CAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

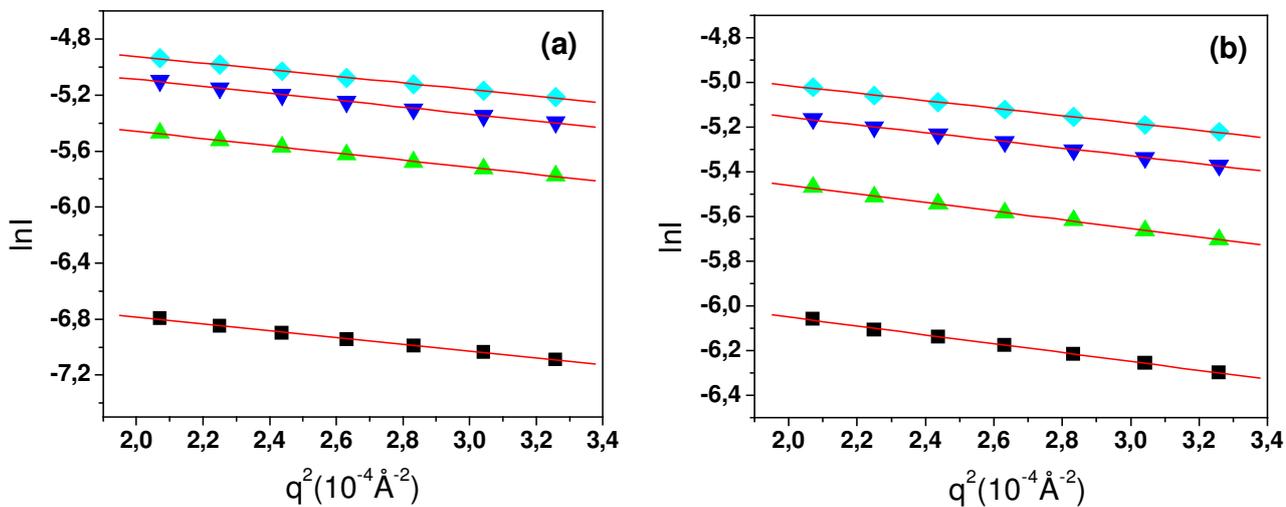


Figura 10. Gráficos de Guinier obtidos para as soluções de CMCAB em (a) acetato de etila e (b) acetona, 5 g/L (■), 10 g/L (●), 15 g/L (▲) e 20 g/L (▼).

As Figuras 9 e 10 mostram uma relação linear entre $\ln I$ e q^2 para todas as soluções de CAB e CMCAB em acetato de etila e acetona. Outra característica importante é que as retas são paralelas para todas as concentrações estudadas, indicando que os coeficientes angulares dos ajustes (equação da reta) para um mesmo solvente são semelhantes na faixa de concentração estudada (5 g/L a 20 g/L). Portanto, não foi observado um efeito de concentração nos valores dos raios de giração dos polímeros nos dois solventes. A seguir são exemplificados os ajustes obtidos para os polímeros CAB e CMCAB na concentração de 10 g/L nos dois tipos de solvente.

- Ajustes para CAB:

$$\text{Acetato de etila : } \ln I = -5,74 - 0,24 (\text{\AA}^2) q^2 \quad (R = 0,99) \quad (24)$$

$$\text{Acetona : } \ln I = -5,51 - 0,18 (\text{\AA}^2) q^2 \quad (R = 0,99) \quad (25)$$

- Ajustes para CMCAB:

$$\text{Acetato de etila : } \ln I = - 4,94 - 0,26 (\text{\AA}^2) q^2 \quad (\mathbf{R = 0,99}) \quad (26)$$

$$\text{Acetona : } \ln I = - 5,07 - 0,19 (\text{\AA}^2) q^2 \quad (\mathbf{R = 0,99}) \quad (27)$$

Os raios de giração dos polímeros são proporcionais aos coeficientes angulares dos ajustes lineares encontrados experimentalmente. Os valores médios dos raios e giração são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios dos raios de giração (R_g) obtidos por SAXS para CAB e CMCAB nas soluções de acetona e acetato de etila.

Solventes	Raio de giração R_g (nm)	
	CAB	CMCAB
Acetona	$7,2 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,3$
Acetato de etila	$7,9 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,2$

Os valores médios de R_g (raio de giração) obtidos CAB e CMCAB dissolvidos em acetato de etila são maiores do aqueles obtidos em acetona indicando que as cadeias dos polímeros são melhores solvatadas pelo acetato de etila do que por acetona. Portanto, os experimentos de SAXS também mostraram que o acetato de etila é um melhor solvente para os polímeros CAB e CMCAB do que a acetona, concordando com os valores da constante de Huggins encontrados nos experimentos de viscosidade. Além disso, os valores

médios de R_g obtidos para CAB e CMCAB para um mesmo solvente não variaram significativamente.

6.2 Caracterização dos filmes finos de CMCAB sobre SiO_2/Si

A caracterização dos filmes de CMCAB foi feita através de elipsometria, medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica. Nesta etapa do trabalho não foram realizados experimentos com o CAB, pois este estudo foi realizado em uma tese de doutorado no nosso grupo [KOSAKA, 2007b].

A Figura 11 mostra a dependência da espessura dos filmes de CMCAB depositado sobre SiO_2/Si em relação a sua concentração em dois solventes distintos (acetato de etila e acetona) para 0h e 15h de recozimento, sendo que essas espessuras foram obtidas por elipsometria.

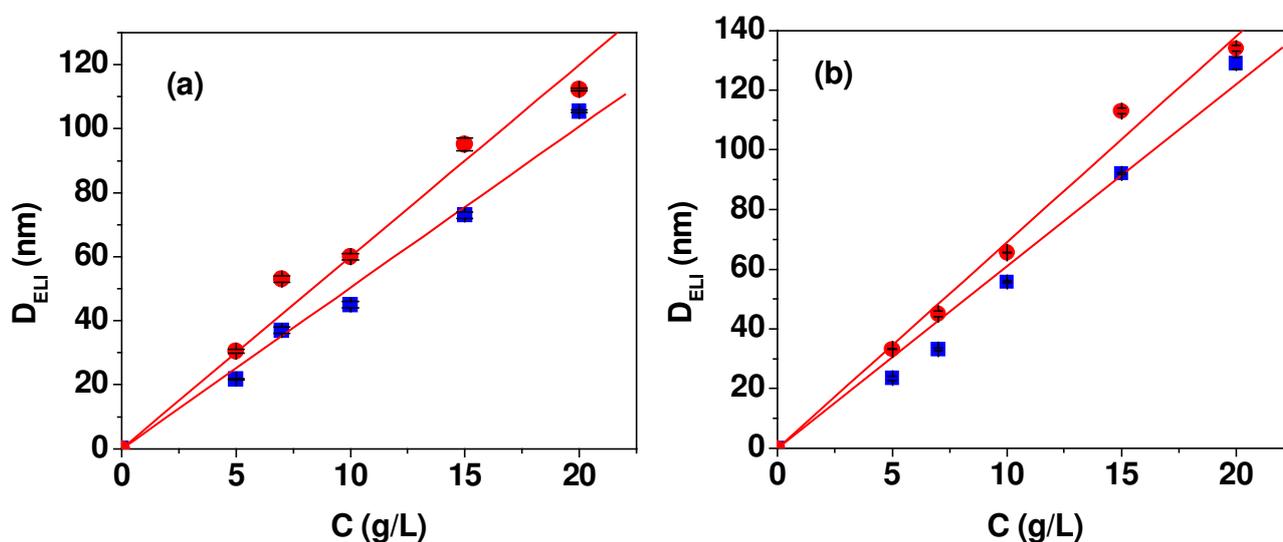


Figura 11. Espessura dos filmes de CMCAB medidos por elipsometria (D_{ELI}) em função da concentração de CMCAB em soluções preparadas em acetato de etila (■) e em acetona (●), (a) sem tratamento térmico e (b) após 15h de tratamento térmico.

A dependência da espessura média de filmes de CMCAB com a concentração polimérica (Figura 11) determinada por elipsometria foi ajustada para os dois solventes utilizados, para 0h e 15h de recozimento:

Para 0h de recozimento:

Acetato de etila: $D \text{ (nm)} = (4,2 \pm 0,1) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99$ (28)

Acetona: $D \text{ (nm)} = (5,1 \pm 0,1) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99$ (29)

Para 15h de recozimento:

Acetato de etila: $D \text{ (nm)} = (6,0 \pm 0,1) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99$ (30)

Acetona: $D \text{ (nm)} = (7,0 \pm 0,2) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99$ (31)

A Figura 12 mostra a dependência da espessura dos filmes de CMCAB em função de sua concentração em acetona e acetato de etila determinados por AFM para 0h de recozimento:

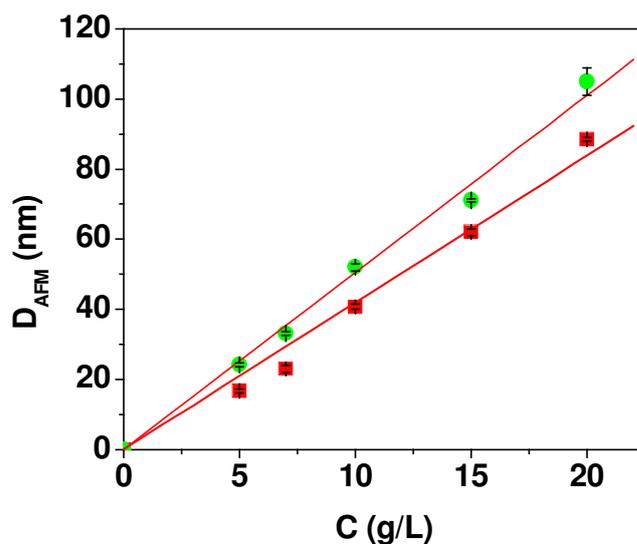


Figura 12. Gráfico da espessura dos filmes de CMCAB (sem recozimento) em acetato de etila (■) e em acetona (●) obtido por AFM.

Os ajustes encontrados utilizando a técnica de AFM foram:

$$\text{Acetato de etila: } D \text{ (nm)} = (4,0 \pm 0,1) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99 \quad (32)$$

$$\text{Acetona: } D \text{ (nm)} = (5,0 \pm 0,2) \text{ (nm.L/g)} C \text{ (g/L)}, R = 0,99 \quad (33)$$

A dependência da espessura média de filmes de CMCAB determinada por AFM com a concentração polimérica para os dois solventes utilizados após 15h de recozimento foram ajustados. Entretanto, as curvas não serão apresentadas porque foram semelhantes ao comportamento sem tratamento térmico (Figura 12).

Os valores de D obtidos para filmes de CMCAB preparados a partir de soluções em acetato de etila e acetona antes e depois do recozimento aumentaram linearmente com o aumento de concentração independentemente da técnica utilizada. Este tipo de comportamento foi observado para filmes de acetato propionato de celulose (CAP), acetato butirado de celulose (CAB) preparados com acetato de etila [KOSAKA, 2007b] e poli(metacrilato de metila) [WALSH, FRANSES, 2003].

Comparando os coeficientes angulares obtidos pelas regressões lineares (equações 28 a 31) podemos concluir que as espessuras médias de filmes preparados a partir de soluções de solvente comum obtidas por elipsometria são maiores do que aquelas determinadas por AFM. Esta diferença entre as duas técnicas na determinação de espessura de filmes foi verificada para filmes de derivados de polipropileno sobre SiO₂/Si [MATE, NOVOTNY, 1991], sendo que neste trabalho a diferença foi explicado devido a aderência de parte do polímero que é um líquido na ponta de silício do AFM e para os filmes de acetato propionato de celulose (CAP) e acetato butirado de celulose (CAB) preparados sobre SiO₂/Si [KOSAKA, 2007b]. A discrepância de aproximadamente 20% pode ser explicada com base na determinação de espessura média por elipsometria, a qual usa modelos de

camadas isotrópicas e homogêneas, que não necessariamente correspondem às camadas reais.

Para um mesmo método experimental de determinação de espessura, observa-se que filmes obtidos a partir de soluções de CMCAB preparadas em acetona são 20% mais espessos que aqueles obtidos a partir de soluções de CMCAB preparadas em acetato de etila.

A dependência da espessura de um filme fino (D) com várias propriedades físico-químicas pode ser expressa pela equação [MEYERHOFER, 1978]:

$$D = \sqrt[3]{\frac{3\eta\phi}{2\rho^2\omega^2}} \quad (34)$$

onde η é a viscosidade da solução, ρ é a densidade do solvente puro, ω é velocidade da rotação e ϕ a taxa de evaporação do solvente.

A equação 34 mostra que D depende da viscosidade da solução, da densidade do solvente puro, da velocidade de rotação e da taxa de evaporação do solvente. Todos os filmes finos de CMCAB foram obtidos mantendo a velocidade de rotação de 3000 rpm, por 30s, tornando esta variável desprezível. As densidades da acetona e do acetato de etila são $0,7899 \text{ g/cm}^3$ e $0,9003 \text{ g/cm}^3$, respectivamente [WEAST et al., 1985], a relação entre as viscosidades das soluções de CMCAB em acetona e acetato de etila ($\eta_{\text{acet. etila}}/\eta_{\text{acetona}}$) não tem uma variação significativa entre as concentrações utilizadas (Tabela 4). As pressões de vapor da acetona e do acetato de etila são de 30,8 kPa e 12,1 kPa [MÜELLER-BUSCHBAUM et al., 2001; ZHAO et al., 2004], respectivamente. Através destes dados foi possível prever a relação entre a espessura esperada para os filmes de CMCAB preparado

em acetato de etila (D_1) e para os filmes preparados em acetona (D_2) utilizando a equação 34 e usando a relação $\eta_{\text{acet. etila}}/\eta_{\text{acetona}} = 1,3 \pm 0,1$.

Tabela 4. Relação entre as viscosidades das soluções de CMCAB preparadas em acetato de etila e em acetona, a 25°C, em diferentes concentrações.

Relação entre as viscosidades	Concentração (g/L)				
	5	7	10	15	20
$\frac{\eta_{\text{acetatodeetila}}}{\eta_{\text{acetona}}}$	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1

A relação (D_1/D_2) foi calculada através da equação 34, considerando ω constante e substituindo a taxa de evaporação ϕ dos solventes pelas respectivas pressões de vapor P:

$$\frac{D_1}{D_2} = \sqrt[3]{\left[\left(\frac{\eta_1}{\eta_2} \right) \left(\frac{\rho_2^2}{\rho_1^2} \right) \left(\frac{P_1^v}{P_2^v} \right) \right]} \quad (35)$$

onde η_1/η_2 é a relação entre as viscosidade da solução de CMCAB em acetato de etila (η_1) e acetona (η_2), ρ_1 é a densidade do acetato de etila puro, ρ_2 é a densidade da acetona pura, P_1^v a pressão de vapor do acetato de etila e P_2^v a pressão de vapor da acetona.

Substituindo os valores experimentais na equação 35 obtém-se:

$$\frac{D_1}{D_2} = 0,73 \quad (36)$$

Para o modelo teórico utilizado podemos concluir que $D_2=1,37D_1$, ou seja, que os filmes preparados de CMCAB preparados em acetona são 36% mais espessos que os filmes preparados em acetato de etila. Esta relação teórica está coerente com a obtida experimentalmente de 20%. Para o CAB foi determinado experimentalmente que os filmes

em soluções de acetona são 25% mais espessos que os filmes preparados com acetato de etila [KOSAKA, 2007b].

Estes resultados mostram que a pressão de vapor do solvente influencia significativamente na espessura média dos filmes de CMCAB. Walsh e Franses (2003) observaram efeitos semelhantes em filmes de PMMA preparados em tolueno e clorofórmio. Filmes de PMMA preparados em clorofórmio, solvente mais volátil, eram mais espessos do que aqueles preparados em tolueno (solvente menos volátil).

Outro fator que não pode ser desprezado é a interação entre solvente e substrato. As interações ácido-base têm um papel muito importante na adesão de revestimentos poliméricos, produzidos a partir de soluções de solventes orgânicos, em óxidos metálicos [BOLGER, 1983; FOWKES, 1987; LIU; ZHANG; LASKOWSKI, 2000]. Chaudhury (1996) mostrou que a interação do tipo ácido-base entre diferentes ácidos e o Si/SiO₂ pode ser representado pela relação:

$$\Delta = IEPS - pK_a \quad (37)$$

onde Δ representa a interação do ácido com a superfície, IEPS é o ponto isoelétrico da superfície do substrato, no caso de SiO₂ IEPS = 2, e $pK_a = -\log K_a$, sendo K_a a constante de dissociação do ácido.

O valor das energias reportado para a interação Δ entre a acetona e o acetato de etila com a superfície de SiO₂/Si são de 18RT e 24RT, respectivamente. Quanto mais positivo for este valor menos intenso será a interação do ácido com a superfície de SiO₂/Si. Portanto, as interações entre acetona e SiO₂/Si são bem mais favorecidas do que as interações entre acetato de etila e SiO₂/Si.

Como a acetona tem uma maior interação com o substrato isto gera uma competição pelo substrato entre o solvente e o polímero, fazendo com que os filmes sejam mais

espessos. O uso do acetato de etila minimiza a competição pelo substrato já que sua interação com o SiO_2/Si é menor do que a acetona, gerando filmes menos espessos.

Observa-se pela Figura 11 um aumento nos valores médios de D obtidos por elipsometria após recozimento, especialmente para concentrações acima de 10 g/L. CMCAB é um material semi-cristalino (39% de cristalinidade), como mostra o difratograma de raio-X na Figura 13. Este efeito da temperatura sobre a espessura dos filmes de poli(terc-butil metacrilato) também foi observado [SEE et al. 2000]. As estruturas dos filmes obtidos por revestimento rotacional são estruturas de não-equilíbrio. O processo de recozimento permite o rearranjo molecular do filme, de forma que suas cadeias atinjam a situação mais estável possível (situação de equilíbrio ou próxima do equilíbrio). Desta forma, os filmes podem apresentar certa anisotropia, que causaria um aumento aparente nos valores de espessuras calculados com base num modelo de camadas isotrópicas. Portanto, o aumento aparente pode ser devido ao uso de um modelo de filme isotrópico que não corresponde ao filme real. Já os valores de espessura média obtida por AFM antes e após recozimento não apresentaram variações significativas.

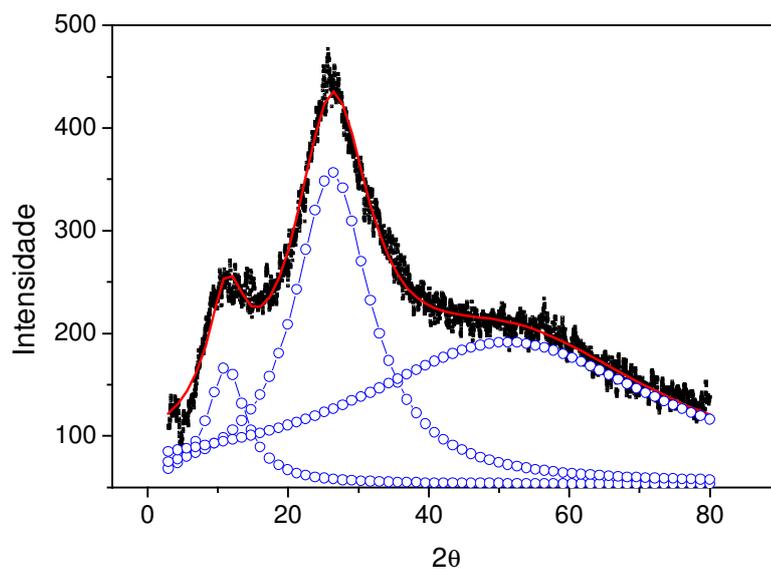
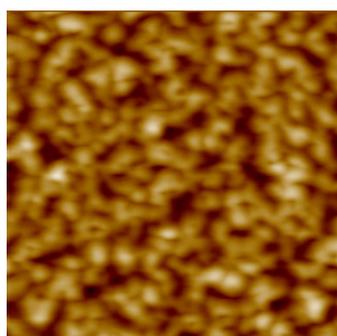
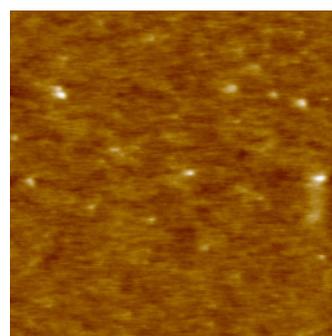


Figura 13. Difratoograma de raio-X obtido para o acetato butirato carboximetil celulose (CMCAB). Os símbolos em preto representam os dados experimentais, a curva em vermelho é o ajuste matemático (Lorentz) e as curvas em azul representam as áreas das regiões cristalinas e do halo amorfo oriundos da deconvolução da curva teórica.

As imagens das estruturas da superfície dos filmes de CMCAB preparados em acetona e em acetato de etila são mostradas na Figura 14 (a) e 14 (b) respectivamente.



(a)



(b)

Figura 14. Imagens topográficas de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) obtidas no modo contato intermitente para filmes de CMCAB preparados por spin coating em (a) acetona, $Z = (10\text{mg/mL})$ e (b) acetato de etila, $Z = 10 \text{ nm}$, (10mg/mL), sem tratamento térmico.

O filme de CMCAB é mais liso e homogêneo quando preparado em acetato de etila, entretanto em acetona a superfície é mais rugosa e ocorre a presença de grãos do polímero. Este efeito dos solventes acetato de etila e acetona na morfologia dos filmes também foi verificado para o CAB [KOSAKA, 2007b]. Essa diferença na topografia dos filmes pode ser explicada segundo um modelo desenvolvido por Silberberg (1968). Neste modelo o processo de adsorção é controlado pelo balanço das interações entre polímero e substrato, substrato e solvente e polímero e solvente e pode ser expresso pela equação 38:

$$\chi = [f_{ps} - f_{os} + 1/2(f_{pp} - f_{oo})] / kT \quad (38)$$

onde χ é a energia envolvida no processo de adsorção de um segmento do polímero em solução com o substrato, f_{ps} , f_{os} , f_{pp} , f_{oo} representam a energia de interação entre polímero e substrato, solvente-substrato, polímero-polímero e solvente-solvente, respectivamente; k é a constante de Boltzmann e T a temperatura.

Como comentado, a interação entre acetona e substrato por ser maior do que a polímero-substrato faz com que a superfície seja mais rugosa. Quando o filme de CMCAB é preparado em acetato de etila a interação CMCAB-substrato é mais favorecida, conseqüentemente filmes mais homogêneos são formados. Comportamento semelhante foi encontrado em filmes finos de poliestireno, PS, preparados por spin-coating sobre lâminas de Si a partir de soluções poliméricas em tolueno e tetrahidrofurano (THF) [PETRI, 2002]. Apesar de tolueno e THF serem bons solventes para o PS, os filmes preparados a partir de tolueno são lisos e muito homogêneos. Sob condições semelhantes, filmes de PS preparados a partir de soluções em THF apresentaram furos com exposição do substrato e alta rugosidade. Nestes trabalhos, a homogeneidade de filmes preparados a partir de soluções em tolueno foi atribuída à lenta evaporação do tolueno e à fraca interação entre

tolueno e os grupos silanóis do substrato. O mesmo comportamento foi observado para filmes de trimetilsilil celulose preparados a partir de tolueno que também ficaram mais homogêneos e uniformes do que filmes preparados em clorofórmio [KONTTURI; THÜNE; NIEMANTSVERDRIET, 2003].

A estabilidade térmica dos filmes finos de CMCAB obtidos por spin coating foi investigada por microscopia de força atômica em diferentes concentrações do polímero e em distintos tempos de recozimento. As imagens topográficas dos filmes de CMCAB preparados em acetato de etila e acetona são mostradas nas Figuras 15 e 16. As espessuras (D) dos filmes preparados em acetato de etila (Figura 15) e em acetona (Figura 16) nos diferentes tempos de recozimento não modificaram com o tempo os valores foram obtidos por AFM são 5mg/mL ($D_{AFM} \cong 17,0 \pm 0,5$ nm) ,10mg/mL ($D_{AFM} \cong 40,0 \pm 0,3$ nm) e 20mg/mL ($D_{AFM} \cong 89,0 \pm 0,5$ nm) e preparados em acetona (Figura 8), 5mg/mL ($D_{AFM} \cong 24,0 \pm 0,5$ nm) ,10mg/mL ($D_{AFM} \cong 60 \pm 1$ nm) e 20mg/mL ($D_{AFM} \cong 110 \pm 1$ nm).

A Figura 15 mostra que os filmes de CMCAB preparados em acetato de etila em três concentrações para diferentes tempos de recozimento. Considerando os filmes preparados em acetato de etila na concentração de 10 e 20 g/L, os filmes de CMCAB são muito estáveis, pois não apresentaram estruturas típicas de desestruturação dos filmes nos diferentes tempos de recozimento. Os filmes de CMCAB na concentração de 5 g/L são irregulares devido à falta de material (CMCAB) para recobrir toda o substrato, o que permanece durante os diferentes tempos de recozimento.

Os filmes de CMCAB preparados com acetona são irregulares em todas as concentrações usadas e esta tendência continua ao longo dos diferentes tempos de recozimento, como é mostrado na Figura 16.

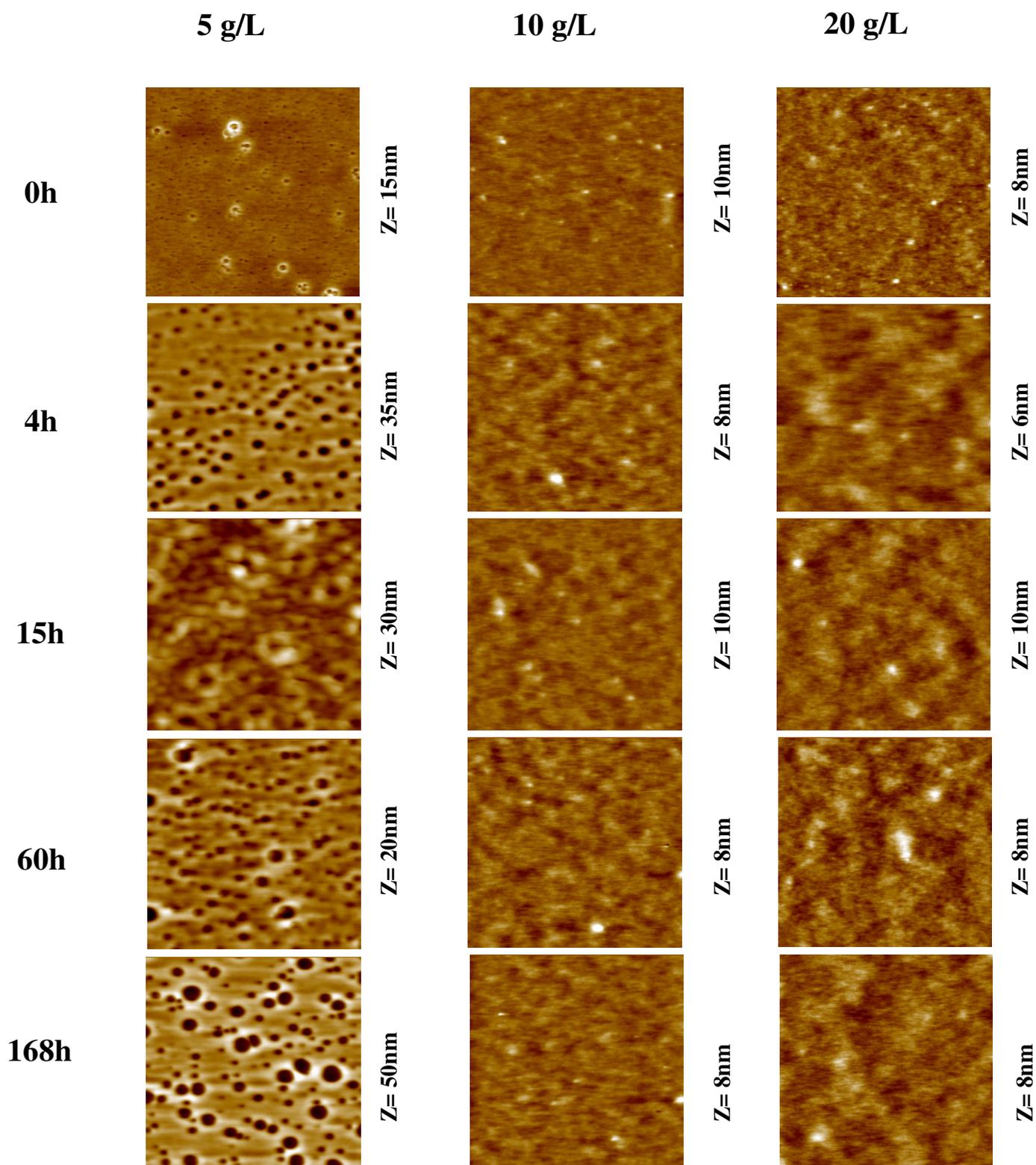


Figura 15. Imagens de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) dos filmes de CMCAB preparados por spin coating em soluções de acetato de etila nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L com os respectivos tempos de recozimento.

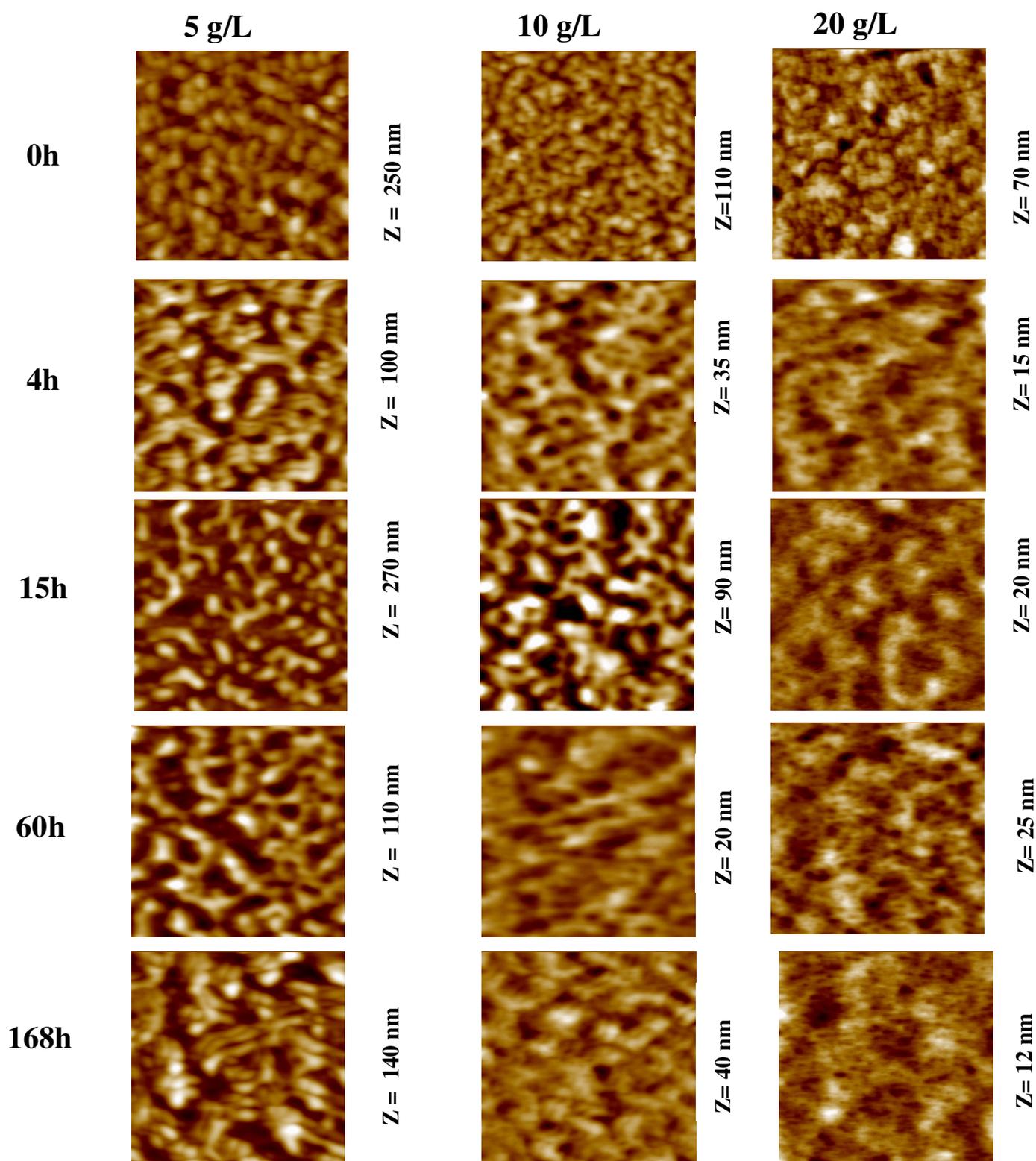


Figura 16. Imagens de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) dos filmes de CMCAB preparados por spin coating em soluções de acetona nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L com os respectivos tempos de recozimento.

A rugosidade média (RMS) foi determinada para os filmes de CMCAB preparados em acetona e acetato de etila antes e depois do recozimento em duas áreas diferentes e em duplicata. A diferença nos valores das rugosidades médias obtidas por AFM estão associadas ao efeito do solvente na formação do filme. A Figura 17 mostra a variação da rugosidade dos filmes de CMCAB preparados em acetato de etila nos diferentes tempos de recozimento.

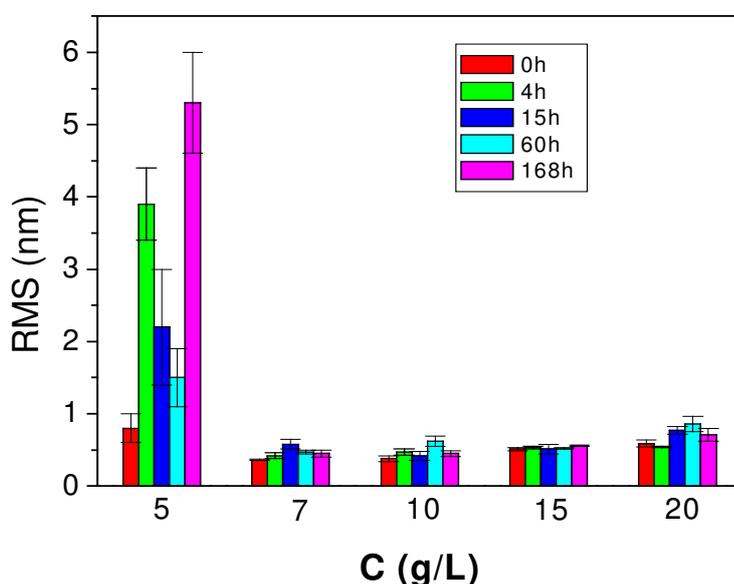


Figura 17. Valores de rugosidade média (RMS) dos filmes de CMCAB preparados em acetato de etila em diferentes tempos de recozimento.

A Figura 17 mostra que a rugosidade média varia mais significativamente com o recozimento nos filmes de CMCAB que foram preparados na concentração de 5 g/L. Após 4h de recozimento o valor da rugosidade média aumentou o que ocorreu também com 168h de recozimento. Essa variação no valor da rugosidade está associada à formação de um filme descontínuo e com buracos como mostra a Figura 15. A partir da concentração de 7 g/L percebe-se que os filmes independentemente do tempo de recozimento não apresentam mudanças significativas no valor da rugosidade.

A Figura 18 mostra como a rugosidade varia nos filmes de CMCAB preparados em acetona em função da concentração e do tempo de recozimento. Como os filmes são mais rugosos dos que os filmes preparados em acetato de etila o tratamento térmico foi mais significativo na diminuição da rugosidade dos filmes. A rugosidade nos filmes de CMCAB que foram preparados na concentração de 5 e 7 g/L são mais elevadas do que nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L. Isto está associado a morfologia dos filmes que em menores concentrações são mais descontínuos. Após 15h de recozimento o valor da rugosidade diminuiu significativamente para as concentrações de 10, 15 e 20 g/L .

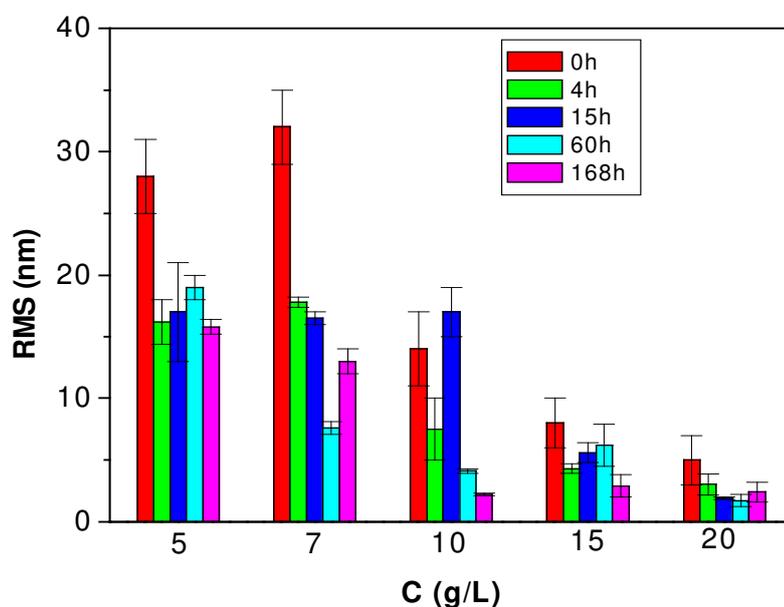


Figura 18. Valores de rugosidade média (RMS) dos filmes de CMCAB preparados em acetona em diferentes tempos de recozimento.

Quando um filme polimérico é aquecido acima da sua temperatura de transição vítrea (T_g), suas cadeias ganham uma maior mobilidade [REITER, 2002], podendo em uma interface polímero-substrato se reorganizar em uma conformação preferencial. Analisando as Figuras 17 e 18 percebe-se que o filme de CMCAB preparado em acetato de etila encontra-se em uma conformação preferencial na superfície do substrato, pois mesmo

acima da sua temperatura de transição vítrea os valores da rugosidade não alteraram bruscamente. Ao contrário, nos filmes preparados em acetona apresentaram maiores mudanças nos valores da rugosidade indicando uma maior mobilidade das cadeias quando submetido ao tratamento térmico.

Ângulo de contato é um importante parâmetro termodinâmico e está relacionado com a hidrofobicidade da superfície, sendo que a histerese é definida como a diferença entre o ângulo de avanço e o de recesso está associado a heterogeneidade química e a rugosidade da superfície [ADAMSON, 1990]. Sendo assim pode-se inferir sobre a orientação das cadeias do polímero nos filmes e avaliar também a rugosidade. A Tabela 5 mostra os valores dos ângulos de avanço, de recesso e do valor da histerese dos filmes de CMCAB preparados em acetona e acetato de etila nos diferentes tempos de recozimento. Os filmes preparados na concentração de 5 g/L tanto em acetona e em acetato de etila são descontínuos como evidenciaram as imagens de AFM (Figura 15 e 16), por isso não foram feitas medidas de ângulos de avanço e de recesso para estes filmes.

Os valores de θ_A encontrados estão próximos a 70° , independentemente da condição experimental. Este valor indica que os filmes são pouco hidrofílicos. Os grupos ácidos carboxílicos e hidroxilas provavelmente estão orientados para a superfície de SiO_2/Si , enquanto os grupos butila estão predominantemente orientados para o ar. Este tipo de orientação molecular gera superfícies mais hidrofóbicas. A Tabela 5 mostra que não existe efeito das variáveis solvente, concentração e tempo de recozimento sobre os valores do ângulo de avanço (θ_A). O efeito dessas variáveis é maior sobre os valores da histerese ($\Delta\theta$). Os valores de $\Delta\theta$ observados para filmes preparados a partir de acetato de etila são menores do que aqueles observados para filmes preparados a partir de acetona, corroborando com os

dados de rugosidade média (RMS) observados nas Figuras 17 e 18. O efeito da concentração só foi observado para filmes preparados a partir de acetona e recozidos. Quanto maior a concentração, menor o valor de $\Delta\theta$ encontrado e, portanto, menor a rugosidade. Este resultado está de acordo com o comportamento observado na Figura 18.

A influência do tempo de recozimento foi observada para filmes preparados a partir de acetona. Percebe-se pela Tabela 5 que quanto maior o tempo de recozimento, menor o valor de $\Delta\theta$ encontrado e, portanto, menor a rugosidade. Esta diminuição da rugosidade pode estar associada a maior mobilidade adquirida das cadeias poliméricas durante o tratamento térmico e que conseqüentemente adquiriram uma conformação mais estável energeticamente. Esta tendência também foi observada por AFM, especialmente no caso da acetona (Figura 16). No caso do solvente acetato de etila (Figura 17), após 4 horas de recozimento os valores de RMS dos filmes de CMCAB praticamente não variaram mais.

Tabela 5. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de CMCAB preparados em acetona e acetato de etila nos diferentes tempos de recozimento e concentração.

Tempo de annealing	Concentração (g/L)	Solventes					
		Acetato de etila			Acetona		
		$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_R(^{\circ})$	$\Delta\theta(^{\circ})$	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_R(^{\circ})$	$\Delta\theta(^{\circ})$
0h	7	68 ± 1	49 ± 1	19 ± 1	66 ± 1	39 ± 2	27 ± 2
	10	68 ± 1	48 ± 1	20 ± 1	64 ± 1	39 ± 1	25 ± 1
	15	63 ± 1	48 ± 1	15 ± 1	69 ± 1	44 ± 1	25 ± 1
	20	69 ± 1	50 ± 1	19 ± 1	76 ± 1	45 ± 2	31 ± 2
4h	7	69 ± 1	57 ± 2	12 ± 2	71,5 ± 0,5	48,5 ± 0,5	23,0 ± 0,7
	10	70 ± 1	59 ± 2	11 ± 2	72 ± 2	54 ± 2	18 ± 3
	15	71 ± 1	58 ± 1	13 ± 1	69 ± 1	54 ± 1	15 ± 1
	20	70 ± 1	55 ± 1	15 ± 1	69 ± 1	54 ± 2	14 ± 2
15h	7	70 ± 1	60 ± 1	10 ± 1	70 ± 1	51 ± 1	19 ± 1
	10	69 ± 1	60 ± 1	9 ± 1	68 ± 2	54 ± 2	14 ± 3
	15	66 ± 1	59 ± 1	7 ± 1	69 ± 1	53 ± 1	16 ± 1
	20	69,5 ± 0,5	62,5 ± 0,5	7 ± 0,7	70 ± 1	58 ± 1	12 ± 1
60h	7	69 ± 1	59 ± 1	10 ± 1	69 ± 1	52 ± 1	17 ± 2
	10	68 ± 1	58 ± 1	10 ± 2	72 ± 1	55 ± 2	17 ± 3
	15	70 ± 1	62 ± 1	8 ± 2	68 ± 1	55 ± 2	13 ± 2
	20	70 ± 1	58 ± 1	12 ± 2	70 ± 1	57 ± 1	13 ± 1
168h	7	69 ± 1	61 ± 1	8 ± 2	64 ± 2	52 ± 1	12 ± 2
	10	69 ± 1	62 ± 1	7 ± 1	71 ± 1	54 ± 1	17 ± 2
	15	68,0 ± 0,5	59 ± 2	9 ± 2	66 ± 1	56 ± 1	10 ± 1
	20	69 ± 1	59 ± 2	10 ± 2	69,0 ± 0,5	58 ± 2	11 ± 2

6.3 Isotermas de adsorção de CAB e CMCAB sobre diferentes substratos

O processo de adsorção dos polímeros CAB e CMCAB foi investigado considerando o efeito da superfície (SiO_2/Si e lâminas de SiO_2/Si funcionalizado com grupos amino, APS) e da diferença na estrutura química das macromoléculas.

As isotermas de adsorção de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si e APS são apresentados na

Figura 19.

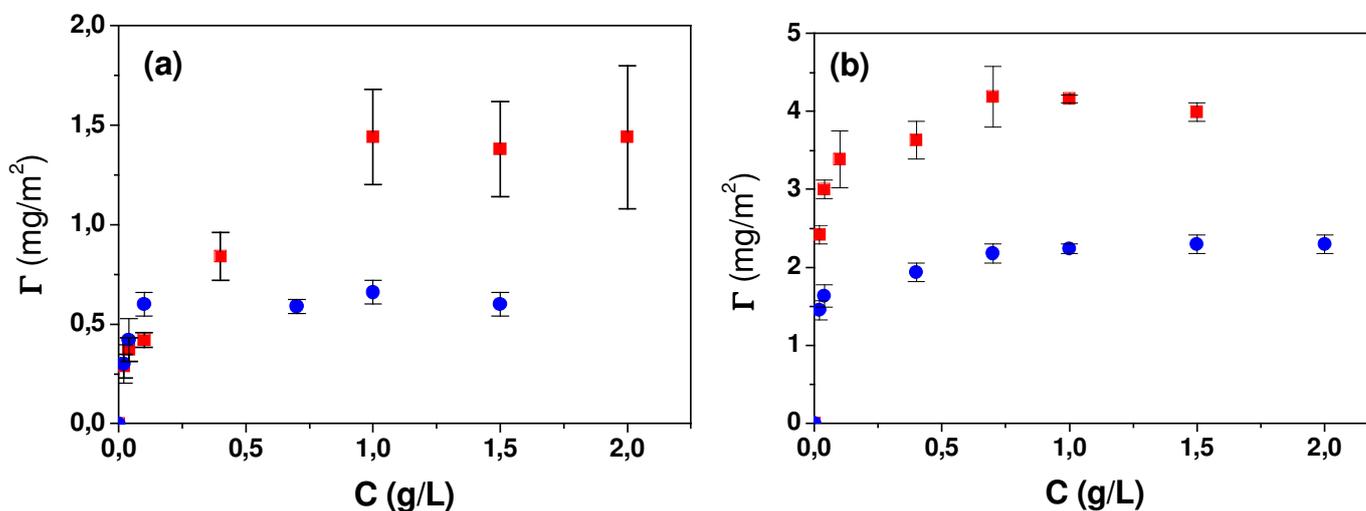


Figura 19. Isotermas de adsorção obtidas para (a) CAB e (b) CMCAB utilizando acetato de etila como solvente em duas superfícies diferentes, (●) silício (SiO₂/Si) e (■) para a superfície de SiO₂/Si funcionalizada com grupo amino (APS), a 25°C.

As curvas de adsorção evidenciaram um aumento contínuo da quantidade de material adsorvido em função das soluções de CAB e CMCAB na qual os substratos foram imersos, até atingir um patamar de adsorção, caracterizando uma condição de equilíbrio. Os valores médios da espessura das camadas de CAB na região do patamar das isotermas foi de $D = (1,2 \pm 0,2)$ nm sobre APS e $D = (0,52 \pm 0,02)$ nm sobre SiO₂/Si, o que corresponde a quantidade de material adsorvido de $\Gamma = (1,44 \pm 0,04)$ mg/m² e $\Gamma = (0,62 \pm 0,03)$ mg/m², respectivamente. Considerando o polímero CMCAB, os valores médios da espessura das camadas de CMCAB na região do patamar das isotermas foi de $D = (3,4 \pm 0,2)$ nm sobre APS e $D = (1,9 \pm 0,2)$ nm sobre SiO₂/Si, portanto a quantidade de CMCAB adsorvido sobre APS e SiO₂/Si foi de $\Gamma = (4,1 \pm 0,2)$ mg/m² e $\Gamma = (2,3 \pm 0,2)$ mg/m²,

respectivamente. Os valores médios das espessuras dos filmes de CAB e CMCAB formados sobre estes substratos indicam que somente o CAB adsorve sobre SiO₂/Si formando uma monocamada. Visto que a espessura média de uma monocamada homogênea de celulose é aproximadamente de $D = 0,5 \text{ nm}$ [HOLMBERG et al., 1997].

As isotermas de adsorção de CAB e CMCAB são fortemente influenciadas pela estrutura química da superfície, sendo que o processo de adsorção ocorre mais intensamente na seguinte ordem $\text{APS} > \text{SiO}_2/\text{Si}$. Este comportamento também foi verificado para goma do cajueiro [MACIEL et al., 2007], sendo que a menor adsorção desse polissacarídeo sobre SiO₂/Si foi explicado pela repulsão eletrostática entre o polímero carregado negativamente e a presença de grupos silanóis de mesma carga. Logo, como CAB e CMCAB não apresentam propriedades de polieletrólitos em acetato de etila, pode-se concluir que a maior adsorção desses ésteres de celulose sobre APS é provavelmente dirigida por interações mais favoráveis entre os grupos carboxílicos e hidroxila dos polissacarídeos e o grupo amino do substrato do que com o SiO₂/Si.

Experimentos de dessorção foram feitos por medidas de elipsometria, monitorando a variação da espessura da camada de CAB e CMCAB adsorvidos. Os filmes de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si e APS foram deixados em contato com o solvente puro (acetato de etila). Após 24h imersos no solvente, mediu-se a espessura dos filmes e foi verificado que não ocorreu alteração da espessura dos filmes dos polímeros sobre os dois substratos, mostrando que o processo de adsorção é irreversível para o CAB e CMCAB, logo não foi possível aplicar modelos clássicos de adsorção.

Os valores de Γ (mg/m²) são maiores para o CMCAB sobre SiO₂/Si e APS do que para o CAB. Portanto, o grupo CM (carboximetil) contribui fortemente para o processo de

adsorção do CMCAB. Possivelmente por propiciar mais interações intermoleculares do tipo dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio com as superfícies.

A Tabela 6 mostra os valores dos ângulos de contato de avanço, de recesso e da histerese medidos para gotas de água sobre os filmes de CAB e CMCAB na região do patamar das isotermas. Não foram realizadas medidas de ângulo de contato em outras regiões da curva, pois o ângulo de contato não corresponderia um substrato totalmente recoberto pelos polímeros, interferindo na análise das medidas.

Tabela 6. Ângulo de contato de avanço (θ_a), ângulo de contato de recesso (θ_r) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si e APS realizados com gotas de água.

CAB				CMCAB			
Superfície	θ_a (°)	θ_r (°)	$\Delta\theta$ (°)	Superfície	θ_a (°)	θ_r (°)	$\Delta\theta$ (°)
APS	68 ± 1	49 ± 2	19 ± 2	APS	74 ± 1	58 ± 1	16 ± 1
SiO ₂ /Si	50 ± 1	43 ± 1	7 ± 1	SiO ₂ /Si	55 ± 2	42 ± 1	13 ± 2

Os ângulos de contato para SiO₂/Si e APS são (5 ± 1)°, (24 ± 1)°, respectivamente [PETRI et al., 1999; Castro et al., 2005]. Os dados da Tabela 6 mostram que após a adsorção de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si e APS, a molhabilidade dessas superfícies diminuíram, pois os valores de θ_a aumentaram. Portanto, os filmes dos polímeros tornaram as superfícies mais hidrofóbicas, isto ocorreu provavelmente pela orientação dos grupos butiratos para o ar. Sendo que para a superfície de APS, os grupos butiratos dos polímeros estão mais orientados para o ar do que quando adsorvidos sobre SiO₂/Si tornando os filmes mais hidrofóbicos do que os filmes sobre SiO₂/Si.

Para avaliar o efeito da superfície sobre a morfologia dos filmes de CAB e CMCAB, imagens topográficas foram obtidas por AFM dos filmes formados no patamar da isoterma,

na concentração de 1,5 g/L (Figura 20). A Figura 20 mostra as imagens topográficas dos filmes dos polímeros sobre SiO₂/Si e APS .

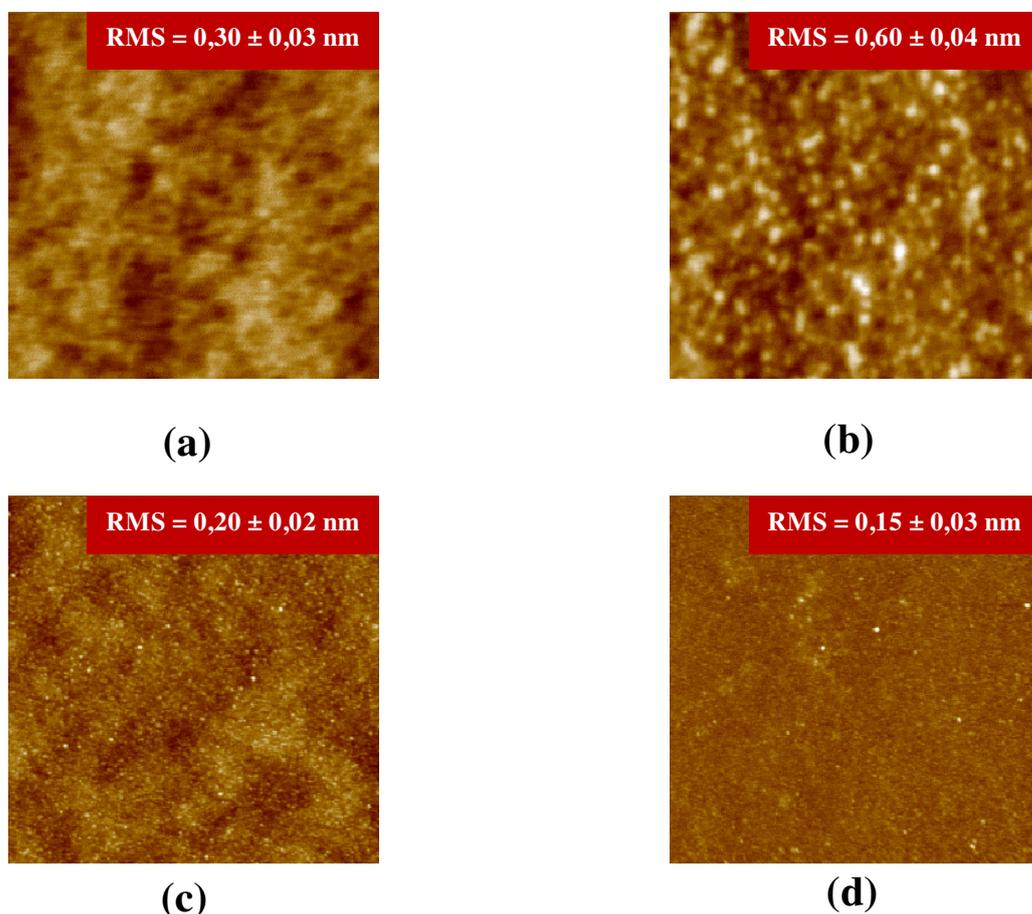


Figura 20. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm² para os filmes de CAB sobre (a) Si/SiO₂, Z = 4 nm, (b) APS, Z = 7 nm e para os filmes de CMCAB sobre (c) Si/SiO₂, Z= 3 nm e (d) APS, Z = 3 nm.

A Figura 20 mostra que as superfícies dos filmes de CAB e CMCAB são homogêneas e lisos sobre os dois substratos. Comparando os valores das rugosidades dos filmes com a dos substratos: RMS = (0,22 ± 0,02) nm para APS e RMS = (0,10 ± 0,02) nm para SiO₂/Si [PETRI et al., 1999; CASTRO et al., 2005], os filmes são alteram bruscamente os valores, mas são ligeiramente mais rugosos, exceto para o filme de CMCAB sobre APS que apresenta um valor de RMS menor do que o substrato.

Os filmes obtidos por adsorção foram escolhidos para avaliar o efeito do polímero CMCAB e CAB sobre o comportamento de adsorção das proteínas e sobre a mudança da hidrofobicidade dos filmes desses ésteres de celulose sobre os substratos silício e APS no processo de adsorção das biomoléculas.

6.4 Determinação da energia superficial de CAB e CMCAB

Para o cálculo das componentes dispersivas e polares (γ_s^d e γ_s^p) da energia superficial do polímero CAB e CMCAB foram utilizados somente os filmes preparados por spin coating sobre SiO₂/Si e APS. Para a determinação da energia superficial foram usados o solvente água e diiodometano e os valores das energias superficiais reportados na literatura [BOUALI et al., 1998] dos líquidos apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores das energias superficiais dos líquidos usados no cálculo das componentes dispersiva e polar da energia superficial dos polímeros.

Líquidos	γ_{LV} (mJ/m ²)	γ_{LV}^d (mJ/m ²)	γ_{LV}^p (mJ/m ²)
Água	72,8	21,8	51
Diiodometano	50,8	50,8	0

A determinação da energia superficial do CMCAB sobre SiO₂/Si foi feita medindo-se o ângulo de avanço dos diferentes líquidos nos filmes mais homogêneos e lisos. Neste caso, foi usado um filme de CMCAB preparado em acetato de etila na concentração de 20 g/L, com um tempo de recozimento de 15h, na temperatura de 150°C. Este filme foi caracterizado e foi um dos que apresentou menor de valor de RMS (Figura 17) e de

histerese (Tabela 5). Não foram medidos os ângulos de contato para o filme de CAB preparado por revestimento rotacional, pois esses valores são encontrados na literatura [KOSAKA et al., 2007c].

Os filmes de CAB e CMCAB sobre APS foram preparados em acetato de etila na concentração de 20 g/L, com um tempo de recozimento de 15h, na temperatura de 150°C para o CMCAB e 170°C para CAB (sendo que essas temperaturas estão acima de suas temperaturas de transição vítrea). As espessuras médias obtidas antes do tratamento térmico foram de $D = 130 \pm 3$ nm e $D = 128 \pm 1$ nm para CAB e CMCAB, respectivamente. Após o recozimento de 15h, as espessuras dos filmes obtidas foram de $D = 133 \pm 1$ nm para o filme de CAB e $D = 129 \pm 1$ nm para o filme de CMCAB, indicando que os filmes não sofreram alterações morfológicas à exposição do tratamento térmico.

A Figura 21 mostra as imagens de AFM obtidas antes e depois do recozimento para os filmes de CAB e CMCAB sobre a superfície de APS. Percebe-se que os filmes polímeros os filmes são homogêneos e lisos. Comparando-se os valores das rugosidades antes e depois do recozimento nota-se que os filmes não sofreram alterações estruturais na superfície, o que está de acordo com os baixos valores de histerese obtidos nas medidas de ângulo de contato com gotas de água, $\Delta\theta = 5^\circ \pm 1$ para os filmes de CAB e $\Delta\theta = 7^\circ \pm 1$ para os filmes de CMCAB.

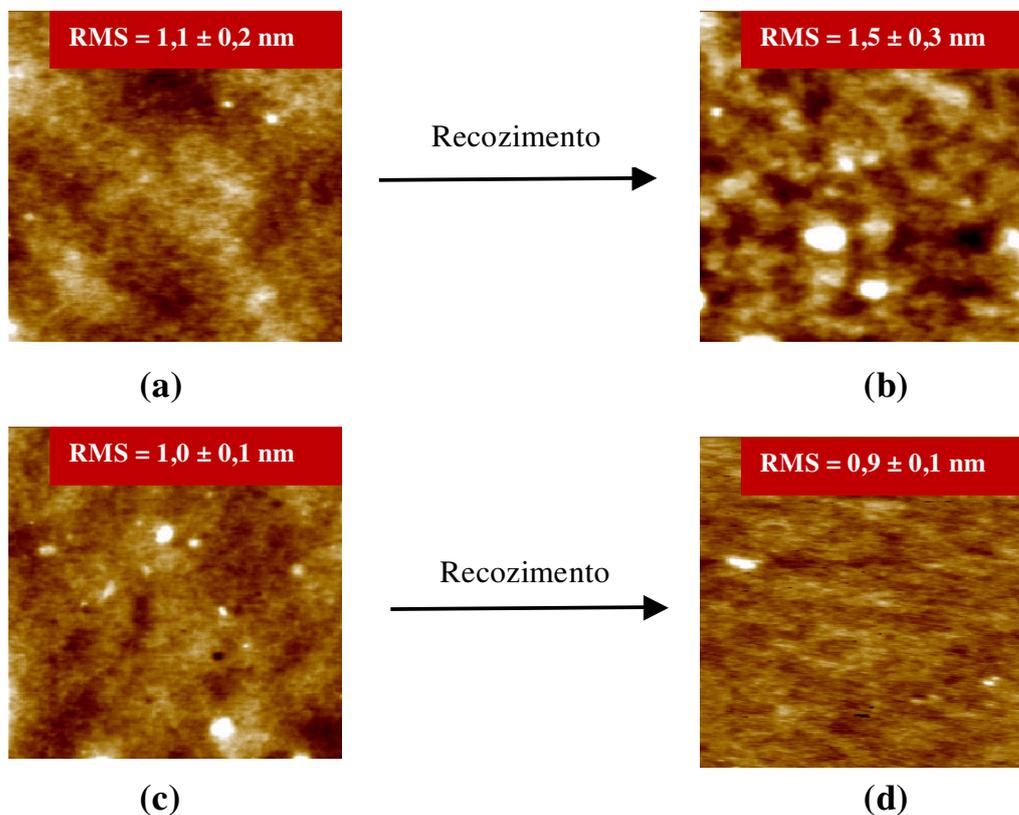


Figura 21. Imagens de AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) para CMCAB: (a) 0h de recozimento, $Z= 8 \text{ nm}$, (b) 15h de recozimento, $Z= 10 \text{ nm}$ e para CAB: (c) 0h de recozimento, $Z= 7 \text{ nm}$ e CAB (d) 15h de recozimento, $Z= 9 \text{ nm}$, sobre superfície de APS.

A Tabela 8 mostra os ângulos de contato obtidos para o cálculo da energia superficial dos polímeros CAB e CMCAB sobre SiO_2/Si e APS.

Tabela 8. Ângulos de contato de avanço obtidos para gotas de água e diiodometano sobre filme de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si e APS. Os valores dos ângulos de contato para o filme de CAB sobre SiO₂/Si foram retirados da literatura [KOSAKA et al., 2007c].

Polímero	SiO ₂ /Si		APS	
	$\theta_{\text{água}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{diiodometano}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{água}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{diiodometano}} (^{\circ})$
CAB	71,5 ± 0,7	52,0 ± 0,5	74 ± 2	45 ± 2
CMCAB	69,5 ± 0,5	50,5 ± 0,5	78 ± 1	42 ± 1

A partir dos dados de $\theta_{\text{diiodometano}}$ e da equação 7 (ver item: fundamentação teórica, equação do modelo harmônico) foi possível determinar o valor da componente dispersiva (γ_s^d) para CAB e CMCAB sobre os diferentes substratos. A partir dos dados de $\theta_{\text{água}}$ e da equação 7 calculou-se o valor da componente polar (γ_s^p) da energia superficial do CMCAB. A Tabela 9 mostra os valores das componentes dispersivas e polares calculadas. Os valores das componentes da energia superficial do polímero CAB sobre silício são referentes a dados já publicados [KOSAKA et al., 2007c].

Tabela 9. Valores das componentes dispersiva γ_s^d e polar γ_s^p da energia superficial do CAB e CMCAB determinadas pelo modelo harmônico sobre diferentes superfícies.

Polímero	SiO ₂ /Si			APS		
	γ_s^d (diiodometano) (mJ/m ²)	γ_s^p (água) (mJ/m ²)	γ_s^{total} (mJ/m ²)	γ_s^d (diiodometano) (mJ/m ²)	γ_s^p (água) (mJ/m ²)	γ_s^{total} (mJ/m ²)
CAB	34,9 ± 0,3	13,2 ± 0,1	48,1 ± 0,3	38 ± 1	11,5 ± 0,7	49,5 ± 1,2
CMCAB	35,1 ± 0,1	14,2 ± 0,3	49,3 ± 0,3	39,1 ± 0,2	9,2 ± 0,2	48,3 ± 0,3

Comparando os valores das componentes da energia superficial para os filmes de CAB e CMCAB sobre SiO₂/Si (Tabela 9), percebe-se que o grupo carboximetil (CM) não influenciou os valores das componentes da energia superficial, provavelmente esses polímeros se estruturam de forma semelhante neste substrato. Para verificar esta hipótese, foram obtidos espectros de SFG dos filmes de CAB e CMCAB preparados em acetato de etila. A Figura 22 mostra os espectros de SFG obtidos para esses ésteres de celulose na região de 2800 a 3000 cm⁻¹.

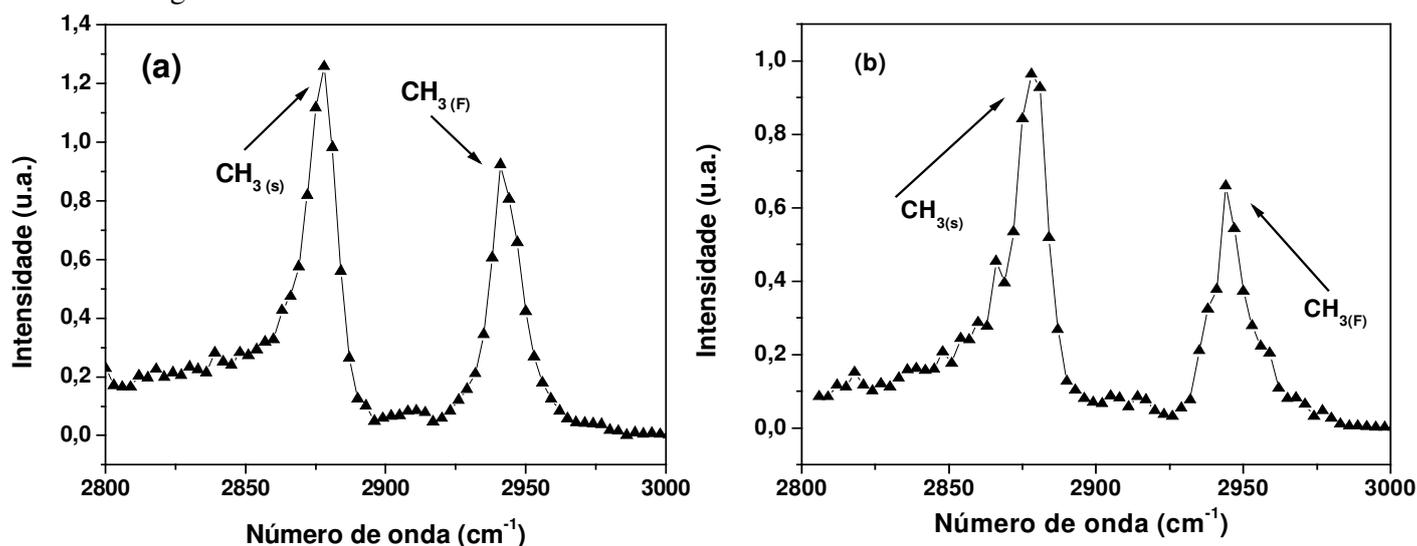


Figura 22. Espectro de SFG obtido em ar para os filmes de (a) CAB e (b) CMCAB preparados com soluções de acetato de etila.

Os espectros obtidos para CAB e CMCAB são semelhantes em relação à intensidade das bandas e da região do espectro o qual se localizam concordando com os resultados obtidos através de medidas de ângulo de contato. As bandas presentes em 2879 cm^{-1} ($\text{CH}_{3(\text{s})}$) e 2942 cm^{-1} ($\text{CH}_{3(\text{F})}$) são atribuídas ao estiramento simétrico do grupo metil e a ressonância de Fermi [CLARKE et al., 2006]. A presença de bandas do grupo metila neste espectro mostra que as cadeias poliméricas do CAB e CMCAB se estruturam na superfície de modo a arranjam os grupos CH_3 perpendicularmente à superfície. O espectro obtido para CAB e CMCAB na região da carbonila (1600 a 1800 cm^{-1}) não apresentou nenhuma banda característica do grupo, indicando que para ambos os polímeros a carbonila está randomicamente orientada na superfície ou não se orienta perpendicularmente na superfície.

Os valores do ângulo de avanço medido com água para os filmes de CMCAB sobre APS são ligeiramente mais hidrofóbicos do que os de CAB. Isto mostra que mais grupos hidrofóbicos do CMCAB (possivelmente o grupo butirato) estão mais orientados para o ar do que para o CAB, apesar de DS_{Bu} para os polímeros serem semelhantes ($\text{DS}_{\text{Bu}} = 1,64$ para CMCAB e $\text{DS}_{\text{Bu}} = 1,65$ para CAB). Um fator que pode ter contribuído para este comportamento é a presença do grupo carboximetil (CM) que favoreceu a interação com o grupo amino da superfície e conseqüentemente aumentou a população de grupos butirato orientados para o ar.

Os valores γ_s^{total} determinados para o CAB e CMCAB são semelhantes $\sim (49,0 \pm 0,5)$ mJ/m^2 , independentemente da composição química da superfície. Entretanto, as componentes da energia superficial para ambos os polímeros são diferentes quando a composição química da superfície é modificada. Para superfícies silanizadas com APS a

componente dispersiva da energia superficial dos polímeros é maior do que aquela determinada para o mesmo polímero sobre SiO₂/Si. Revelando maior exposição de grupos alquila para o ar, o qual resulta em forças de van der Waals mais intensas do que no caso da superfície de SiO₂/Si se reflete na componente polar da energia superficial que decresce em relação à SiO₂/Si. Conclui-se que ao modificarmos a superfície as macromoléculas se orientam ou assumem uma conformação diferente na superfície de APS.

Comparando com os valores das componentes da energia superficial do filme de celulose sobre SiO₂/Si, $\gamma_s^d = 30 \text{ mJ/m}^2$ e para $\gamma_s^p = 35 \text{ mJ/m}^2$ [KONTURI et al. 2007], os valores obtidos para os filmes de CAB e CMCAB são diferentes em relação às componentes da energia superficial. Sendo que essa diferença é mais acentuada na componente polar da energia superficial. A modificação da celulose em ésteres de celulose, no caso CAB e CMCAB, contribui significativamente na diminuição da componente polar da energia superficial. Isto se deve pelo alto grau de substituição de butirato (DS = 1,65) e baixo teor de hidroxilas nos polímeros CAB e CMCAB em relação à celulose. Outro aspecto interessante é que tanto o CAB como o CMCAB apresentaram valor de energia superficial próximo a do colágeno $\sim 48 \text{ mJ/m}^2$ [HARNETT et al., 2007], indicando que as superfícies dos filmes de CAB e CMCAB podem ser bons substratos para adesão e crescimento celular.

O solvente utilizado no preparo dos filmes influenciou as propriedades dos filmes de CMCAB, como a espessura e a morfologia. Para verificarmos se a acetona e o acetato de etila também alteram os valores da energia superficial do filme de um éster de celulose, foram preparados filmes de CAB por adsorção nos dois solventes na concentração de 5 g/L e em seguida foram recozidos por 15h. O CMCAB não foi utilizado neste estudo, pois ele

não adsorve sobre o SiO₂/Si quando se utiliza acetona como solvente e os filmes depositados por revestimento rotacional a partir de soluções em acetona são muito rugosos para determinar a energia superficial do CMCAB.

A Figura 23 mostra a imagens topográficas obtidas por AFM para os filmes de CAB preparado por adsorção em acetato de etila e acetona.

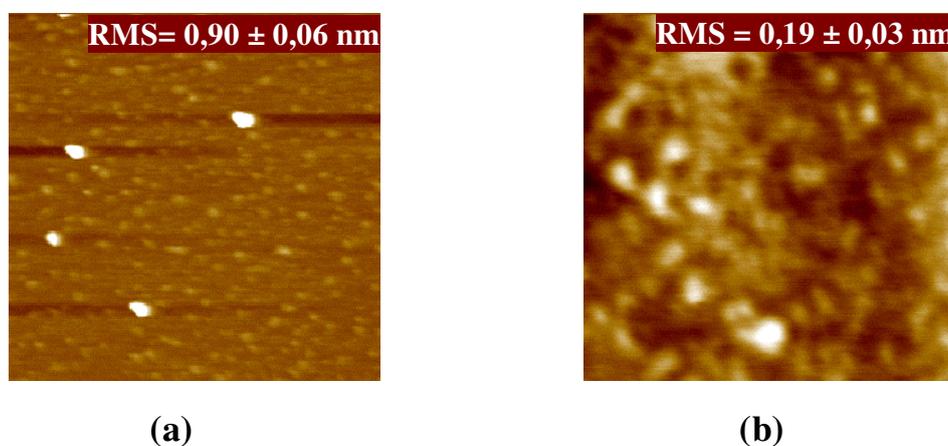


Figura 23. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm^2 para os filmes de CAB preparado em (a) acetato de etila e em (b) acetona por adsorção.

Os filmes de CAB em ambos os solventes são homogêneos e com baixo valor de RMS, logo foram utilizados nas medidas de ângulo de contato para verificarmos o efeito do solvente nas propriedades superficiais do éster de celulose. A Tabela 10 mostra os valores obtidos das componentes da energia superficial dos filmes de CAB preparados em acetona e acetato de etila.

Tabela 10. Valores da componente dispersiva (γ_s^d) e (polar γ_s^p) da energia superficial dos filmes de CAB preparados por adsorção em acetato de etila e em acetona determinadas pelo modelo harmônico sobre SiO₂/Si.

Solventes	Ângulo de contato		Componentes da energia superficial e energia superficial (mJ/m ²)		
	$\theta_{\text{diiodometano}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{água}} (^{\circ})$	γ_s^d (diiodometano)	γ_s^p (água)	γ_s
Acetato de etila	51 ± 1	50 ± 1	34,9 ± 0,3	24,3 ± 0,2	59,2 ± 0,4
Acetona	56 ± 2	42 ± 2	32,4 ± 0,3	29,5 ± 0,3	61,9 ± 0,4

Os valores do ângulo de contato em água mostram que os filmes de CAB adsorvidos a partir de acetona são mais hidrofílicos do que aqueles adsorvidos a partir de acetato de etila. Conseqüentemente, os solventes contribuem para que os valores das componentes da energia superficial sejam diferentes (Tabela 10). Além disso, a técnica (adsorção ou revestimento rotacional) utilizada no preparo do filme de CAB também influencia nas características do filme de CAB preparado com acetato de etila. O valor de $\theta_{\text{água}} (^{\circ})$ obtido para o filme de CAB preparado por adsorção é menor do que quando preparado por revestimento rotacional, indicando uma estruturação diferente das cadeias do CAB na superfície.

Para identificarmos o efeito do solvente na estruturação do filme de CAB, foi obtido o espectro de SFG do filme de CAB preparado em acetona e comparado com o espectro do filme preparado em acetato de etila (Figura 24).

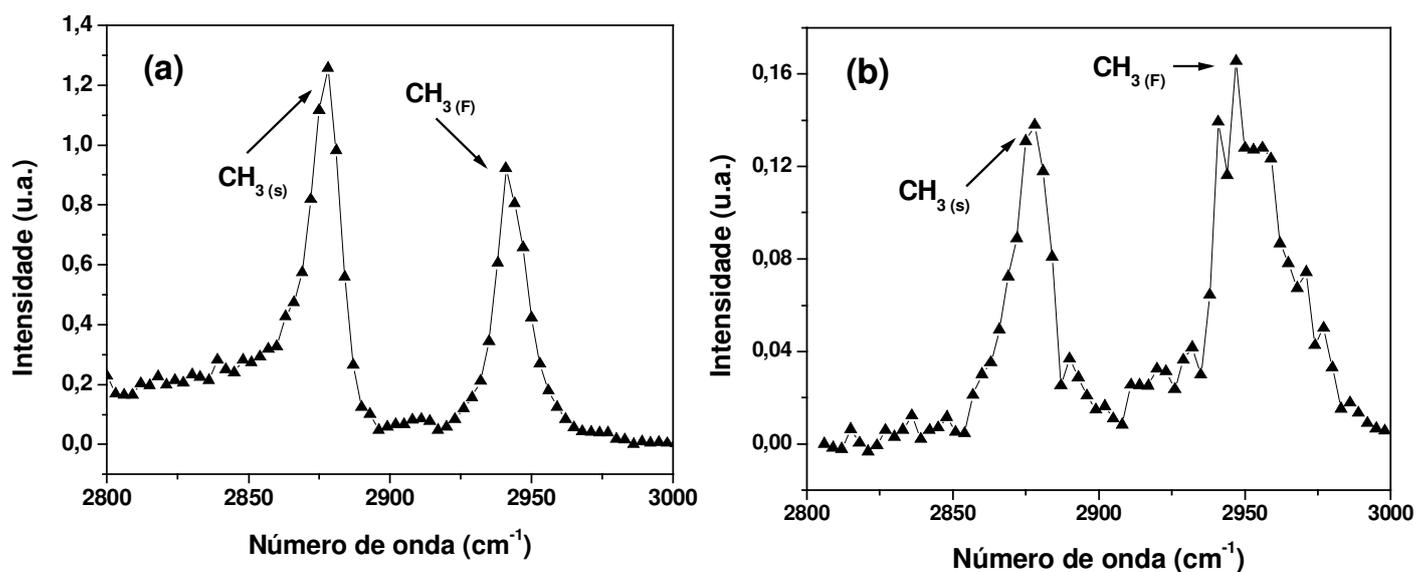


Figura 24. Espectro de SFG obtido a seco para o filme de CAB preparado com (a) acetato de etila e com (b) acetona sobre quartzo.

O espectro obtido para o filme de CAB preparado em acetona (Figura 24) apresenta duas bandas em 2878 cm^{-1} ($\text{CH}_{3(s)}$) e 2945 cm^{-1} ($\text{CH}_{3(F)}$). A diferença em relação ao espectro de SFG do filme de CAB preparado em acetato de etila (Figura 24) é a intensidade das bandas. Este resultado indica que o acetato de etila induz uma maior orientação dos grupos metila perpendicularmente à superfície do que a acetona. Tornando os filmes mais hidrofóbicos do que em filmes oriundos da acetona.

Existe pouca informação na literatura sobre o efeito do solvente na estruturação de filmes finos de biopolímeros sobre substratos sólidos. Recentemente, Wang et al. (2008) utilizando a técnica de SFG realizou este estudo com um polímero de PMMA modificado com grupos perfluoralquil utilizando tolueno, ciclohexano e trifluorbenzeno como solventes. Os autores verificaram que a orientação dos grupos metil e metileno das cadeias do polímero na superfície dependia do solvente utilizado. Sendo que este comportamento foi atribuído à diferente estruturação do polímero nesses solventes. Entretanto aqueles

autores não exploraram a contribuição da interação do solvente com a superfície nas características do filme.

Para verificarmos o papel da interação das moléculas de acetona e acetato de etila com a superfície de SiO₂/Si e posteriormente nas características superficiais do filme de CAB, foram obtidos espectros de SFG *in situ* desses solventes sobre SiO₂/Si (Figura 25). O espectro de SFG para a acetona (Figura 25) mostra um forte sinal em 2923 cm⁻¹, atribuído ao modo vibracional simétrico do grupo metil da acetona [CHEN et al., 2005]. No caso do acetato de etila a intensidade do sinal foi muito fraca dificultando uma análise mais precisa. Portanto, estes resultados mostram maior afinidade da acetona pelo SiO₂/Si do que o acetato de etila, como previsto por Chaudhury (1996).

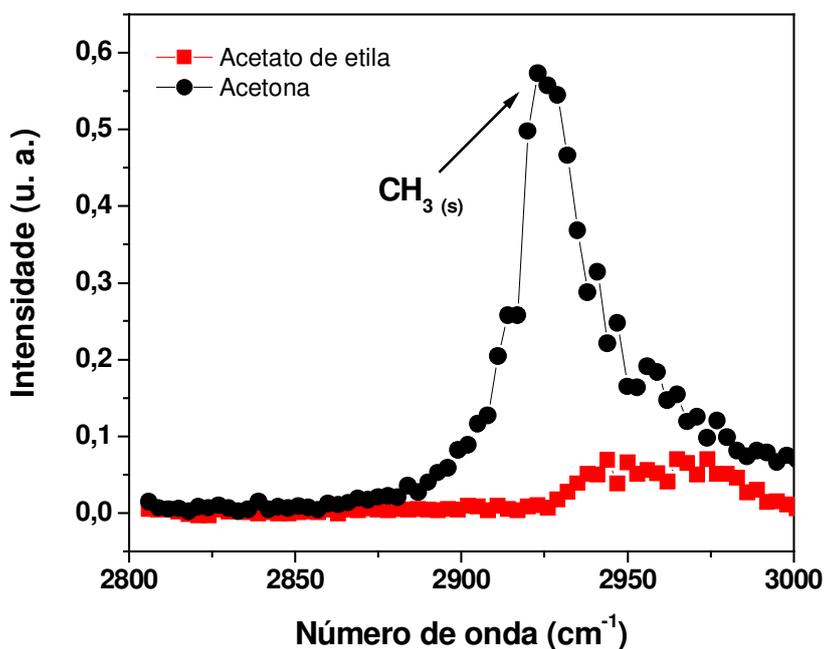


Figura 25. Espectro de SFG obtido *in situ* para (●) acetona e (■) acetato de etila sobre quartzo.

Para verificar se ocorre a formação de uma camada das moléculas de acetona sobre SiO_2/Si , foi obtido após a análise *in situ*, o espectro de SFG da acetona em ar. A Figura 26 mostra uma banda em 2955 cm^{-1} de menor intensidade em relação ao espectro de SFG da acetona *in situ* característica do grupo metila da acetona evidenciando a presença de moléculas de acetona na superfície de SiO_2/Si mesmo após a remoção do substrato que antes estava em contato com o solvente.

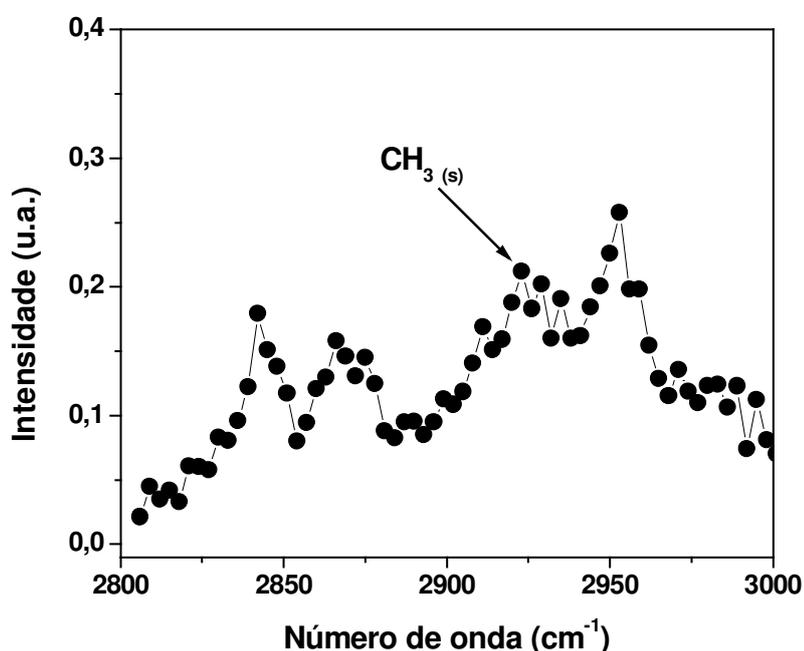


Figura 26. Espectro de SFG obtido em ar para acetona sobre quartzo.

A forte adsorção de moléculas de acetona sobre SiO_2/Si cria uma nova camada entre o CAB e o SiO_2/Si fazendo com que parte dos grupos butirados do polímero se oriente para esta camada, tornando o filme mais hidrofílico. A Figura 27 ilustra a estruturação do filme de CAB sobre SiO_2/Si quando se utiliza acetona e acetato de etila.

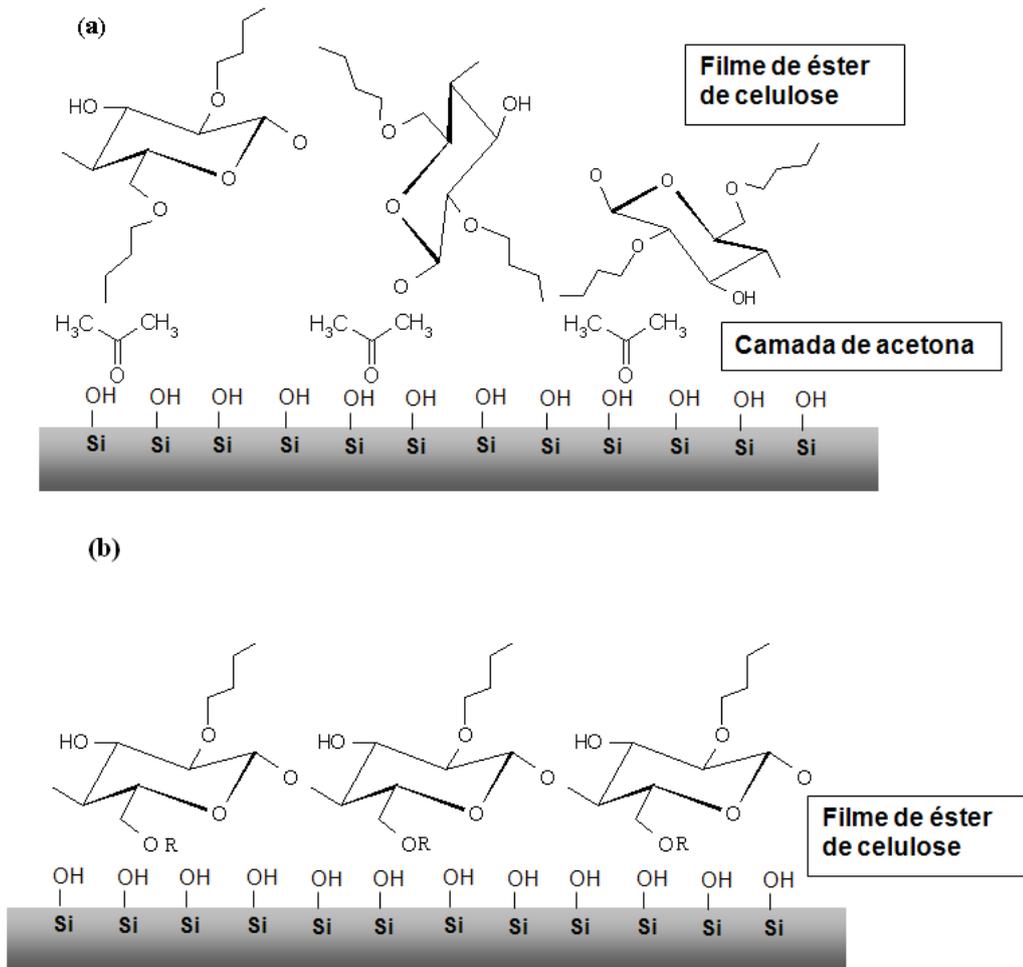


Figura 27. Ilustração da formação de filmes de CAB sobre SiO_2/Si utilizando como solvente (a) acetona e (b) acetato de etila. Onde R em (b) pode ser os grupos OH ou COCH_3 .

6.5 Adsorção de lisozima sobre os filmes finos de CAB e CMCAB

A lisozima é uma proteína encontrada na clara de ovo, no leite e em algumas plantas. Possui as dimensões cristalográficas de 4,5 x 3 x 3 nm [ZHOU et al., 2003] e ponto isolétrico (pI) 11 [BELEGRINOU et al., 2008]. A lisozima tem sido muito estudada devido à sua ação bactericida [FRANCK, 1992], os trabalhos estão geralmente direcionados à sua imobilização em filmes poliméricos como quitosana [PARK et al. 2004] e carboximetil celulose [MOCANU et al., 2000] e posterior avaliação da sua atividade enzimática. O mecanismo da ação enzimática da lisozima está relacionado com a hidrólise das ligações β -1,4 entre N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico das paredes celulares das bactérias [FRANCK, 1992].

A Figura 28 mostra os valores médios da quantidade de lisozima adsorvida (Γ_{lisozima}) sobre os filmes de CAB e CMCAB adsorvidos sobre APS e SiO₂/Si, na concentração de 1 g/L, em pH = 6,4 ± 0,1 em soluções preparadas em água pura e em duas concentrações diferentes de sal (NaCl), a 25°C.

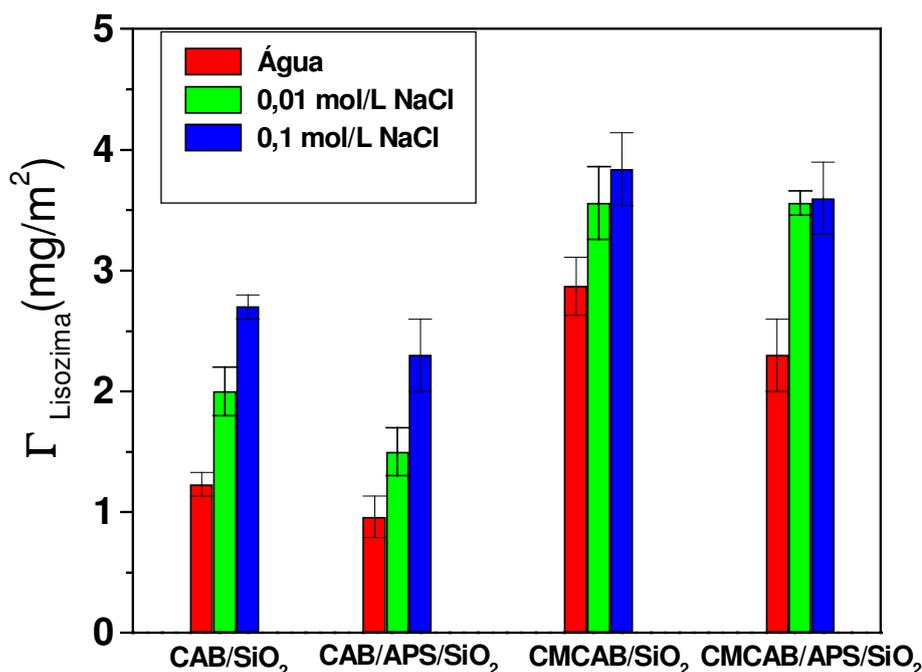


Figura 28. Valores médios da quantidade de lisozima adsorvida (Γ_{lisozima}) sobre os filmes de CAB e CMCAB depositados sobre APS e SiO₂/Si, a partir de soluções de lisozima ($c = 1,0 \text{ g/L}$) preparadas em água pura (coluna vermelha), 0,01 mol/L NaCl (coluna verde), 0,10 mol/L NaCl (coluna azul), a 25°C e $\text{pH} = 6,4 \pm 0,1$.

Comparando os valores obtidos de Γ_{lisozima} , a lisozima adsorveu em maior quantidade sobre o filme de CMCAB do que sobre o filme de CAB, independentemente da superfície ao qual foi preparado o filme. Isto indica que os valores das energias superficiais e suas componentes não tem efeito sobre a adsorção da lisozima. A preferencial interação entre lisozima e CMCAB pode ser explicada pela presença do grupo carboximetil (CM) do CMCAB. Em meio aquoso, grupos carboximetil orientados para a interface sólido-líquido podem estar desprotonados, gerando cargas negativas na superfície. Como o ponto isoelétrico da lisozima (pI) é 11, em $\text{pH} = 6$ a lisozima encontra-se com carga líquida positiva, favorecendo interações eletrostáticas entre filme de CMCAB e lisozima.

A quantidade de lisozima adsorvida sobre uma superfície mais hidrofílica que os filmes de CMCAB e CAB, como a superfície de SiO₂/Si, cujo ângulo de contato da água é de $(5 \pm 1)^\circ$ sobre esta superfície, é $\Gamma = 2,0 \text{ mg/m}^2$ [SILVA et al., 2009] na concentração de

1g/L em água pura. Comparando este valor com os valores de $\Gamma_{\text{lisoizima}}$ sobre os filmes de CAB e CMCAB, a lisoizima adsorveu mais sobre os filmes de CMCAB do que nos filmes de CAB. Este resultado reforça a proposta de que a maior afinidade da proteína pelo derivado de celulose, no caso o CMCAB, se deve pela presença do grupo carboximetil.

O efeito da força iônica sobre a adsorção da lisoizima foi investigado como mostra a Figura 28. A $\Gamma_{\text{lisoizima}}$ aumentou quando foi adicionado NaCl em todos os sistemas estudados e esta tendência é mantida quando se aumentou a força iônica do meio de 0,01 mol/L de NaCl para 0,1 mol/L. Este comportamento pode ser explicado pela desidratação das moléculas de lisoizima devido à solvatação de íons do sal ao redor das proteínas [CHEN, SUN, 2003]. Logo as moléculas de lisoizima tendem a agregar em solução e provavelmente adsorvem sobre as superfícies do CAB e CMCAB por interações hidrofóbicas.

Para avaliar se o processo de adsorção da lisoizima é reversível ou irreversível, todos os filmes obtidos para a lisoizima foram deixados em contato com os seus respectivos solventes água ou solução salina (0,01 mol/L ou 0,1 mol/L de NaCl). Este estudo foi realizado através de medidas de elipsometria, avaliando se houve uma variação na espessura das camadas de lisoizima sobre os filmes de CAB e CMCAB. Para todos os sistemas investigados, não houve dessorção da lisoizima após 18h de contato com os solventes, indicando que o processo é irreversível.

A imobilização de lisoizima sobre os filmes de ésteres de celulose modificou a molhabilidade dos filmes de CAB e CMCAB como pode ser visto na Tabela 11.

Tabela 11. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para lisozima imobilizada sobre as superfícies de ésteres de celulose.

Superfícies	Filmes de lisozima								
	Água			0,01 mol/L NaCl			0,1 mol/L NaCl		
	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$
CAB/SiO ₂	47 ± 2	29 ± 1	18 ± 2	49 ± 1	30 ± 1	19 ± 1	44 ± 1	25 ± 1	19 ± 1
CAB/APS/SiO ₂	47 ± 2	30 ± 1	17 ± 2	55 ± 1	36 ± 2	19 ± 2	53 ± 1	32 ± 2	21 ± 2
CMCAB/SiO ₂	52 ± 1	31 ± 1	21 ± 1	46 ± 2	28 ± 2	18 ± 3	51 ± 2	30 ± 2	21 ± 3
CMCAB/APS/SiO ₂	55 ± 2	33 ± 1	22 ± 2	50 ± 1	35 ± 2	15 ± 2	55 ± 1	38 ± 2	17 ± 2

Após a adsorção da lisozima, houve um decréscimo dos ângulos de contato em relação aos filmes dos ésteres de celulose (ver Tabela 6), tornando os filmes mais hidrofílicos. Provavelmente, a lisozima orientou os grupos hidrofóbicos para a superfície dos ésteres de celulose e conseqüentemente, os grupos hidrofílicos para a interface sólido-ar.

A presença do sal na solução não teve uma influencia na orientação das moléculas de lisozima adsorvidas sobre todos os filmes de CAB e CMCAB, como pode ser visto na Tabela 11. Para inferir sobre a morfologia dos filmes de lisozima e descrever o processo de adsorção da proteína foram feitas medidas de microscopia de força atômica (AFM). As Figuras 29 e 30 mostram as imagens obtidas para os filmes de lisozima sobre os filmes de CAB e CMCAB.

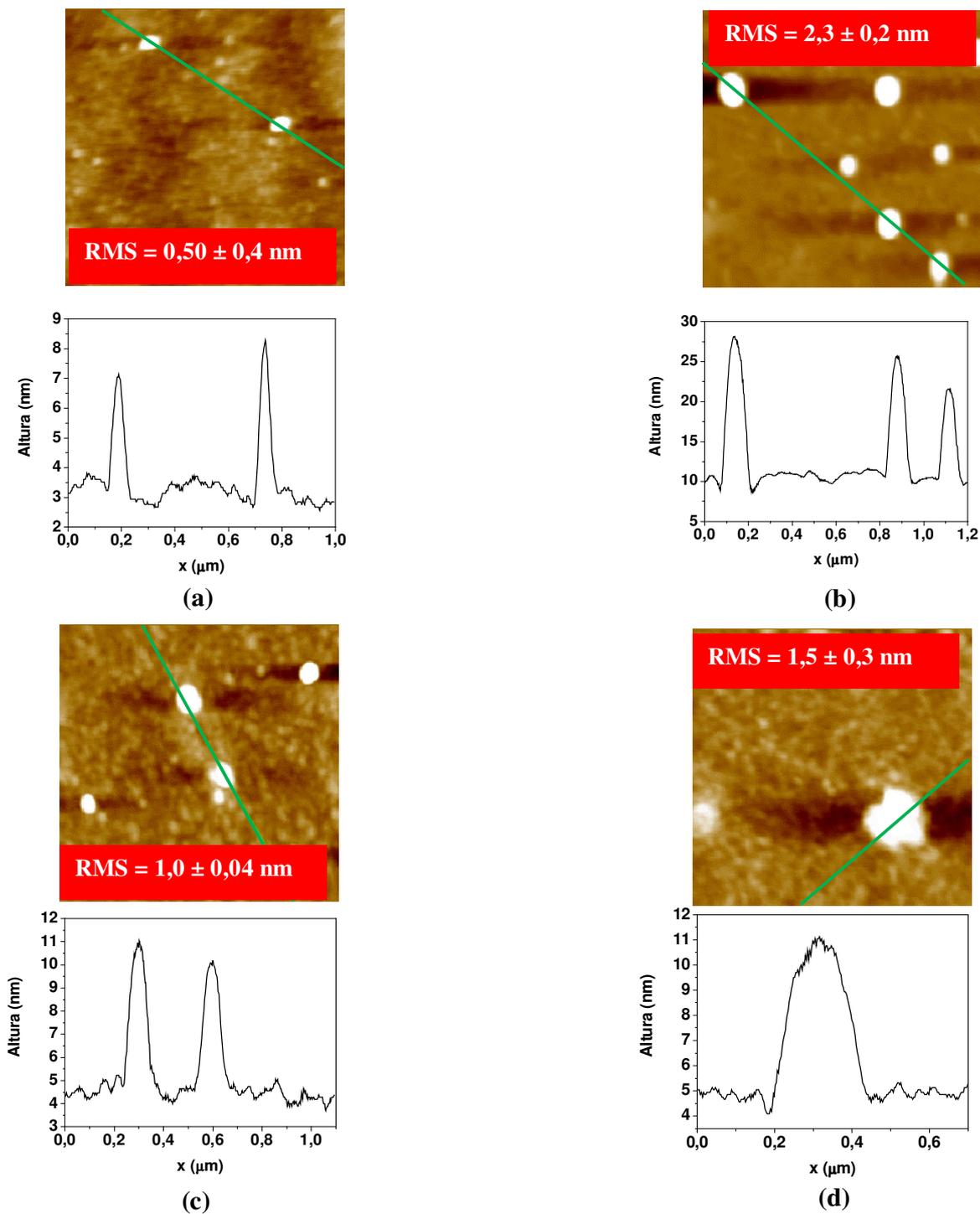


Figura 29. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de lisozima preparados em (a) água, $Z = 6$ nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 20$ nm, sobre CAB/SiO₂/Si e para os filmes preparados em (c) água, $Z = 8$ nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 9$ nm, sobre CAB/APS/SiO₂/Si.

A Figura 29 mostra as imagens de lisozima adsorvida sobre os filmes de CAB nos diferentes substratos e em duas condições de preparo das soluções usadas para a proteína (água ou solução 0,1 mol/L de NaCl). A Figura 29 (a) e 29 (c) mostram a lisozima adsorvida sobre CAB/SiO₂/Si e CAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. Neste caso, a lisozima foi dissolvida em água. Percebe-se uma estruturação da lisozima em partículas de altura distintas de 4 a 5 nm sobre CAB/SiO₂/Si e de 6 a 7 nm sobre CAB/APS/SiO₂/Si. Considerando as dimensões cristalográficas da lisozima de 4,5 nm x 3 nm x 3 nm [ZHOU et al., 2003], pode-se concluir que as estruturas correspondem a agregados de lisozima. Os valores de RMS obtidos por AFM mostram que os filmes de lisozima adsorvidos a partir de água sobre CAB/SiO₂/Si são menos rugosos do que sobre CAB/APS/SiO₂/Si.

As imagens das Figuras 29 (b) e 29 (d) mostram a formação de estruturas maiores de lisozima sobre a superfície dos filmes de CAB quando se adiciona NaCl (0,1 mol/L) na solução. Estas estruturas variam de altura: de 10 a 15 nm sobre CAB/SiO₂/Si e possui uma altura de 7 nm sobre CAB/APS/SiO₂/Si, como pode ser visto nos cortes transversais das imagens topográficas. Isto mostra que o sal induziu a aglutinação das moléculas de lisozima sobre os filmes de CAB quando foi adicionado às soluções da proteína. Aumentando a quantidade de lisozima adsorvida. As rugosidades dos filmes de lisozima são maiores do que os filmes obtidos com soluções de água pura como mostrado na Figura 30.

A Figura 30 mostra as imagens de lisozima adsorvida sobre os filmes de CMCAB nos diferentes substratos. A Figura 30 (a) e 30 (c) mostram lisozima adsorvida sobre CMCAB/SiO₂/Si e CMCAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. Neste caso, a solução de lisozima foi preparada em água. Percebe-se uma estruturação da lisozima em partículas de altura distintas de 3 a 5 nm sobre CMCAB/SiO₂/Si e de 3,5 nm sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si. Os valores de RMS obtidos mostram que os filmes de lisozima sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si são mais rugosos do que sobre CMCAB/SiO₂/Si.

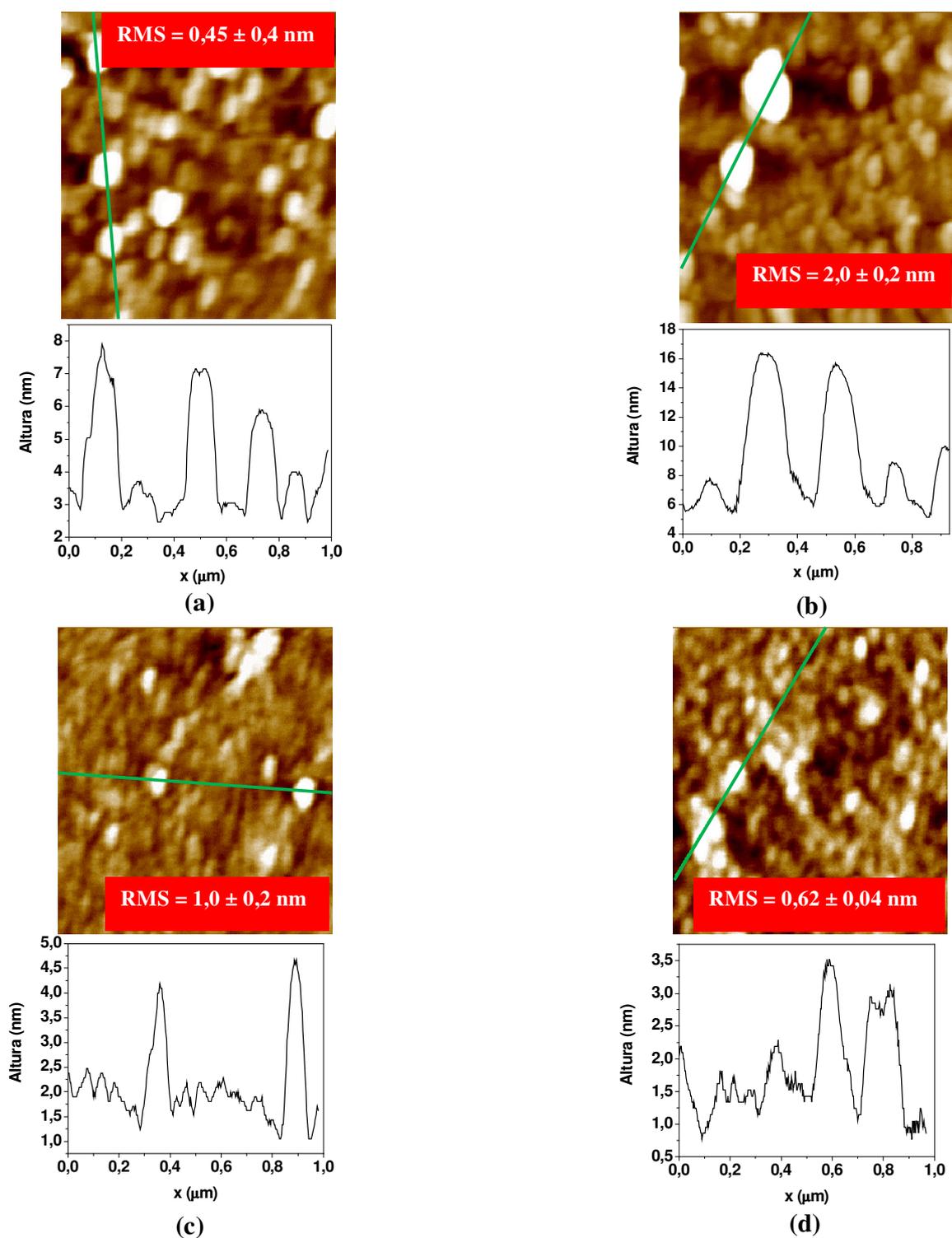


Figura 30. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de lisozima preparados em (a) água, $Z = 6$ nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 12$ nm, sobre CMCAB/ SiO_2/Si e para os filmes preparados em (c) água, $Z = 4$ nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 3$ nm, sobre CMCAB/APS/ SiO_2/Si .

As imagens das Figuras 30 (b) e 30 (d) mostram a formação de grandes estruturas de lisozima sobre a superfície dos filmes de CMCAB/SiO₂/Si quando se adiciona NaCl (0,1 mol/L) na solução. Estes aglomerados têm uma altura: de 10 nm e distintamente sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si a lisozima adsorveu em partículas com alturas em torno de 2,5 nm, como pode ser visto nos cortes transversais das imagens topográficas. A presença do (NaCl) novamente induziu a formação de agregados de lisozima em solução, os quais adsorveram sobre os filmes de CMCAB/SiO₂/Si, aumentando a quantidade de lisozima adsorvida.

Para verificar possíveis mudanças na conformação da lisozima após ser imobilizada sobre os filmes de éster de celulose (CAB e CMCAB), testes enzimáticos foram realizados usando uma dispersão de bactérias como substrato. Neste estudo, foram usados os filmes de lisozima preparados com 0,1 mol/L de NaCl sobre os filmes de CAB/SiO₂/Si e CMCAB/SiO₂/Si. A atividade enzimática foi avaliada com o decréscimo da turbidez da dispersão da bactéria e a atividade da lisozima adsorvida foi comparada com a lisozima livre em solução.

Após 1h de contato dos filmes de lisozima com a dispersão, a turbidez (τ) da dispersão diminuiu. Os valores de $\Delta\tau$ encontrados foram: $\Delta\tau = (23 \pm 1) \%$ para lisozima adsorvida sobre CAB/SiO₂/Si e para lisozima adsorvida sobre CMCAB/SiO₂/Si $\Delta\tau = (29 \pm 1) \%$. Em comparação com a lisozima imobilizada sobre uma superfície mais hidrofílica, no caso silício, a sua atividade é de $(49 \pm 4) \%$ [SILVA et al., 2009]. Indicando uma menor atividade sobre superfícies de éster de celulose. De fato, a baixa atividade enzimática pode ser explicada pela agregação das moléculas de lisozima como mostrado nas imagens de AFM (Figuras 29 e 30).

Após o experimento, os filmes de lisozima foram monitorados por elipsometria, com o intuito de verificar se houve dessorção da proteína. Como discutido anteriormente, a lisozima adsorve irreversivelmente sobre CAB e CMCAB, o que possibilitou o estudo da reutilização dos filmes. Para este estudo somente o filme de lisozima sobre CMCAB/SiO₂/Si foi utilizado, pois não houve uma diferença significativa entre os filmes de CAB e CMCAB. Após 1h de contato com a dispersão, a atividade da lisozima manteve-se, $\Delta\tau = (32 \pm 2) \%$, mostrando que mesmo após armazenagem em um dessecador a 25°C por um dia, a lisozima continuou ativa.

Para a lisozima livre em solução foi obtido o valor de $\Delta\tau = (100 \pm 1) \%$, semelhante ao encontrado na literatura [SILVA et al., 2009] indicando que a atividade da lisozima é bem menor quando imobilizada sobre os filmes de CAB e CMCAB do que livre. A preservação da atividade enzimática da lisozima é dependente da preservação de sua estrutura nativa, que ocorre quando as ligações de dissulfeto são mantidas intactas e a de resíduos de triptofano 62 e 63, além disso, o mecanismo da ação da lisozima é realizado pelos resíduos hidrofílicos Glu35 e Asp52 que devem também ser mantidos ativos [FRANCK, 1992]. Portanto, a lisozima ao adsorver sobre os filmes de CAB e CMCAB não mantém completamente a sua estrutura nativa, visto que a adsorção ocorre com formação de agregados.

6.6 Adsorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre os filmes finos de CAB e CMCAB

A albumina é uma das proteínas mais abundante no sangue e bastante utilizada em diagnósticos [CARTER, HO, 1994]. Além disso, é a proteína mais utilizada para estudar

processos de adsorção de proteínas [LI et al., 2006; ISHIGURO et al.,2005]. A dimensão da molécula de BSA é de 4 nm x 4 nm x 14 nm [ZHANG et al., 1998]

A Figura 31 mostra os valores médios da quantidade de albumina do soro bovino (BSA) adsorvida sobre os filmes de CAB e CMCAB preparados por adsorção sobre SiO₂ e APS, na concentração de 1g/L com o pH = 6,4 ± 0,1 em soluções preparadas em água pura e em duas concentrações 0,01mol/L e 0,1 mol/l de NaCl, a 25°C.

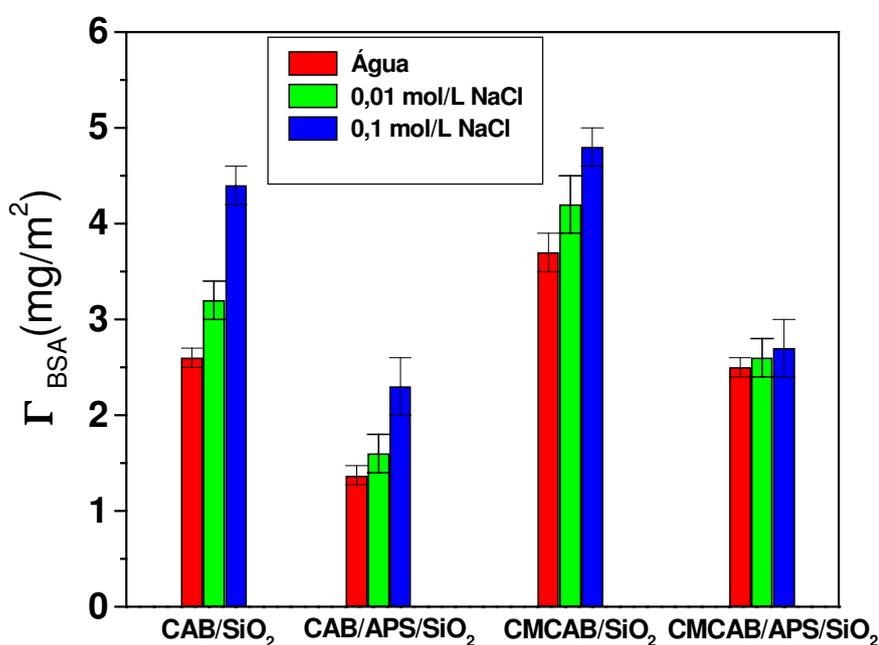


Figura 31. Valores médios da quantidade de BSA adsorvida, Γ_{BSA} (mg/m²), sobre os filmes de CAB e CMCAB depositados sobre APS e SiO₂/Si, a partir de soluções de lisozima (c = 1,0 g/L) preparadas em água pura (coluna vermelha), 0,01 mol/L NaCl (coluna verde), 0,10 mol/L NaCl (coluna azul), a 25°C e pH = 6,4 ± 0,1.

A adsorção de BSA foi mais favorecida sobre filmes de CMCAB e CAB depositados sobre SiO₂/Si do que aqueles depositados sobre APS. A Tabela 9 mostra que as componentes polares das energias superficiais (γ^p_s) de CAB e CMCAB são maiores quando a superfície é SiO₂/Si. Como BSA é uma proteína predominantemente hidrofílica [CARTER, HO, 1994], as interações polares são favorecidas quando γ^p_s for maior. Além

disso, os valores de Γ_{BSA} sobre CMCAB são ligeiramente maiores do que aqueles sobre CAB. Portanto, a presença do grupo carboximetil (CM) no CMCAB provavelmente intensifica as interações do tipo dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio com a proteína. Por outro lado, BSA tem pI ~ 5,5 [CARTER, HO, 1994], portanto em pH= 6,4 a BSA encontra-se com carga líquida negativa, o que poderia provocar certa repulsão eletrostática pelos grupos carboxilatos da superfície de CMCAB.

O efeito da força iônica sobre a adsorção da BSA foi investigado como mostra a Figura 31. Os valores de Γ_{BSA} aumentaram quando a força iônica do meio aumentou em todos os sistemas estudados. Este comportamento pode ser devido à agregação das moléculas de BSA com o aumento da força iônica. Como ocorrido com a lisozima.

O processo de adsorção da BSA é irreversível, pois todos os filmes de BSA foram deixados em contato com os seus respectivos solventes água ou solução salina (0,01 mol/L ou 0,1 mol/L de NaCl) e após 18h de contato com os solventes não foi observada nenhuma dessorção de BSA.

A Tabela 12 mostra que após a adsorção de BSA os filmes de CAB e CMCAB se tornaram mais hidrofílicos que os filmes dos ésteres de celulose originais (ver Tabela 6). Dessa forma, ao adsorver as moléculas de BSA provavelmente orientaram para a superfície os seus grupos hidrofóbicos interagindo com os ésteres de celulose e os seus grupos hidrofílicos ficaram orientados para a interface sólido-ar. Contudo, o decréscimo do ângulo de contato para a BSA foi bem menor quando adsorvida sobre os filmes de CAB e CMCAB do que a lisozima. Isto pode ser explicado pela diferença na estruturação das moléculas de BSA sobre os filmes.

Tabela 12. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para a BSA imobilizada sobre os filmes de éster de celulose.

Superfícies	Filmes de BSA								
	Água			0,01 mol/L NaCl			0,1 mol/L NaCl		
	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$
CAB/SiO ₂ /Si	50 ± 1	40 ± 1	10 ± 1	55 ± 1	39 ± 2	16 ± 2	49 ± 1	38 ± 2	11 ± 2
CAB/APS/SiO ₂ /Si	65 ± 1	40 ± 2	25 ± 2	62 ± 2	43 ± 1	19 ± 2	63 ± 1	41 ± 1	22 ± 1
CMCAB/SiO ₂ /Si	51 ± 1	37 ± 2	14 ± 2	49 ± 1	33 ± 1	16 ± 2	50 ± 1	35 ± 2	15 ± 2
CMCAB/APS/SiO ₂ /Si	58 ± 1	30 ± 2	28 ± 2	60 ± 1	39 ± 1	21 ± 2	65 ± 2	35 ± 2	30 ± 3

A presença do sal na solução não teve uma influencia na orientação das moléculas de BSA adsorvidas sobre todos os filmes de CAB e CMCAB, como pode ser visto na Tabela 12. Para inferir sobre a morfologia dos filmes de BSA e descrever o processo de adsorção da proteína foram feitas medidas de microscopia de força atômica (AFM). As Figuras 32 e 33 mostram as imagens obtidas para os filmes de BSA sobre os filmes de CAB e CMCAB.

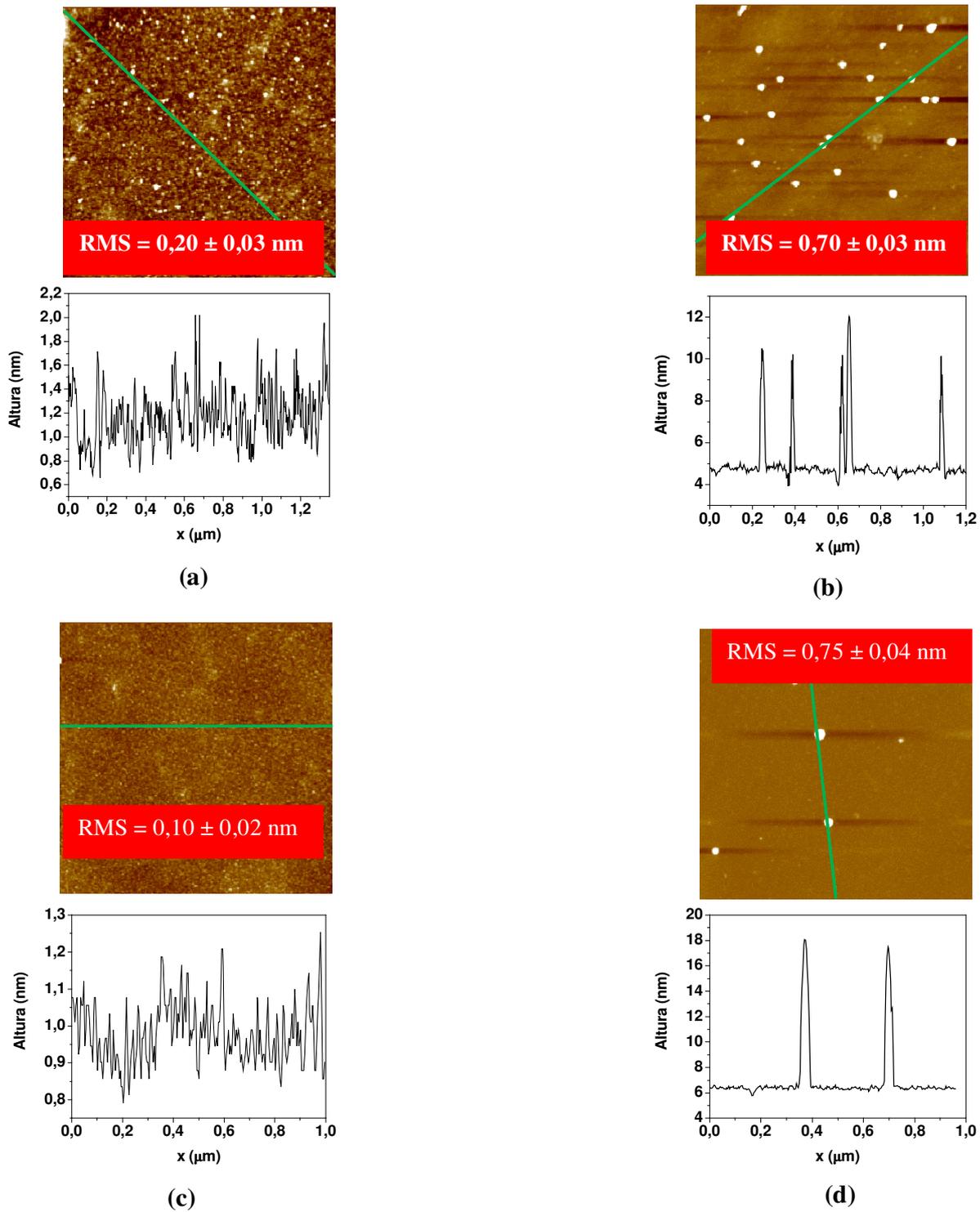


Figura 32. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de BSA preparados em (a) água, $Z = 2,5 \text{ nm}$, e em (b) $0,1 \text{ mol/L}$ de NaCl , $Z = 9 \text{ nm}$, sobre $\text{CAB}/\text{SiO}_2/\text{Si}$ e para os filmes preparados em (c) água, $Z = 2 \text{ nm}$, e em (d) $0,1 \text{ mol/L}$ de NaCl , $Z = 12 \text{ nm}$, sobre $\text{CAB}/\text{APS}/\text{SiO}_2/\text{Si}$.

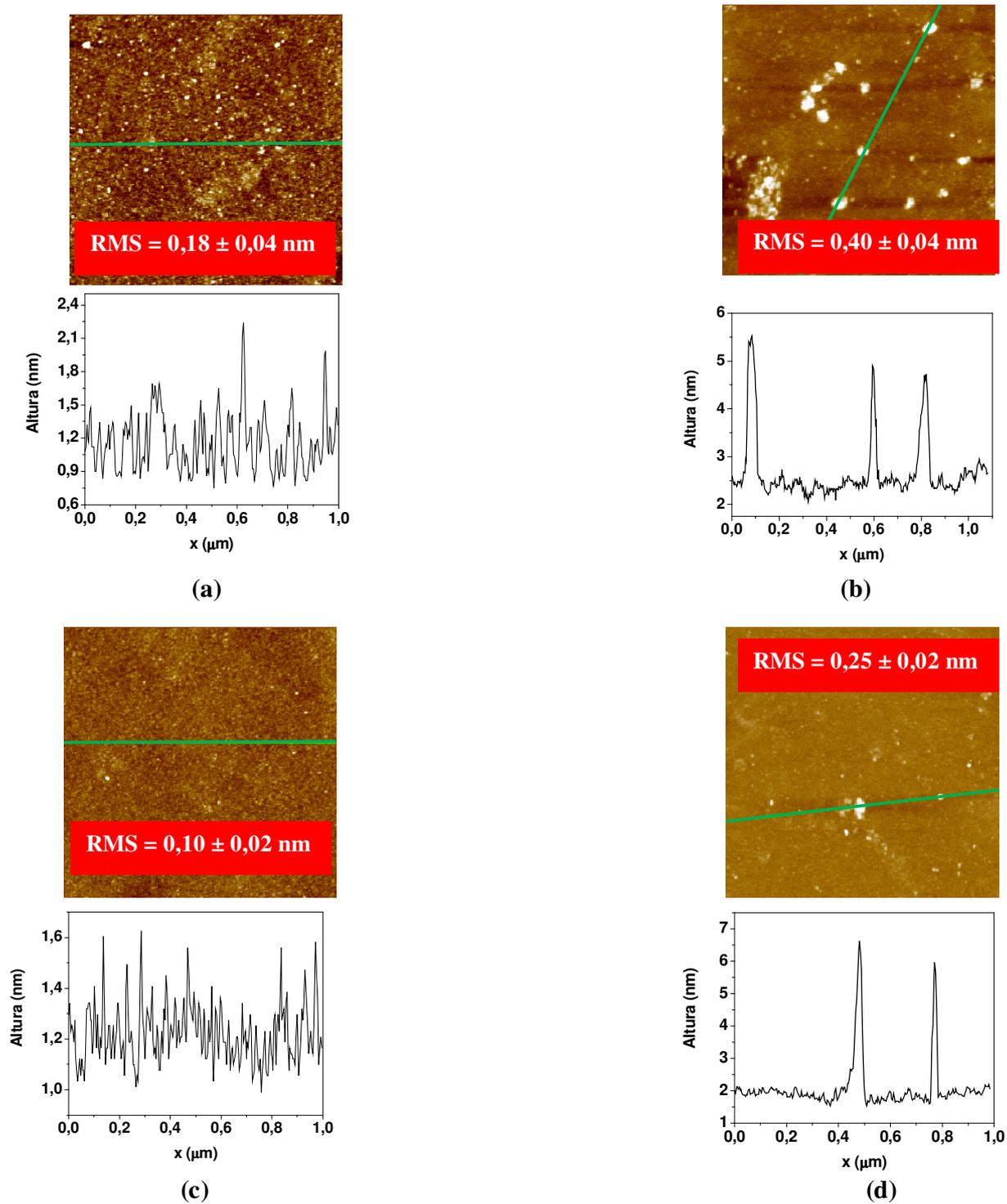


Figura 33. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de BSA preparados em (a) água, $Z = 2,5$ nm, e em (b) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 5$ nm, sobre CMCAB/ SiO_2/Si e para os filmes preparados em (c) água, $Z = 2,5$ nm, e em (d) 0,1 mol/L de NaCl, $Z = 7$ nm, sobre CMCAB/APS/ SiO_2/Si .

As Figuras 32 (a), 32 (c) e 33 (a) e 33 (c) mostram as imagens de BSA adsorvida em filmes preparados somente com água sobre: CAB/SiO₂/Si, CAB/APS/SiO₂/Si, CMCAB/SiO₂/Si e CMCAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. Os filmes de BSA adsorvidos a partir de água são muito uniformes e lisos, podendo indicar uma possível desnaturação das moléculas de BSA adsorvidas. Comportamento semelhante foi observado para BSA adsorvida sobre superfície de ouro [TENCER et al. 2007].

As Figuras 32 (b) e 32 (d) mostram as imagens de BSA adsorvida a partir de NaCl 0,1 mol/L sobre CAB/SiO₂/Si e CAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. As imagens de AFM mostram a formação de agregados de BSA com distintas alturas, como pode ser visto nos cortes transversais das imagens topográficas. A formação desses agregados contribuiu para o aumento da quantidade de BSA adsorvida. As Figuras 32 (b), 32 (d) mostram que existem estruturas das moléculas de BSA com altura de 6 a 8 nm sobre CAB/SiO₂/Si e agregados de 10 a 12 nm sobre CAB/APS/SiO₂/Si, o que faz com que os filmes de BSA sejam mais rugosos do que os filmes de CAB (Figura 20).

As Figuras 33 (b) e 33 (d) mostram as moléculas de BSA com altura de 2 a 3 nm sobre CMCAB/SiO₂/Si e de 4 a 5 nm sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si. O tamanho das moléculas de BSA adsorvidas sobre os filmes de CMCAB são menores em relação às moléculas de BSA adsorvidas sobre CAB, indicando uma estruturação distinta sobre os substratos.

6.7 Adsorção de lectinas sobre os filmes finos de CAB e CMCAB

Lectinas são proteínas encontradas em vários tecidos de plantas e microorganismos e têm a capacidade de aglutinar eritrócitos através de ligações específicas

a determinados carboidratos e identificar cromossomos defeituosos. Devido às essas propriedades essas proteínas são sendo muito estudadas para serem usadas como biosensores [GILBOA-GARBER et al. 1998; DAM, BREWER, 2002].

Concanavalina A é uma lectina extraída da semente do feijão que se liga às unidades α -D-manose e α -D-glicose de carboidratos. Possui duas unidades de 237 grupos de aminoácidos com 26000 g/mol cada uma [REEKE et al. 1975]. Nos pH 4,5 e 6,0 ela se encontra numa forma dímera e em pH maior que 7 é um tetrâmero [DAM e BREWER 2002]. É bem documentado que a concanavalina A em pH menor do que 5 tem uma dimensão de 3 nm x 4,5 nm x 7,5 nm e em pH neutro ou acima de 7 tem dimensões de 6 nm x 7 nm x 7 nm [DONG et al., 2008]. O ponto isoelétrico concanavalina A está entre 4,5 e 5,5 [KITANO et al. 2009]. Para que a concanavalina A se ligue à manose ou a glicose, dois íons devem estar presentes no meio, os íons cálcio (Ca^{+2}) e os íons manganês (Mn^{+2}). Os íons (Mn^{+2}) têm a função de se coordenarem aos resíduos Glu8, His24, Asp10 e Asp19 da unidade monomérica da concanavalina A e a duas moléculas de água. Os íons (Ca^{+2}) coordenam aos resíduos Asp10, Asp19, Tyr12 e Arg228 e com outras duas moléculas de água [GRIMALDI, SYKES, 1975].

A jacalina é uma lectina encontrada na semente da jaca, com massa molar de 66000 g/mol possuindo a forma de um tetrâmero em pH neutro. Na sua estrutura existem de 7 a 10% de carboidratos, não contém resíduos de cisteína e tem uma sequência de 133 aminoácidos de cadeias α e de 20 a 21 aminoácidos de cadeia β . Apresenta pI entre 4 e 8,5. Diferentemente da concanavalina A, a jacalina é um ligante específico para a galactose e para que esta interação ocorra não é necessário a presença de íons metálicos [KABIR, 1998].

As aplicações da jacalina estão relacionadas ao diagnóstico de câncer, pois essa lectina pode se ligar especificamente ao antígeno-T (Gal β 1-3GalNAc), presente em 85% dos carcinomas humanos [JEYAPRAKASH et al., 2002], além disso é usada no isolamento de glicoproteínas plasmáticas, na investigação de nefropatias e na avaliação da imunidade de indivíduos infectados com HIV- 1 [KABIR, 1998].

Apesar de encontrarmos na literatura trabalhos relacionados às propriedades biológicas da jacalina e da concanavalina A, não foi estudado ainda o processo de adsorção dessas lectinas sobre filmes de éster de celulose.

A Tabela 13 mostra os valores médios da quantidade de lectina adsorvida, Γ (mg/m²), em soluções preparadas em água para a jacalina (0,15 g/L) e em soluções preparadas em CaCl₂ (0,01 mol/L) e MnCl₂ (0,01 mol/L) para a concanavalina (1 g/L) no pH = 6,0 \pm 0,1 sobre os filmes de CAB e CMCAB preparados por adsorção sobre SiO₂/Si e APS.

Tabela 13. Quantidade adsorvida, Γ (mg/m²), de jacalina e concanavalina A sobre os filmes de éster de celulose, a 25°C.

Superfícies	Lectinas	
	Jacalina	Concanavalina A
	Γ (mg/m ²)	
CAB/SiO ₂ /Si	4,2 \pm 0,2	5,3 \pm 0,1
CAB/APS/SiO ₂ /Si	3,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2
CMCAB/SiO ₂ /Si	5,6 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2
CMCAB/APS/SiO ₂ /Si	4,8 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1

Comparando os valores obtidos de Γ (mg/m²) para a adsorção de jacalina sobre os filmes de ésteres de celulose, percebe-se que os valores mais altos de Γ foram obtidos para os filmes de CAB e CMCAB adsorvidos sobre SiO₂/Si, cujos valores de γ_s^p (Tabela 9) são maiores do que aqueles determinados para APS. Logo, a adsorção de jacalina e

concanavalina A foi mais pronunciada nos filmes mais hidrofílicos dos ésteres de celulose (ver Tabelas 6 e 9). Comparando os polímeros CAB e CMCAB, a jacalina e a concanavalina A adsorverem preferencialmente sobre os filmes de CMCAB, indicando que as lectinas têm uma maior interação com o CMCAB do que com o CAB. Provavelmente interações do tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo regem a adsorção da jacalina e sobre esses substratos.

Considerando os filmes de CAB e CMCAB sobre APS que são mais hidrofóbicos do que quando adsorvidos sobre SiO₂/Si, a menor adsorção das lectinas sobre esses filmes se deve pela natureza das interações proteína-substrato que possivelmente são do tipo van der Waals.

Todos os filmes obtidos para as lectinas foram deixados em contato com os seus respectivos solventes água pura para jacalina e solução salina (0,01 mol/L de CaCl₂ e MnCl₂) para concanavalina A para identificar se o processo de adsorção é irreversível ou não. Após as medidas de espessura dos filmes das lectinas, foi constatado que para todos os sistemas investigados, não houve dessorção da jacalina e da concanavalina A após 18h de contato com os solventes, indicando que o processo de adsorção é irreversível.

Para verificarmos a orientação das moléculas de lectinas sobre os filmes de CAB e CMCAB foram feitas medidas de ângulo de contato, como é mostrado na Tabela 14.

Tabela 14. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para os filmes de jacalina e concanavalina A sobre as superfícies de ésteres de celulose.

Superfícies	Filmes de lectinas					
	Jacalina			Concanavalina A		
	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$
CAB/SiO ₂ /Si	47 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	50 ± 1	23 ± 1	17 ± 1
CAB/APS/SiO ₂ /Si	53 ± 1	38 ± 1	15 ± 1	53 ± 1	29 ± 2	24 ± 2
CMCAB/SiO ₂ /Si	38 ± 1	24 ± 1	14 ± 1	48 ± 1	26 ± 1	22 ± 1
CMCAB/APS/SiO ₂ /Si	43 ± 1	20 ± 2	23 ± 2	47 ± 1	25 ± 2	22 ± 2

A Tabela 14 mostra que as lectinas ao serem imobilizadas sobre os diferentes filmes de CAB e CMCAB, orientaram para a superfície os seus grupos hidrofóbicos interagindo com os ésteres de celulose e os seus grupos hidrofílicos ficaram orientados para a interface sólido-ar tornando os filmes de ésteres de celulose mais hidrofílicos (ver Tabela 6). Os altos valores de histerese evidenciam que os filmes são bem heterogêneos.

Imagens topográficas dos filmes das lectinas foram obtidas para inferirmos sobre a sua estruturação sobre os ésteres de celulose, as Figuras 34 e 35 mostram essas imagens.

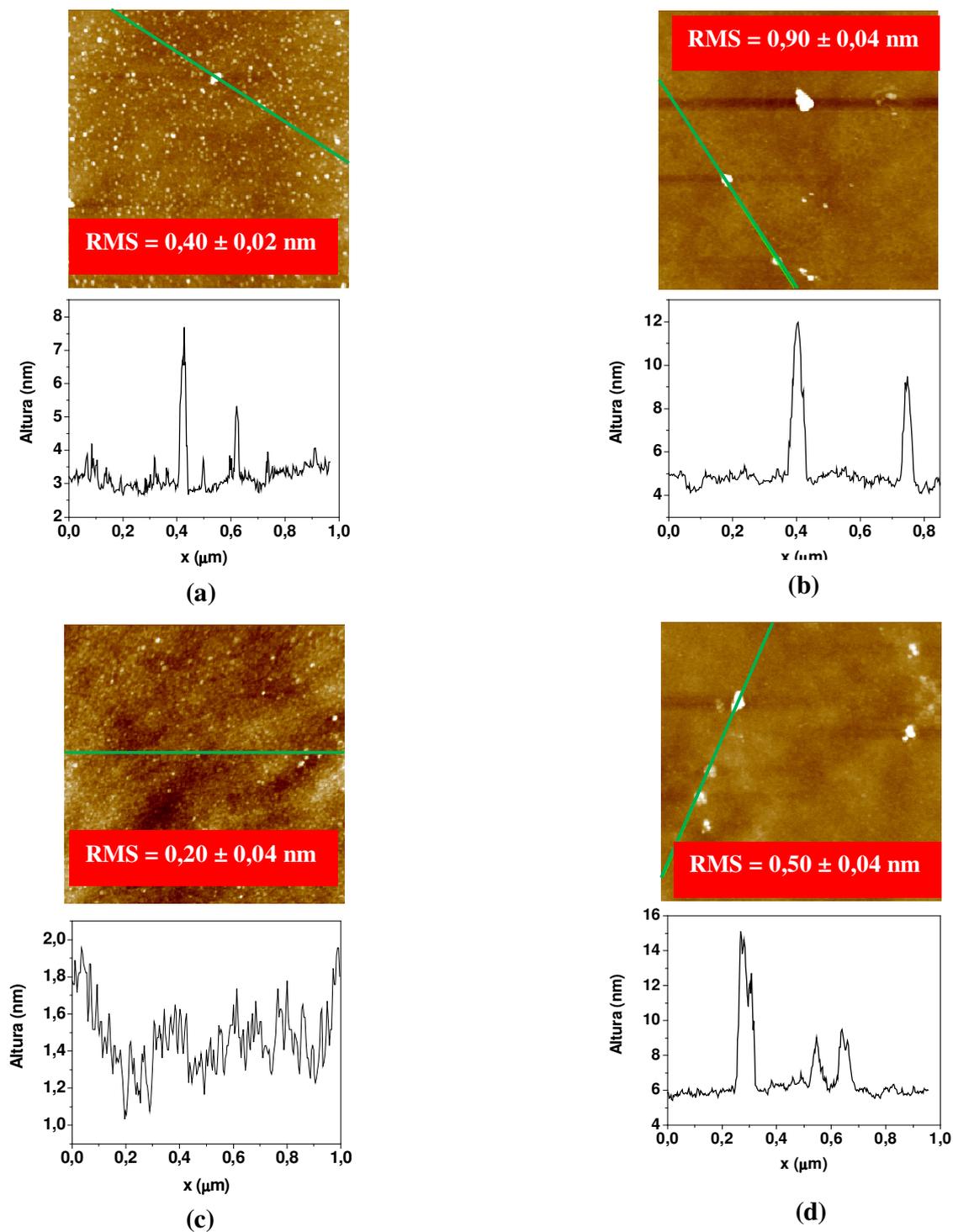


Figura 34. Imagens topográficas obtidas por AFM (1 x1) μm², com correspondente secção transversal, para os filmes de jacalina sobre (a) CAB/ SiO₂/Si, Z = 6 nm, (b) CAB/APS/ SiO₂/Si, Z= 9 nm e sobre (c) CMCAB/ SiO₂/Si, Z= 3 nm e (d) CMCAB/APS/ SiO₂/Si, Z = 11 nm.

As Figuras 34 (a), 34 (b) e 34 (c) e 34 (d) mostram as imagens de jacalina adsorvida sobre: CAB/SiO₂/Si, CAB/APS/SiO₂/Si, CMCAB/SiO₂/Si e CMCAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. Percebe-se que houve a formação de estruturas com distintas alturas, como pode ser visto nos cortes transversais das imagens topográficas e que as moléculas de jacalina se adsorveram aleatoriamente sobre as superfícies. As Figuras 34 (a), 34 (b) mostram que existem moléculas de jacalina com alturas de 2 e 4,5 nm sobre CAB/SiO₂/Si e aglomerados de 8 a 5 nm sobre CAB/APS/SiO₂/Si. A Figura 34 (c) mostra que não foi possível identificar as moléculas de jacalina sobre CMCAB/SiO₂/Si, provavelmente sobre esta superfície a proteína desnatura formando uma camada homogênea, como discutido para a BSA. A rugosidade (RMS) do filme, Figura 34 (c) não alterou significativamente a rugosidade do filme de CMCAB. Entretanto, ao adsorver sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si, Figura 34 (d), a jacalina formou estruturas com 9 nm de altura, indicando uma maior agregação sobre essa superfície do que sobre CMCAB/SiO₂/Si .

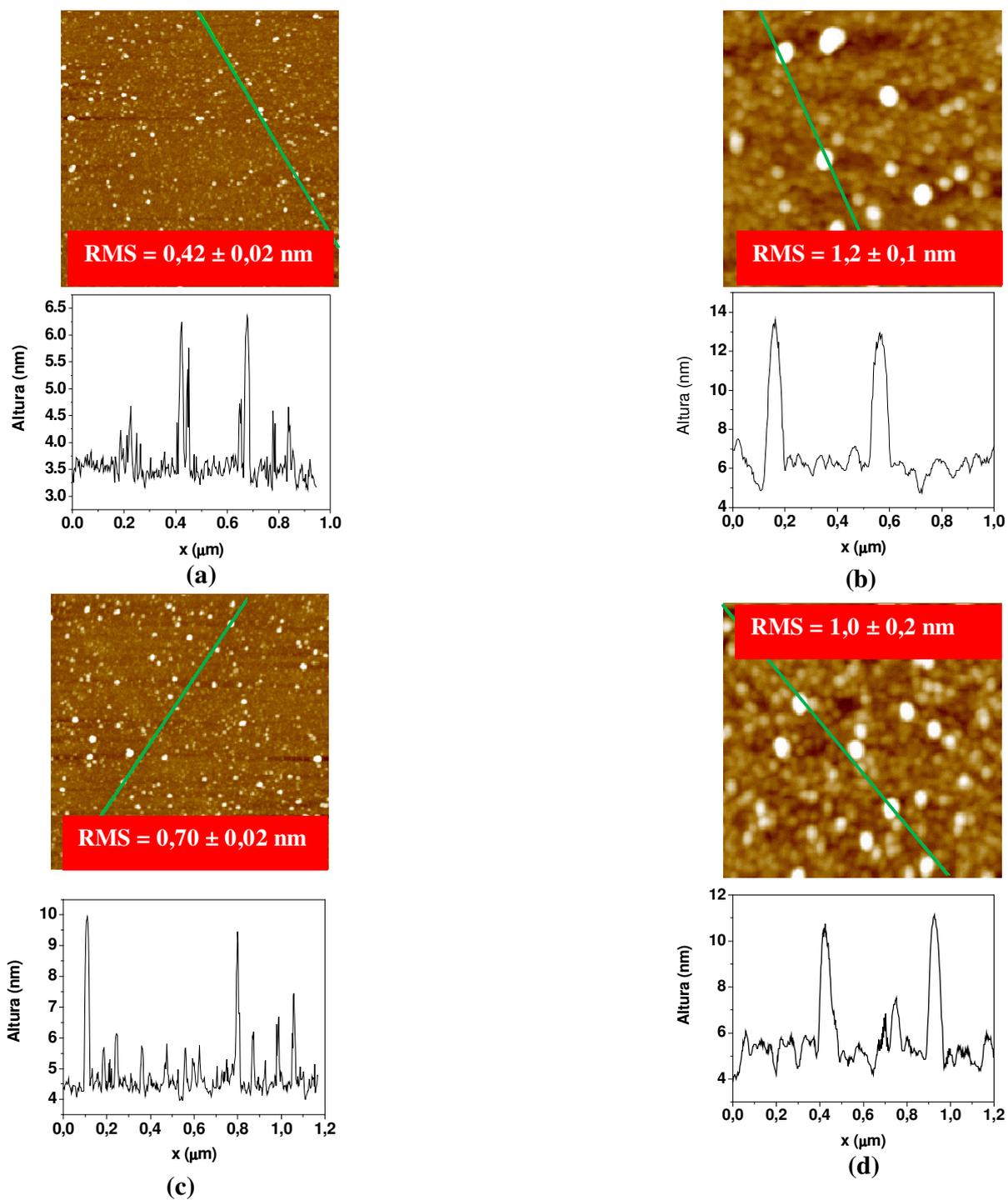


Figura 35. Imagens topográficas obtidas por AFM (1×1) μm^2 , com correspondente secção transversal, para os filmes de concanavalina A sobre (a) CAB/ SiO₂/Si, Z = 7 nm, (b) CAB/APS/ SiO₂/Si, Z = 12 nm e sobre (c) CMCAB/ SiO₂/Si, Z = 9 nm e (d) CMCAB/APS/ SiO₂/Si, Z = 10 nm.

As Figuras 35 (a), 35 (b) mostram as imagens de concanavalina A adsorvida sobre: CAB/SiO₂/Si, CAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. Percebe-se que os filmes são formados por estruturas com distintas alturas, como pode ser visto nos cortes transversais das imagens topográficas. A Figura 35 (a) mostra que existem moléculas de concanavalina A com alturas de 2,5 nm, indicando que ao adsorver sobre essas superfícies a concanavalina A muda de conformação, visto que a sua forma nativa não é preservada, dimensões de 6 x 7 x 7 nm [Shoham et al.1979]. Contudo, sobre CAB/APS/SiO₂/Si, Figura 35 (b), as moléculas de concanavalina A têm alturas de 7 a 8 nm sobre As rugosidades dos filmes obtidas por AFM são maiores do que os filmes de CAB (Figura 20) evidenciando a mudança de morfologia após a adsorção da concanavalina A.

As Figuras 35 (c) e 35 (d) mostram a estruturação das moléculas de concanavalina A sobre CMCAB/SiO₂/Si e CMCAB/APS/SiO₂/Si, respectivamente. As alturas das moléculas variam de 2 a 6 nm sobre CMCAB/SiO₂/Si mostrando que a concanavalina A modifica a sua estrutura nativa ao adsorver sobre este filme e alturas de 6 e 7 nm sobre CMCAB/APS/SiO₂/Si, sendo que neste sistema as dimensões da concanavalina A são mais próximas de sua forma nativa.

De todos os sistemas estudados, o que se mostrou mais promissor para o desenvolvimento de dispositivos para aplicações biotecnológicas é o filme de CMCAB recoberto com concanavalina A. Este resultado é bastante interessante, porque vírus de dengue tem reconhecimento específico por filmes desta lectina [PEREIRA et al., 2008].

6.8 Efeito da rugosidade dos filmes de CAB e CMCAB sobre a adsorção de proteínas

O conhecimento sobre o efeito da rugosidade sobre a adsorção de biomoléculas é de grande relevância biotecnológica, pois este permite controlar a quantidade de material adsorvido adequado a finalidade desejada. Por exemplo, somente superfícies rugosas formadas por colágeno adsorvido são adequadas para a adesão celular [DUPONT-GILLAIN et al., 2004].

Existem muitos trabalhos na literatura estudaram o efeito da rugosidade da superfície na adsorção de proteínas. Na maioria deles, o estudo é realizado sobre superfícies metálicas nanoestruturadas de interesse biotecnológico, pois estas superfícies são biocompatíveis e geralmente utilizadas em implantes [MULLER et al., 2001; GALLI et al., 2001; DOLATSHAHI-PIROUZ et al., 2008; HOVGAARD et al., 2008] e com filmes poliméricos de diferentes rugosidades [HAN et al., 2003; LIU et al., 2007; KHANG et al., 2007; KISS et al., 2008; BLANCO et al., 2008]. Contudo, existem poucas informações sobre o efeito da rugosidade de ésteres de celulose sobre o comportamento de adsorção de biomoléculas.

Baseado em resultados experimentais, Rechendorff et al. (2006) tiraram 4 importantes conclusões sobre o processo de adsorção de biomoléculas sobre superfícies rugosas:

- i) A adsorção de uma biomolécula irá aumentar sobre uma superfície rugosa simplesmente devido ao aumento da área superficial. Este resultado é esperado para superfícies onde a escala da rugosidade é maior ou comparável ao tamanho da proteína e se a proteína possui uma forma

globular e a rugosidade da superfície não promove mudanças conformacionais.

- ii) Se a rugosidade da superfície facilita a desnaturação da proteína e por acaso a área ocupada pela proteína desnaturada é maior do que as dimensões da proteína no estado nativo, a adsorção da proteína pode ser abaixo do que o esperado ou decair com o aumento da rugosidade.
- iii) Proteínas podem adsorver em diferentes orientações, buscando a orientação usualmente favorável, uma das maneiras de isso ser feito é a proteína adsorver perpendicularmente na superfície, pois nessa conformação é possível ter interações adicionais na superfície. Logo, o aumento da rugosidade da superfície pode resultar no aumento da fração de proteínas orientadas perpendicularmente e posteriormente na adsorção, pois dessa forma as proteínas precisariam de uma área menor para adsorver.
- iv) A adsorção da proteína pode induzir agregação resultando na formação de duas ou mais camadas de proteínas.

Para estudar o efeito da rugosidade dos filmes de CAB e CMCAB sobre a adsorção de biomoléculas foram escolhidos filmes com características variadas, a partir das quais foram definidos como lisos ou rugosos, como mostra a Tabela 15.

Tabela 15. Características dos filmes de CAB e CMCAB utilizados para investigar o efeito da rugosidade (RMS) sobre a adsorção de biomoléculas. Onde: (a) filme de CAB adsorvido a partir de acetato de etila (C = 1,5 g/L, ver item), (b) filme de CAB depositado por revestimento rotacional a partir de acetona (C = 5 g/L), (c) filme de CMCAB adsorvido a partir de acetato de etila (C = 1,5 g/L, ver item) e (d) filme de CMCAB depositado por revestimento rotacional a partir de acetona (C = 5 g/L).

Características dos filmes					
Filmes	Espessura (nm)	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_R(^{\circ})$	$\Delta\theta(^{\circ})$	RMS (nm)
Filme liso de CAB ^a	0,52 ± 0,02	50 ± 1	43 ± 1	7 ± 1	0,30 ± 0,03
Filme rugoso de CAB ^b	34 ± 1	73 ± 1	56 ± 2	17 ± 2	6 ± 1
Filme liso de CMCAB ^c	1,9 ± 0,2	60 ± 1	43 ± 1	17 ± 1	0,20 ± 0,02
Filme rugoso de CMCAB ^d	39 ± 1	90 ± 2	44 ± 2	46 ± 3	16 ± 1

Os ângulos de contato obtidos para os filmes (Tabela 15) mostram que os filmes rugosos são mais hidrofóbicos que os filmes lisos de CAB e CMCAB. Isto ocorre devido à presença de ar nos vales que influencia a medida do ângulo de contato [MIWA, et al., 2000; ERBIL, et al., 2003]. Os altos valores de histerese corroboram com os valores de RMS obtidos por AFM. Os filmes rugosos de CAB (Figura 36 a) exibem vales variam de 10 a 15 nm de profundidade. A Figura 36 (b) mostra imagens típicas de AFM para filmes de CMCAB rugosos, cujos vales apresentam profundidade entre 30 a 55 nm, superiores aos filmes de CAB preparado com este mesmo solvente. Estas características dos filmes de CAB e CMCAB fazem com que os filmes sejam mais rugosos do que os filmes preparados com acetato de etila.

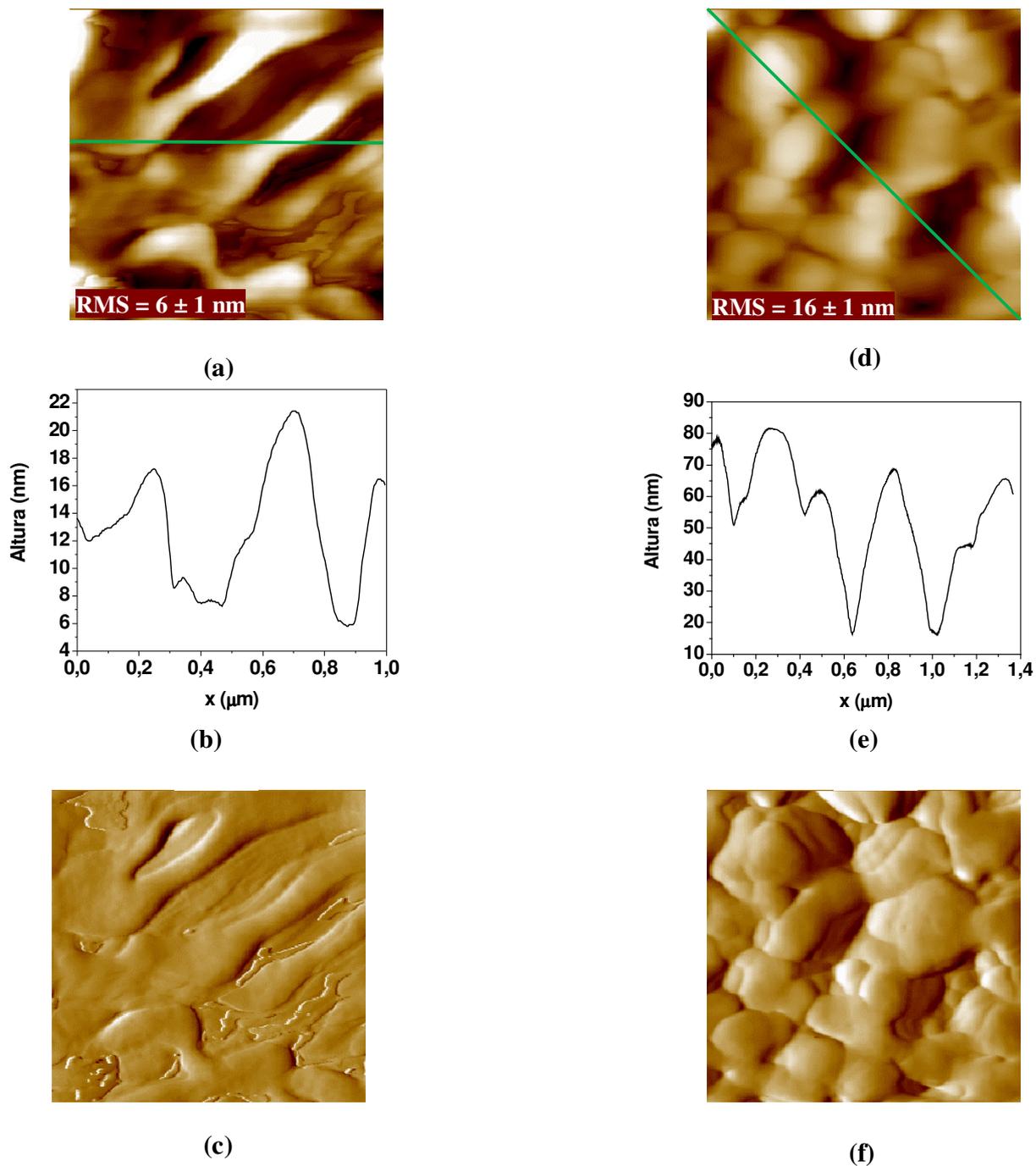


Figura 36. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 25$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 3$ nm, do filme de CAB preparado por spin coating em acetona (5g/L) sobre SiO_2/Si e (d) topográfica, $Z = 100$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 9$ nm, do filme de CMCAB preparado por spin coating em acetona (5g/L) sobre SiO_2/Si .

Antes dos filmes serem usados para a adsorção de proteínas, foi feito um experimento para verificar se os polímeros não desorviam em contato com água, meio de preparo das soluções protéicas. Os filmes foram deixados em contato com a água por 17h. Após medir as espessuras das camadas de CAB e CMCAB, notou-se que as espessuras dos filmes mantiveram o mesmo valor, indicando que os polímeros não desorviam. As condições de preparo das soluções das proteínas (soluções aquosas na concentração de 1g/L, exceto para a jacalina que foi usada na concentração de 0,15 g/L e tempo de adsorção de 17h) foram mantidas as mesmas para experimentos de adsorção sobre os filmes lisos e rugosos.

A Figura 37 mostra os valores de Γ (mg/m^2) obtidos para as proteínas lisozima, BSA, concanavalina A e jacalina sobre os filmes rugosos e lisos de CAB e CMCAB.

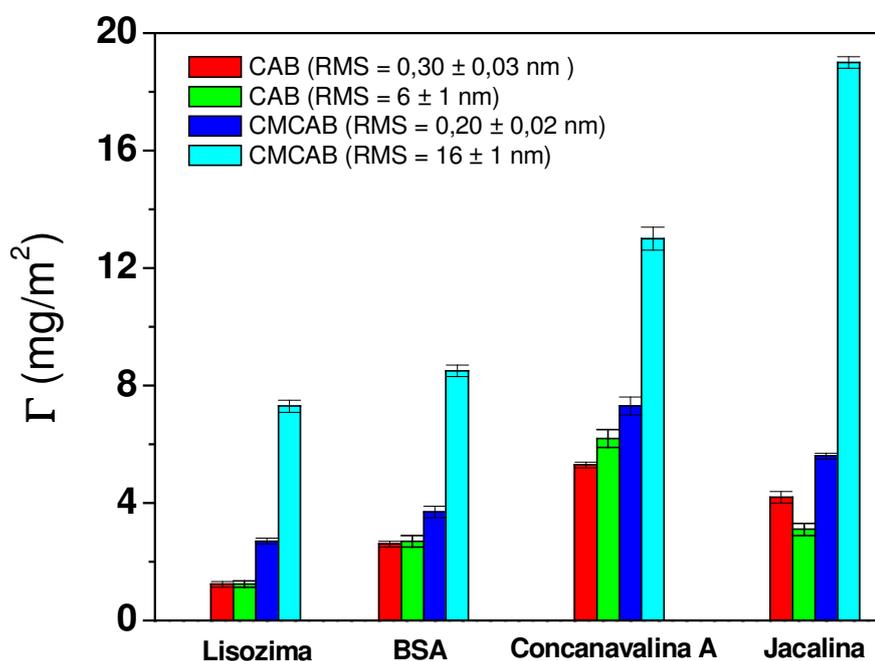


Figura 37. Quantidade de material adsorvido, $\Gamma(\text{mg}/\text{m}^2)$, das proteínas : lisozima, BSA , concanavalina A e jacalina sobre os filmes lisos e rugosos de CAB e CMCAB sobre SiO_2/Si , a 25°C .

Considerando os filmes de CMCAB, todas as proteínas adsorverem mais sobre os filmes rugosos que os lisos, seguindo a ordem de adsorção: lisozima < BSA < concanavalina A < jacalina. Provavelmente, o aumento da adsorção das proteínas ocorre pelo aumento da área superficial do filme rugoso de CMCAB em relação seu ao filme liso, pois o valor de RMS obtido para filmes rugosos é em média 80 vezes maior que aquele determinado para os filmes lisos. Esta tendência foi verificada na adsorção da albumina do soro humano (HSA) e da fibronectina sobre filmes rugosos de PEO (Polióxidoetileno) [MULLER et al., 2006]. Contudo o efeito da rugosidade de filmes de CAB sobre a adsorção de proteínas não foi significativo, apesar do valor de RMS obtido para filmes rugosos ser em média 20 vezes maior que aquele determinado para os filmes lisos. Estes resultados demonstram que a quantidade de biomoléculas adsorvida depende de ambos rugosidade e composição química da superfície.

Ensaio de dessorção foram realizados com os filmes das proteínas e em nenhum caso ocorreu a remoção das proteínas nos filmes. Para complementar o estudo foram obtidas imagens de AFM para inferir na mudança de morfologia dos filmes rugosos de CAB e CMCAB após a adsorção das proteínas.

A Figura 38 mostra imagens típicas de AFM obtidas para a lisozima e BSA adsorvidas sobre filmes rugosos de CAB. De uma forma geral, as proteínas não alteram a morfologia do filme, como pode ser visto nos cortes transversais nas imagens. Isto já era esperado porque as profundidades dos vales são maiores que as dimensões das proteínas. Porém, especialmente nas imagens de amplitude (Figuras 38c e 38f) nota-se o aparecimento de pequenas estruturas esféricas, atribuído à adsorção das proteínas.

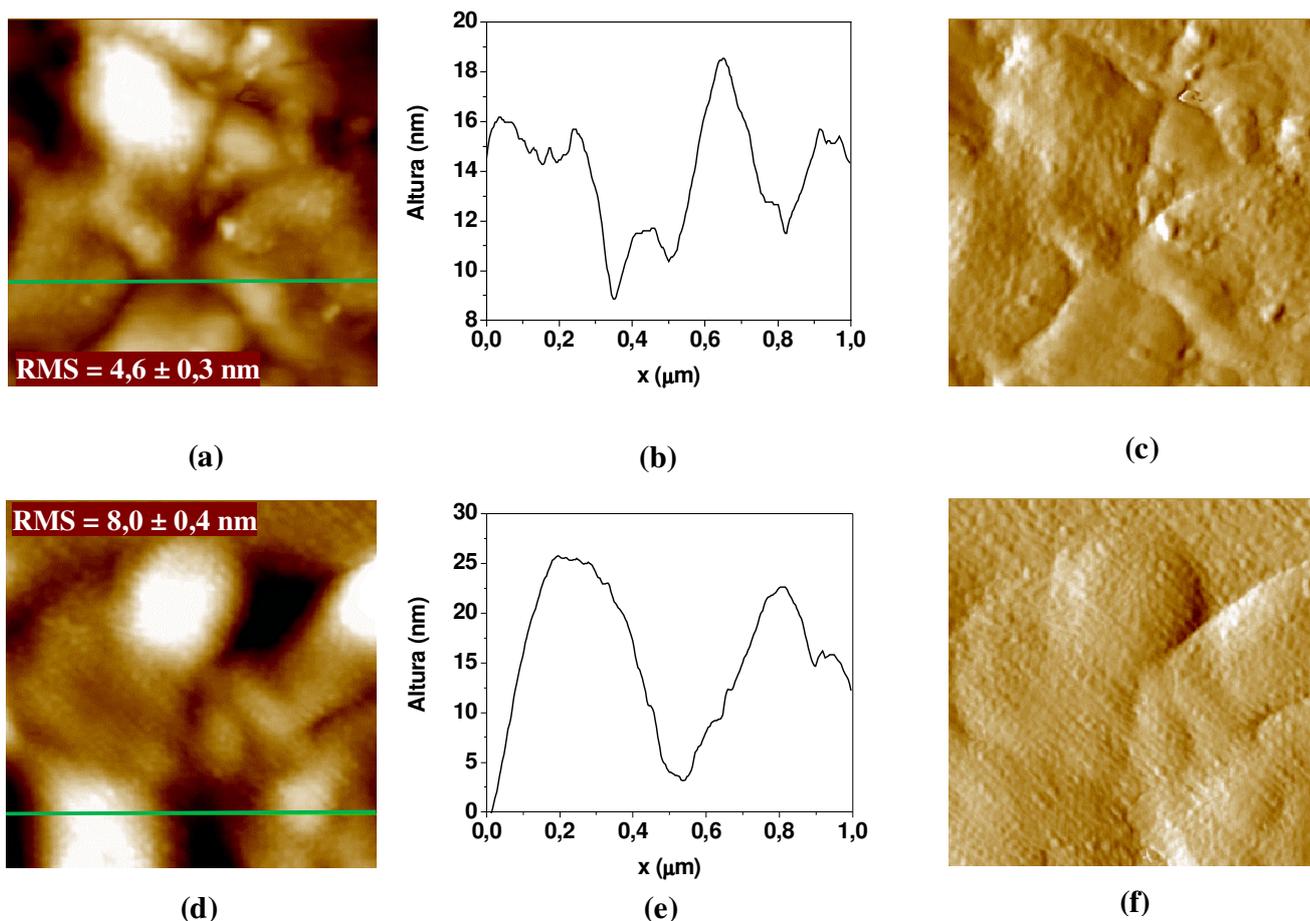


Figura 38. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 27$ nm, (b) correspondente seção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, do filme de lisozima sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 30$ nm, (e) correspondente seção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 3$ nm, para o filme de BSA sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L)).

Após a adsorção de lisozima e BSA (Figuras 38a e 38d) sobre filmes rugosos de CAB os valores de RMS mantiveram a mesma ordem de grandeza original (Tabela 15), indicando que as moléculas adsorvidas se acomodaram na topografia dos filmes.

A Figura 39 mostra as imagens de AFM obtidas para concanavalina A e jacalina adsorvidas sobre filmes rugosos de CAB. Os cortes transversais feitos nas imagens dos filmes de jacalina e concanavalina A não mostram uma significativa mudança no perfil topográfico em comparação com o filme original de CAB. Comportamento semelhante aos

dos filmes de lisozima e BSA (Figura 38). A Figura 39 (c) mostra que as moléculas de concanavalina A adsorverem aleatoriamente sobre o filme de rugoso de CAB. O valor médio de RMS dos filmes de CAB rugosos aumentou de (6 ± 1) nm (ver Tabela 15) para (10 ± 1) nm após a adsorção de concanavalina A (Figura 39 a). Este aumento pode ser devido à adsorção de agregados de concanavalina A. Entretanto, após a adsorção da jacalina o valor médio de RMS se manteve praticamente o mesmo do filme original de CAB rugoso, indicando o melhor empacotamento das moléculas de jacalina adsorvidas.

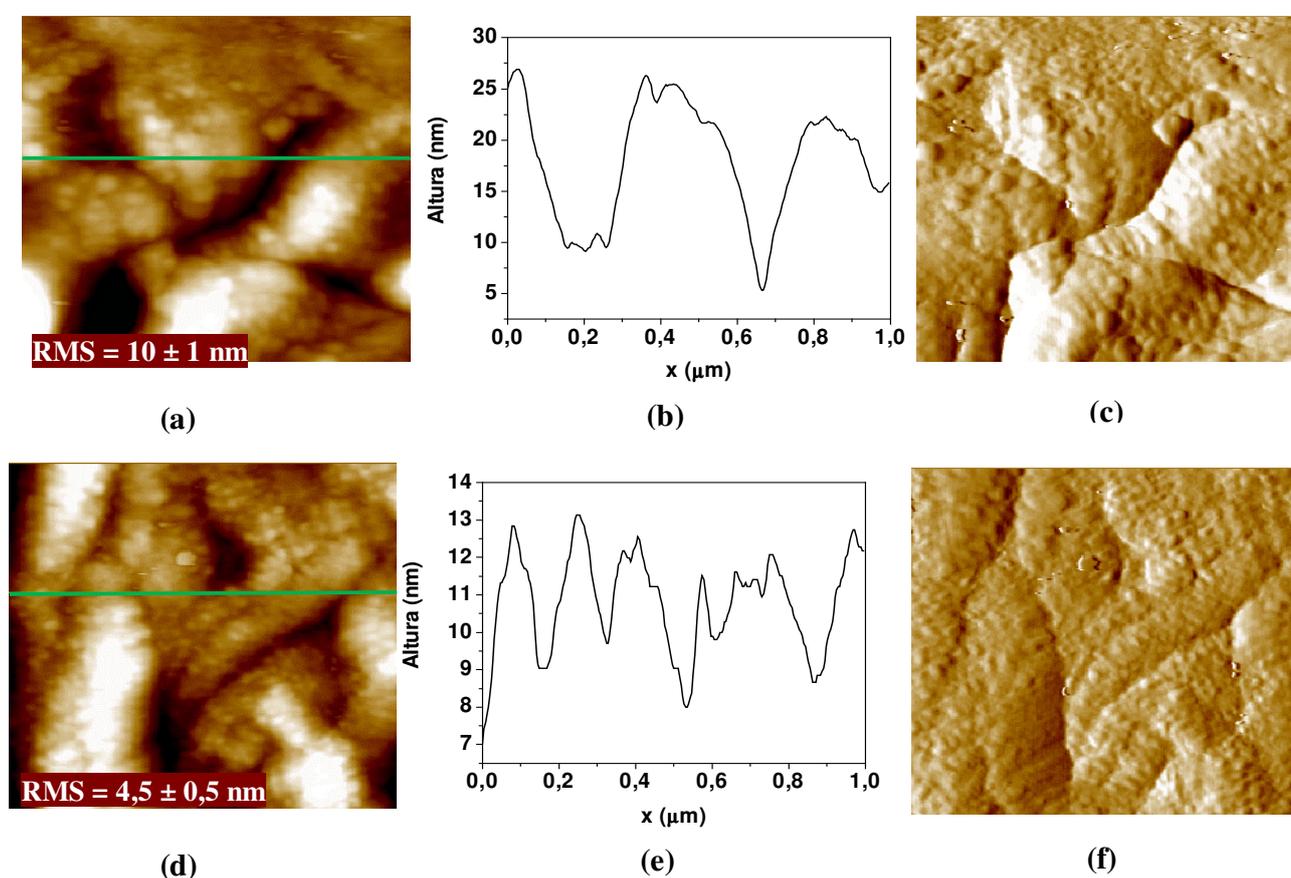


Figura 39. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 35$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, do filme de Concanavalina A sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 20$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 2$ nm, para o filme de jacalina sobre CAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L)).

As Figuras 40 e 41 mostram as imagens de AFM obtidas para proteínas lisozima, BSA, concanavalina A e jacalina adsorvidas sobre o filme rugoso de CMCAB.

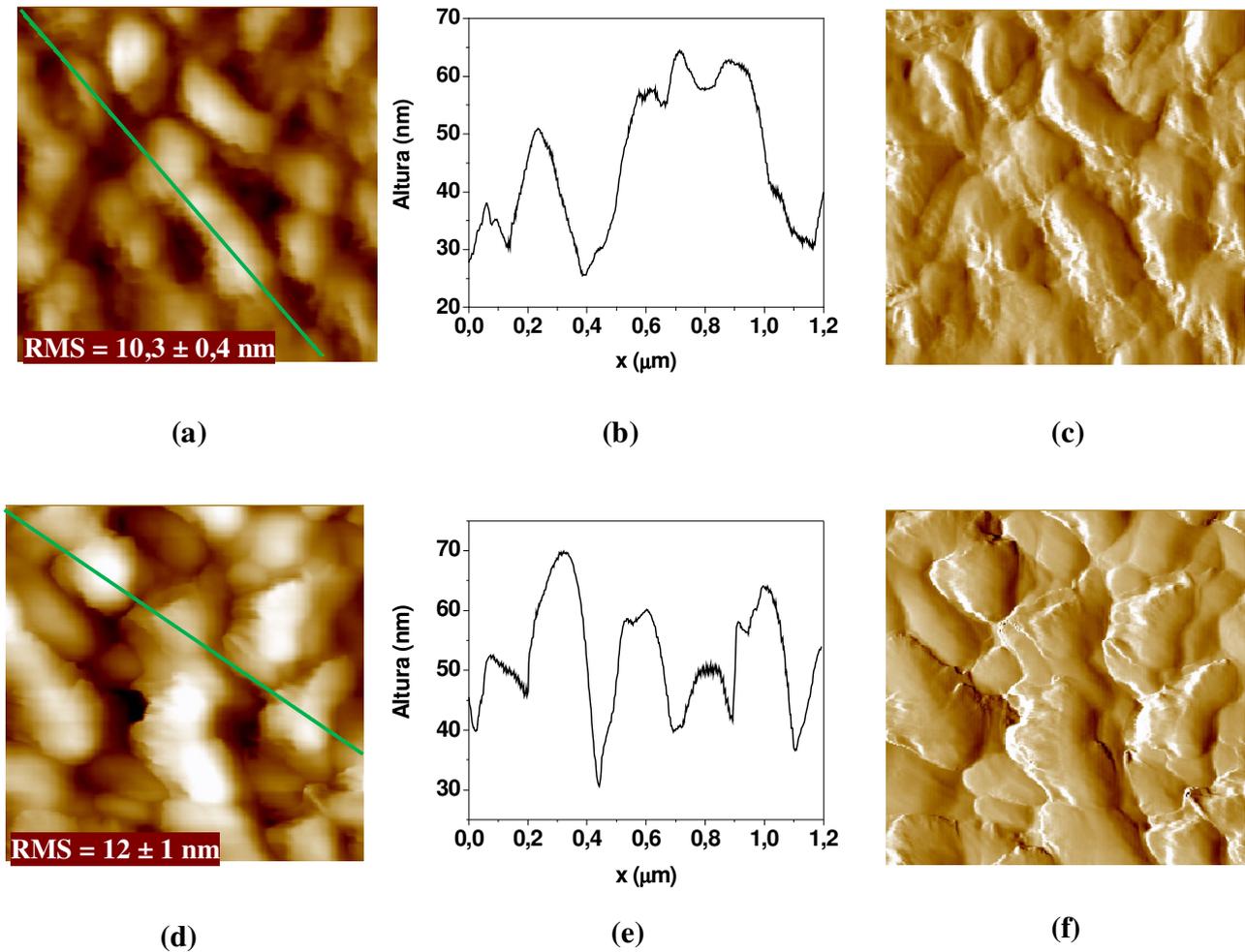


Figura 40. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 80$ nm, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 5$ nm, do filme de lisozima sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 80$ nm, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 6$ nm, para o filme de BSA sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L)).

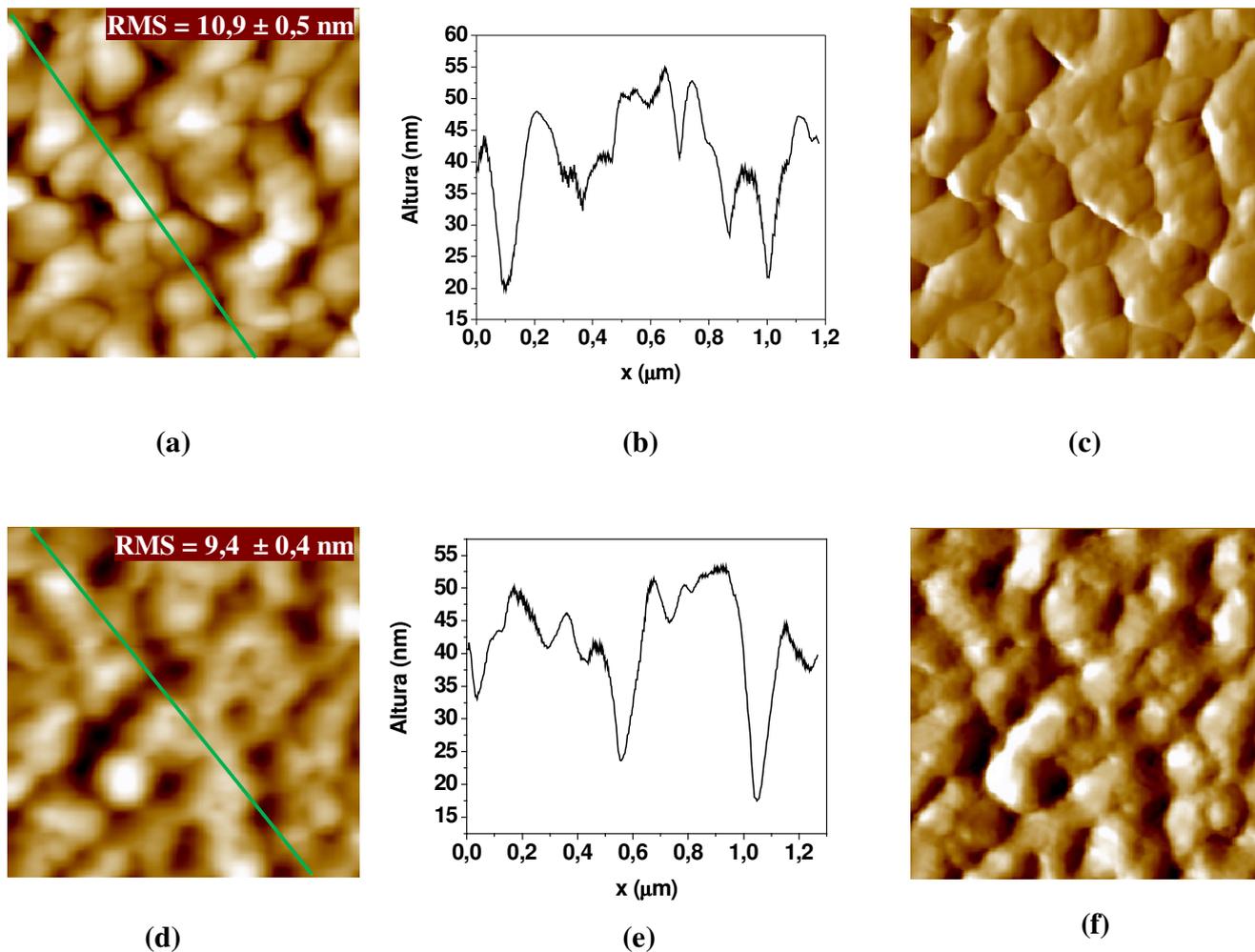


Figura 41. Imagens de AFM (1×1) μm^2 : (a) topográfica, $Z = 70 \text{ nm}$, (b) correspondente secção transversal e (c) imagem de amplitude, $Z = 5 \text{ nm}$, do filme de concanavalina A sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L) e (d) topográfica, $Z = 70 \text{ nm}$, (e) correspondente secção transversal e (f) imagem de amplitude, $Z = 6 \text{ nm}$, para o filme de jacalina sobre CMCAB/SiO₂/Si (filme preparado por spin coating em acetona (5g/L)).

As imagens de AFM nas Figuras 40 e 41 mostram que após a adsorção os vales dos filmes rugosos de CMCAB parecem estar preenchidos, ocasionando um decréscimo no valor médio de RMS dos filmes originais (Tabela 15). A maior queda do valor de RMS foi

observada para o filme de jacalina sobre CMCAB, justamente o sistema para o qual se obteve a maior quantidade de biomoléculas adsorvida (Figura 37).

Após a adsorção de proteínas sobre os filmes rugosos de CAB e CMCAB medidas de ângulo de contato também foram realizadas, como mostra a Tabela 16.

Tabela 16. Valores dos ângulos de avanço (θ_A), ângulo de recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$) para as proteínas imobilizadas sobre os filmes rugosos de CAB e CMCAB preparados por spin coating em solução de acetona (5 g/L).

Proteínas	Filmes rugosos					
	CAB/SiO ₂			CMCAB/SiO ₂		
	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$	θ_A	θ_R	$\Delta\theta$
BSA	54 ± 2	36 ± 1	18 ± 2	65 ± 1	36 ± 1	29 ± 1
Lisozima	56 ± 2	43 ± 2	13 ± 3	41 ± 1	25 ± 1	16 ± 1
Jacalina	51 ± 1	25 ± 1	26 ± 1	43 ± 1	26 ± 2	17 ± 2
Concanavalina A	52 ± 2	27 ± 1	25 ± 2	47 ± 1	27 ± 2	20 ± 2

Após a imobilização das proteínas nos filmes poliméricos todos os ângulos de contato diminuíram, devido principalmente à ocupação das moléculas de proteínas nos vales que antes eram ocupados pelo ar. Além disso, a histerese dos filmes das proteínas sobre CMCAB decaiu em relação ao filme do éster de celulose, mostrando uma menor irregularidade topográfica dos filmes.

7. Conclusões

O comportamento em solução dos polímeros CAB e CMCAB foi investigado por medidas de viscosidade e por SAXS. Ambos os experimentos mostraram que o acetato de etila é um melhor solvente para as macromoléculas do que a acetona.

A espessura e a rugosidade dos filmes finos de CMCAB obtidos por revestimento rotacional são influenciadas pelas interações polímero/substrato e solvente /substrato e pela taxa de evaporação do solvente. A maior interação da acetona com SiO₂/Si e sua maior volatilidade em relação ao acetato de etila fizeram com que os filmes de CMCAB obtidos a partir de soluções de acetona fossem mais rugosos do que quando preparados com soluções de acetato de etila.

A presença do grupo carboximetil (CM) na estrutura química do CMCAB propiciou uma maior adsorção sobre SiO₂/Si e APS em relação ao CAB. A composição química da superfície influencia a magnitude dos valores dos componentes da energia superficial do CAB e CMCAB. Porém, a energia superficial total dos polímeros não é alterada para as superfícies de SiO₂/Si e APS. Experimentos de SFG mostraram que os solventes acetona e acetato de etila influenciam nas características superficiais dos filmes de éster de celulose. A formação de uma camada de acetona sobre SiO₂/Si entre o éster de celulose e SiO₂/Si, torna o filme polimérico mais hidrofílico do que quando preparado com acetato de etila.

A quantidade de proteína adsorvida depende das propriedades da superfície dos filmes de CAB e CMCAB. Todas as proteínas usadas (lisozima, BSA, jacalina, concanavalina A) adsorverem preferencialmente sobre os filmes de CMCAB, indicando interações favoráveis com grupo carboximetil. As medidas de ângulo de avanço mostraram

que os filmes das proteínas sobre os filmes dos ésteres de celulose são mais hidrofílicos quando comparados com os dos CAB e CMCAB, possivelmente devido à orientação de resíduos hidrofóbicos para a superfície.

A rugosidade dos filmes de CMCAB interferiu no processo de adsorção das proteínas, entretanto este efeito foi menos pronunciado para o filme de CAB. O aumento da quantidade de proteínas adsorvida para os filmes mais rugosos de CMCAB está relacionado ao aumento da área superficial dos filmes. Medidas de ângulo de contato e de AFM mostraram que provavelmente todas as proteínas estudadas adsorverem nos vales que formam na estrutura do filme de CMCAB.

CMCAB é um éster de celulose com energia superficial de 49 mJ/m^2 , o que lhe caracteriza como material potencial para adesão e crescimento celular e desenvolvimento de kits de diagnóstico de dengue.

Perspectivas

Os resultados apresentados nesta tese permitiram definir condições experimentais para obter filmes de CMCAB com as características desejadas (hidrofílico ou hidrofóbico, rugoso ou liso). As aplicações dos filmes de CMCAB como substrato para imobilizar biomoléculas podem ser ampliadas para outras biomoléculas como antioxidantes e anticorpos, uma vez que o uso de CMCAB *in vivo* foi aprovado.

Outra linha de pesquisa que pode ser desenvolvida é estudar a interação do CMCAB com outros polímeros (obtenção de blendas) e com surfactantes (complexo polímero-surfactante).

8. Referências bibliográficas

- ADAMSON, W.A. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th ed., Toronto: John Wiley & Sons, 1990.
- AZZAM, R.M. e BASHARA, N.M.; *Ellipsometry and Polarized Light*, Amsterdam: North Holland, 1979.
- BALDWIN, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, v. 71, 2056-2063, 1996.
- BAUER, R. D. Binder additive for ink-jet ink. n. PI 2005166794, EUA, 2005.
- BELEGRINO, S.; MANNELLI, I.; LISBOA, P.; BRETAGNOL, F.; VALSESIA, A.; CECCONE, G.; COLPO, P.; RAUSCHER, H.; ROSSI, F. pH-dependent immobilization of proteins on surfaces functionalized by plasma-enhanced chemical vapor deposition of poly(acrylic acid) and poly(ethylene oxide)-like films. *Langmuir*, v. 24, 7251-7261, 2008.
- BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*, v. 2, 3^o edição, Weinheim, 1984.
- BLANCO, E. M.; HORTON, M. A.; MESQUIDA, P. Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns. *Langmuir*, v. 24, 2284-2287, 2008.
- BOLGER, J.C. *Adhesion Aspects of Polymeric Coatings*, p.3, Ed: Mittal, K.L., New York: Plenum Press, New York, 1983.
- BOUALI, B.; GANACHAUD, F.; CHAPEL, J-P.; PICHOT, C.; LANTERI, P. Acid-base approach to latex particles containing specific groups based on wettability measurements. *J. Coll. Interf. Sci.* v.208, n.1, 81-89, 1998.
- BREWER, C. F.; BROWN III, R. D.; KOENING, S. Stoichiometry of magnesium and calcium ion binding to concanavalin A. *Biochemistry*, v. 22, 3691-3702, 1983.
- BUTT, H.-J.; GRAF, K.; KAPPL, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2003.
- CARTER, D.C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* v.45, 153-203, 1994.

- CASTRO, L. B. R.; PETRI, D, F. S. Assemblies of Concanavalin a onto carboxymethylcellulose. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, 2063-2069, 2005.
- CHAUDHURY, M.K. Interfacial interaction between low energy surfaces. *Mat. Sci. Eng.* v.R16, n.3, 97-159, 1996.
- CHARREYRE, M-T.; TCHERKASSKAYA, O.; WINNIK, M.A.; HIVER, A.; DELAIR, T.; CROS, P.; PICHOT, C.; MANDRAND, B. Fluorescence energy transfer study of the conformation of oligonucleotides covalently bound to polystyrene latex particles. *Langmuir* v.13, n.12, 3103-3110, 1997.
- CHEN, H.; GAN, W.; WU, B-H.; WU, D.; ZHANG, Z.; WANG, H-F. Determination of the two methyl group orientations at vapor/acetone interface with polarization null angle method in SFG vibrational spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, v. 408, 284-289, 2005.
- CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein. *Journal of Chromatography A*, v. 992, 29-40, 2003.
- CLARK, M. L.; CHEN, C.; WANG, J.; CHEN, Z. Molecular level structures of poly(n-alkyl methacrylate)s with different side chain lengths at the polymer/air and polymer/water interfaces. *Langmuir*, v. 22, 8800-8806, 2006.
- DAM, T. K.; BREWER, C. F.; Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical Reviews*, v. 102, 387-429, 2002.
- DECHER, G. Fuzz nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v.277, 1232-1237,1997.
- DELAIR, T.; MEUNIER, F.; ELAISSARI, A.; CHARLES, M-H.; PICHOT, C. Amino-containing cationic latex-oligodeoxyribonucleotide conjugates: application to diagnostic test sensitivity enhancement. *Coll. Surf. A* v.153, n.1-3, 341-353, 1999.
- DIETERLE, M.; BLASCHKE, T.; HASSE, H. Microcalorimetric study of adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic. *Journal of Chromatography A*, V. 1205, 1-9, 2008.

- DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; RECHENDORFF, K.; HOVGAARD, M.B.; FOSS, A.; CHEVALLIER, J.; BESENBACHER, F. Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, 53-59, 2008.
- DONG, J.; MIELCZARSKI, J. A.; MIELCZARSKI, E.; XU, Z. In situ characterization of the adsorbed concanavalin A on germanium surface at various pH. *Biotechnol. Prog.*, v. 24, 972-980, 2008.
- DUPONT-GILLIAN, C. C.; PAMULA, E.; DENIS, F. A.; DE CUPERE, V. M.; DUFRÊNE; ROUXHET, P.G. Controlling the supramolecular organization of adsorbed collagen layers. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, v. 15, 347-353, 2004.
- EDGAR, K.J. Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose* v.14, n.1, 49-64, 2007.
- EDGAR, K.J.; BUCHANAN, C.M.; DEBENHAM, J.S.; RUNDQUIST, P.A.; SEILER, B.D.; SHELTON, M.C.; TINDALL, D. Advances in cellulose ester performance and application. *Prog.Polym. Sci.*, v.26, n. 9, 1605-1688, 2001.
- ERBIL, H. Y.; DEMIREL, A. L.; AVCI, Y.; MERT, O. Transformation of a simple plastic into a superhydrophobic surface. *Science*, v. 299, 1377- 1379, 2003.
- FOWKES, F.M. Attractive forces at interfaces. *Ind. Eng. Chem.* v.56, n. 12, 40-52, 1964.
- FOWKES, F.M. Role of acid-base interfacial bonding in adhesion. *J. Adh. Sci. Technol.* v.1, n.1, 7-27, 1987.
- FRANCK, R. W. The mechanism of β -glycosidaese: A reassessment of some seminal papers. *Bioorganic Chem.*, v. 20, 77-88, 1992.
- GALLI, C.; COEN, M. C.; HAUERT, R.; KATANAIEV, V. L.; WYMANN, M. P.; GRÖNING, P.; SCHLABACH, L. Protein adsorption on topographically nanostructured titanium. *Surface Science Letters*, v. 474, L180-L184, 2001.
- GILBOA-GARBER, N.; MYMON, H.; OREN, A. Typing of halophilic Archaea and characterization of their cell surface carbohydrates by use of lectins. *Microbiology Letters*, v. 163, 91-97, 1998.

- GRIMALDI, J. J.; 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, 1618-1624, 1975.
- GUINER, A.; FOURNET, G. *Small angle scattering of X-Rays*, New York, Wiley & Sons, 1995.
- HAN, M.; SETHURAMAN, A.; KANE, R. S.; BELFORT, G. Nanometer-scale roughness having little effect on the amount or structure of adsorbed protein. *Langmuir*, v. 19, 9868-9872, 2003.
- HARNETT, E. M.; ALDERMAN, J.; WOOD, T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf. Biointerface*, v. 55, 90-97, 2007.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Princípios de análise instrumental*, 6ª edição, Bookman, 2009.
- HOLMBERG, M.; BERG, J.; STEMME, S.; ODBERG, L.; RASMUSSEN, J.; CLAESSEN, P. Surface force studies of Langmuir-Blodgett cellulose films. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 186, 369-381, 1997.
- HOVGAARD, M. B.; RECHENDORFF, K.; CHEVALLIER, J.; FOSS, M.; BESENBACHER, F. Fibronectin adsorption on tantalum: the influence of nanoroughness. *J. Phys. Chem. B*, v. 112, 8241-8249, 2008.
- HUGGINS, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 64, 2716-2718, 1942.
- ISHIGURO, R.; YOKOYAMA, Y.; MAEDA, H.; SHIMAMURA, A.; KAMEYAMA, K.; HIRAMATSU, K. Modes of conformational changes of proteins adsorbed on a planar hydrophobic polymer surface reflecting their adsorption behaviors. *Journal of Colloids and Interface Science*, v. 290, 91-101, 2005.
- 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, 637-645, 2002.

- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*, v. 212, 193-211, 1998.
- KISS, É.; DRAVETZKY, K.; HILL, K.; KUTNYÁNSZKY, E.; VARGA, A. Protein interaction with a Pluronic-modified poly(lactic acid) Langmuir monolayer. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 325, 337-345, 2008.
- KITANO, H.; TAKAHASHI, Y.; MIZUKAMI, K.; MATSUURA, K. Kinetic study on the binding of lectin to mannose residues in a polymer brush. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 70, 91-97, 2009.
- KHANG, D.; KIM, S. Y.; LIU-SNYDER, P.; PALMORE, G. T. R.; DURBIN, S. M.; WEBSTER, T. J. Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials*, v. 28, 4756-4768, 2007.
- KONTTURI, E.; JOHANSSON, L-S.; KONTTURI, K. S.; AHONEN, P.; THÜNE, P. C.; LAINE, J. Cellulose nanocrystal submonolayers by spin coating. *Langmuir*, v. 23, 9674-9680, 2007.
- KONTTURI, E.; THUNE, P. C.; NIEMANTSVERDIET, J. W. Novel method for preparing cellulose model surfaces by spin coating. *Polymer* v.44, n.13, 3621-3625, 2003.
- KOPAC, T; BOZGEYIK, K; Yener, J. Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 322, 19-28, 2008.
- KOSAKA, P. M.; KAWANO, Y.; EL SEOUD, O. A.; PETRI, D. F. S. Catalytic activity of lipase immobilized onto ultrathin films of cellulose esters. *Langmuir*, v. 23, 12167-12173, 2007a.
- KOSAKA, P. M. *Aplicações e Caracterização de Ésteres de Celulose*. Tese de Doutorado, Instituto de Química-USP, 2007b.
- KOSAKA, P. M.; KAWANO, Y.; PETRI, D. F. S. Dewetting and surface properties of ultrathin films of cellulose esters. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 316, 671-677, 2007c.

- KOTLARCHYK, M.; CHEN, S.H. Analysis of small-angle neutron-scattering spectra from polydisperse interacting colloids. *J. Chem. Phys.*, v. 79, 2461-2469, 1983.
- LI, Q.; QUINN, J. F.; WANG, Y.; CARUSO, F. Preparation of nanoporous polyelectrolyte multilayer films via nanoparticle templating. *Chem. Mater.*, v. 18, 5480-5485, 2006.
- LIU, Q.; ZHANG, Y.; LASKOWSKI, J.S. The adsorption of polysaccharides onto mineral surfaces: an acid/base interaction. *Int. J. Mineral Proc.* v.60, n.3-4, 229-245, 2000.
- LIU, Y. X.; WANG, X. J.; LU, J.; CHING, C. B. Influence of the roughness, topography and physicochemical properties of chemically modified surfaces on the heterogeneous nucleation of protein crystals. *J. Phys. Chem. B*, v. 111, 13971-13978, 2007.
- MACIEL, J.S.; KOSAKA, P. M.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; PETRI, D. F. S. Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers on amine-terminated surfaces and the immobilization of concanavalin A on them. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, 522-529, 2007.
- MALMSTEN, M. *Protein architecture: Interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- MARK, H. F.; KROSCWITZ, J. I. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, New York: Wiley, vol.4, 1986.
- MATE, C. M.; NOVOTNY, V. J. Molecular conformation and disjoining pressure of polymeric liquid films. *J. Chem. Phys.*, v. 94, 8420-8427, 1991.
- MEYERHOFER, D. Characteristics of resist films produced by spinning. *Appl. Phys.*, v. 49, 3993-3997, 1978.
- MIWA, M.; NAKAJIMA, A.; FUJISHIMA, A. HASHIMOTO, K.; WATANABE, T. Effects of the surface roughness on sliding angles of water droplets on superhydrophobic surfaces. *Langmuir*, v. 16, 5754-5760, 2000.
- MOCANU, G.; MERLE, L.; CARPOV, A.; MULLER, G. Immobilisation de biomolécules dans des microparticules de carboxyméthylcelluloses hydrophobiquement modifiées. *European Polymer Journal*, v. 36, 2381-2386, 2000.

- MÜELLER-BUSCHBAUM, P.; GUTMANN, J. S.; WOLKENHAUER, M.; KRAUS, J.; STAMM, M.; SMILGIES, D.; PETRY, W. Solvent-induced surface morphology of thin polymer films. *Macromolecules*, v. 34, 1369-1375, 2001.
- MÜLLER, B.; RIEDEL, M.; MICHEL, R.; DE PAUL, S. M.; HOFER, R.; HEGER, D.; GRUTZMACHER, D. Impact of nanometer-scale roughness on contact angle hysteresis and globulin adsorption. *J. Vac. Sci. Technol. B.*, v. 19, 1715-1720, 2001.
- MÜLLER, R.; HILLER, K. A.; SCHMALZ, G.; RUHL, S. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. *Analytical Biochemistry*, v. 359, 194-202, 2006.
- MURATA, T.; TANIOKA, A. Interfacial state change of cellulose triacetate membrane by adsorption of polyelectrolyte. *J. Coll. Interf. Sci.* v.192, n.1, 26-36, 1997.
- MURTINHO, D.; LAGOA, A. R.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Cellulose derivatives membranes as supports for immobilization of enzymes. *Cellulose* v.5, n.4, 299-308, 1998.
- NORMAN, K.; GHANBARI-SIAHKALI, A.; LARSEN, N. B. Studies of spin coated polymer films. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, v.1001, 174-201, 2005.
- OBIE, R. T. Use of carboxyalkyl cellulose esters, such as carboxymethyl cellulose acetate butyrate, to form aqueous dispersions of hydrophobic materials in water. n.PI 2004030801, EUA, 2004.
- 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, n.1,2, 257-273, 1998.
- PALIK, E. D. Handbook of Optical Constants of Solids. Academic Press, Inc. London.
- PARK, S-I.; DAESCHEL, M. A.; ZHAO, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, v. 64, M215-M221, 2004.
- PEREIRA, E. M. A., SIERAKOWSKI, M. R.; JÓ, T. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FRANÇA, R. F. O.; FONSECA, B. A. L.; PETRI, D. F. S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for

immobilization of dengue virus particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, 45-52, 2008.

- PETRI, D. F. S. Characterization of spin-coated polymer films. *J. Braz. Chem. Soc.* v.13, n.5, 695-699, 2002.
- PETRI, D. F. S.; WENZ, G.; SCHUNK, P.; SHIMMEL, T. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, v. 15, 4520-4523, 1999.
- RECHENDORFF, K.; HOVGAARD, M. B.; FOSS, M.; ZHDANOV, BESENBACHER, F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*, v. 22, 10885-10888, 2006.
- REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; EDELMAN, G. M. Covalent and 3-dimensional structure of concanavalin A. Atomic coordinates, hydrogen-bonding and quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, 1525-1547, 1975.
- REITER, G. Are changes in morphology clear indicators for the glass transition in thin polymer films? Tentative ideas. *Eur. Phys. J. E*, v. 8, 251-255, 2002.
- SACKMANN, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* v.271, n.5245, 43-48, 1996.
- SAKAI, T. Huggins constant k for flexible chain polymers. *J. Polym. Sci., Part A-2*, v. 6, 1535-1549, 1968.
- SCHWARTZ, D. K. Langmuir-Blodgett film structure. *Surface Science Reports*, v. 27, 241-334, 1997.
- SEE, Y-K.; CHA, J.; CHANG, T.; REE, M. Glass transition temperature of poly(tert-butyl methacrylate) Langmuir-Blodgett film and spin coated film by X-ray reflectivity and ellipsometry. *Langmuir*, v. 16, 2351-2355, 2000.
- SHIMIZU, R.N.; DEMARQUETTE, N.R. Evaluation of surface energy of solid polymers using different models. *J. Appl. Polym. Sci.* v.76, n.12, 1831-1845, 2000.
- SILBERBERG, A. Adsorption of Flexible Macromolecules. IV. Effect of Solvent-Solute Interactions, Solute Concentration, and Molecular Weight. *J. Chem. Phys.* v.48, n.7, 2835-2851, 1968.

- SIGAL, G. B.; MRKSICH, M.; WHITESIDES, G. M. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *J. Am. Chem. Soc.*, v.120, 3464-3473, 1998.
- SILVA, R. A.; URZÚA, M. D.; PETRI, D. F. S. Lysozyme binding to poly(4-vinyl-N-alkylpyridinium bromide). *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 330, 310-316, 2009.
- TENCER, M.; CHARBONNEAU, R.; LAHOUD, N.; BERINI, P. AFM study of BSA adlayers on Au stripes. *Applied Surface Science*, v. 253, 9209-9214, 2007.
- TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; SENCZUK, A. M.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, 1677-1690, 2007.
- WALKER, K. R.; POSEY-DOWTY, J. ; SEO, K. S.; WILSON, A. K. The use of CMCAB in water-based automotive paints. Technical Service and Development for Eastman Chemical Company, UK. *Surface Coatings Australia*, v. 39(7), 11-15. 2002.
- WALSH, C.B.; FRANCES, E.I. Ultrathin PMMA films spin-coated from toluene solutions. *Thin Solid Films*, v.429, n.1-2, 71-76, 2003.
- WANG, X.; NI, H.;XUE, D.; WANG, X.; FENG, R-R.; WANG, H-F. Solvent effect on the film formation and the stability of the surface properties of poly(methyl methacrylate) end-capped with fluorinated units. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 321, 373-383, 2008.
- WEAST, R. C. *Handbook of chemistry and physics*, 5 th edn., CRC Press, Florida.
- WIEGAND, G.; JAWOREK, T.; WEGNER, G.; SACKMANN, E. Heterogeneous Surfaces of Structured Hairy-Rod Polymer Films: Preparation and Methods of Functionalization. *Langmuir* v.13, n.13, 3563-3569, 1997.
- WU, S. *Polymer Interface and Adhesion*, New York: Dekker, 1982.
- WU, S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. *J. Polym. Sci C – Polym. Symp.* v.34, 19-30, 1971.
- YOUNG, T. An essay on the cohesion of fluids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 95, 65-87, 1805.

- YUAN, W.; SUN, Y. Effect of ionic capacity on dynamic adsorption behavior of protein in ion-exchange electrochromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 68, 109-113, 2009.
- ZHANG, M.; DESAI, T.; FERRARI, M. Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials*, v. 19, 953-960, 1998.
- ZHAO, J.; JIANG, S.; WANG, Q.; LIU, X.; JI, X.; JIANG, B. Effects of molecular weight, solvent and substrate on the dewetting morphology of polystyrene films. *Appl. Surf. Sci.*, v. 236, 131-140, 2004.
- ZHOU, D.; WANG, X.; BIRCH, L.; RAYMENT, T.; ABELL, C. AFM study on protein immobilization on charged surfaces at the nanoscale: toward the fabrication of three-dimensional protein nanostructures. *Langmuir*, v. 19, 10557-10562, 2003.

SÚMULA CURRICULAR

Nome: Jorge Amim Júnior

Local e data de nascimento: Juiz de Fora (MG) aos 18 de julho de 1979.

Educação

1987-1993: Ensino Fundamental – Instituto Estadual de Educação, Juiz de Fora- MG

1995-1997: Ensino Médio – Instituto Estadual de Educação, Juiz de Fora- MG

1999-2004: Bacharelado e licenciatura em Química – Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais – MG.

2004-2006: Mestrado em Agroquímica, área de concentração: Físico-Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa- MG.

Título: Efeito hidrofóbico de macromoléculas sobre a partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

2006-2009: Doutorando em Química (Físico-Química), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo – SP.

Título: Caracterização e aplicação de filmes finos acetato butirato carboximetil celulose

Orientadora: Prof. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Artigos Completos Publicados em Periódicos

- 1) Amim Júnior, J.; Petri, D. F. S. ; Maia, F. C. B. ; Miranda, P. B. *Solution behavior and surface properties of carboxymethylcellulose acetate butyrate*, Cellulose, In Press, DOI: 10.1007/s10570-009-9295-z, 2009.
- 2) Amim Júnior, J.; Kosaka, P. M.; Maia, F. C. B.; Miranda, P. B.; Petri, D. F. S. *Stability and Interface Properties of Thin Cellulose Ester Films Adsorbed from Acetone and Ethyl Acetate Solutions* Journal of Colloid and Interface Science, v. 332, p. 477-483, 2009.
- 3) Amim Júnior, J.; Kawano, Y.; Petri, D. F. S. *Thin films of carbohydrate based surfactants and carboxymethylcellulose acetate butyrate mixtures : morphology and thermal behavior*. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. 29, p. 420-425, 2009.
- 4) Amim Júnior, J.; Kosaka, P. M.; Petri, D. F. S. *Characteristics of Thin Cellulose Ester Films Spin-Coated from Acetone and Ethyl Acetate Solutions* Cellulose, v. 15, p. 527-535, 2008.
- 5) Silva, L. H. M.; Silva, M. C. H.; Amim Júnior, J.; Martins, J. P.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. *Hydrophobic effect on the partitioning of $[Fe(CN)_5(NO)]^{-2}$ and $[Fe(CN)_6]^{-3}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts*. Separation and Purification Technology, v. 60, p.103-112, 2008.
- 6) Oliveira, M. R. L. ; Amim Júnior, J.; Soares, I. A. ; Bellis, V. M. ; Simone, C. A. ; Novais, C.; Guilard, S. *Synthesis, crystal structure and spectroscopic characterization of novel 1,2-bis(diphenylphosphine)ethane-(N-R-sulfonyldithiocarbimato)nickel (II) complexes* Polyhedron, v. 27, p. 727-733, 2008.

- 7) Borges Junior, M.; de Mello, J. W. V.; Schaefer, C. E. G. R.; Dussin T. M.; Amim Júnior, J. *Distribuição e formas de ocorrência de zinco em solos no município de Vazante-MG*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 32, p. 2183-2194, 2008.
- 8) Silva, M. C. H.; Silva, L. H. M.; Amim Júnior, J. ; Guimarães, O. R.; Martins, J. P. *Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Mixture of Triblock Copolymers L35 and F68 with Na_2SO_4 , Li_2SO_4 or $MgSO_4$* Journal of Chemical and Engineering Data, v. 51, p. 2260-2264, 2006.
- 9) Amim, R. S.; Oliveira, M. R. L.; Amim Júnior, J. ; BELLIS, V. M. *Synthesis and characterization of gold (III) complexes with dithiocarbimides derived from sulfonamides*. Transition Metal Chemistry, v. 31, p. 1071-1074, 2006.
- 10) Oliveira, M. R. L. ; Guilard, S. ; Andrade, R. P. ; Lindemman, R. H. ; Amim Júnior, J. ; Ellena, J. ; Bellis, V. M.; Rubinger, M. M. M. *Preparation, crystal structure and spectroscopic characterization of nickel complexes dithiocarbimate derivated of sulfonamides* Polyhedron, v. 25, p. 2119-2126, 2006.

Capítulo de livro publicado

Kosaka, P. M. ; Amim Júnior, J.; Saito, R. S. N. ; Petri, D. F. S. . Thermodynamics of cellulose ester surfaces. Model Cellulosic Surfaces- ACS Symposium Series., v. XXX, p. 1-16, 2009.

Resumos de trabalhos apresentados em congresso

1)Amim Júnior, J., Petri, D. F. S. Solution behavior and thin films of carboxymethylcellulose acetate butyrate In: 235th National Meeting, American Chemical Society (ACS) New Orleans. 235th National Meeting, American Chemical Society (ACS), 2008.

2) Amim Júnior, J., Petri, D. F. S. Determination of surface energy of carboxymethylcellulose acetate butyrate In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, Florianópolis. 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, 2008.

3) Reis, André A. O., Amim Júnior, J., Petri, D. F. S. Thin films of polymer/surfactant complexes on silica In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, Florianópolis. 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, 2008.

4) Amim Júnior, J., Kosaka, P. M., Petri, D. F. S. Characterization of thin films of carboxymethylcellulose acetate butyrate In: XI International Macromolecular Colloquium and the 5th International Symposium on Natural Polymers and Composites, Gramado. XI International Macromolecular Colloquium and the 5th International Symposium on Natural Polymers and Composites, 2007.

Prêmio

Premiação do trabalho: Determination of surface energy of carboxymethylcellulose acetate butyrate, 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers

Estágio em ensino

Monitor da disciplina de Termodinâmica

Local: Instituto de Química – Universidade de São Paulo-USP

Período: fevereiro de 2007 a julho de 2008.

Carga horária: 6 horas semanais.

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](#)