

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS



PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS AVANÇADOS

Christiane Pinto Davi

**Filmes Confeccionados Camada a Camada (LbL) com
Látex Natural e suas Proteínas:
Preparação, Caracterização e Ação Sobre a Proliferação Celular**

Dissertação submetida à Pró-Reitoria de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociências e Materiais Avançados.

Mariselma Ferreira
ORIENTADORA

Santo André
2009

Ficha catalográfica produzida pela Biblioteca da Universidade Federal do ABC

DAVI, Christiane Pinto

Filmes confeccionados camada a camada (LbL) com Látex Natural e suas proteínas: preparação, caracterização e ação sobre a proliferação celular / Christiane Pinto Davi — Santo André: Universidade Federal do ABC, 2009.

156 f.

Orientadora: Mariselma Ferreira

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Programa de Pós-graduação em Nanociências e Materiais Avançados, 2009.

Referencias Bibliográficas: f. 150 – 156

1. Filmes finos 2. Nanomateriais 3. Borracha Natural 4. Látex 5. Biomateriais I.
Ferreira, Mariselma II. Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais
e Humanas, Programa de Pós-graduação em Nanociências e Materiais Avançados
III. Título

CDD530.427 5

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar

A Deus e aos amigos lá de cima, por tudo.

A minha família, pelo apoio.

Aos amigos
da Pós-graduação,
Termomecânica, Instituto
Dante Pazanesse e Koe,
pela força.

A mim mesma por ter
dado ouvido a todos os
anteriores (e não
desistido).

A equipe de trabalho

Mariselma Ferreira, pela orientação
Luiz Fernando Galdino, por me
ensinar o valor da paciência para se
conseguir bons resultados.

Joyce Palermo e Alessandra
Rodrigues, mesmo que por curto
período (aprendi mais do que
ensinei).

Aos que deram uma dica

Rafael Salomão

Everaldo Venancio
Oswaldo N. Oliveira Jr.
Valtencir Zuccoloto

À Capes,
UFABC e
Fapesp,
pelo
suporte
financeiro,
sem o qual
não
deixaria a
indústria.

Aos que ajudaram com as análises, reagentes, equipamentos

Primavera Borelli (Farmácia USP-SP)
pelo laboratório para cultura.
Dr. Fabio Forti do Instituto de
Química da USP-SP, pelas células
Ricardo J. Mendonça e Joaquim
Coutinho Netto
pelas proteínas
A Embrapa Instrumentação Agropecuária pelo látex.
Prof. Pablo Fiorito pela paciência no AFM.
Ao Grupo de Polímeros (IFUSP-SC)
por permitir invasões.
A toda a turma do LEMN.
Bianca F. Palma da UNIVAP pelas tentativas em
Raman, mesmo que não deram certo.

Aos que leram este
trabalho (por educação,
profissão, ou
simplesmente por não
conseguirem dizer não).

Aos membros da banca examinadora.
Mariselma Ferreira (orientadora)
Mitzi Hass Wakamatsu (companheira de leituras)
Daniela A. Ferreira, jornalista e prima (mesmo não
entendendo
patavina)
Meus pais, Denise e Silvestre Davi
Gustavo Colvero (for last minute help)

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para este
trabalho, meu muito obrigada!

Aos professores que tive (incluindo os que não exercem esta profissão), aos autores dos livros e artigos que li.

Às possíveis (embora improváveis) pessoas que consultarão este trabalho; saibam que fiz o melhor que pude. Espero que as informações aqui coletadas sejam de alguma valia.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá (1910-1997)

RESUMO

Filmes finos de látex natural e suas proteínas foram obtidos pela técnica de automontagem camada a camada (LbL). Filmes LbL de látex natural, fração protéica do látex (14-55 KDa), ácido húmico (HA), heparina e heparina ligada a fator de crescimento (bFGF) foram automontados com polietilenimina (PEI) e cloridrato de alilamina (PAH) totalizando 14 filmes diferentes. Estes filmes foram fisicamente caracterizados por UV-visível no qual avaliou-se a cinética de deposição, crescimento e degradação, incluindo análises de AFM, MEV, FTIR e medidas de ângulo de contato. A atividade biológica dos filmes propostos sobre a proliferação de fibroblastos foi realizada por ensaio de MTT e a morfologia dessas células foi também estudada por MEV. Os filmes LbL foram agrupados em três sistemas: *proteínas do látex* (PEI/proteína e PAH/proteína nos pHs 3,0; 7,4 e 9,0); *látex natural* (PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex); e *heparina* (PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF). Os filmes propostos foram linearmente “automontados” sobre superfícies poliméricas, cerâmicas e metálicas. Apresentaram-se estáveis em meio aquoso por período de 21 dias, não apresentando bioatividade apenas o *sistema de proteínas do látex*. Nos filmes do *sistema de látex natural* observou-se bioatividade, no período de avaliação de 21 dias, nas amostras PAH/látex, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex. Os filmes apresentaram índices proliferativos equiparáveis ao bFGF e até 143% maior do que o obtido apenas em poliestireno. Implicando que a ação biológica dos filmes de látex não era definida pelas proteínas do látex contidas no material. No *sistema de heparina* os melhores índices proliferativos foram apresentados pelas soluções isoladas e não pelos filmes LbL, embora PEI/heparina apresentasse bioatividade em 21 dias de ensaio. Este trabalho comprovou que os parâmetros usados na obtenção dos filmes foram bons, e que estes têm potencial para possível comercialização. Pois, o tempo de fabricação foi viável e condições como: temperatura ambiente; uso de soluções muito diluídas; e esterilização rápida e barata, condizentes com manufatura em escala industrial.

Palavras chave: *filmes layer-by-layer; borracha natural; látex natural; fração protéica do látex; biomateriais.*

ABSTRACT

Thin films of natural rubber (NR) latex and its proteins were obtained by self-assembly layer-by-layer (LbL) technique. The LbL films of NR, protein fraction of NR (14-55 KDa), humic acid (HA), heparin and fibroblast growth factor (bFGF) bonded to heparin were self-assembled with polyethylenimine (PEI) and polyallylamine hydrochloride (PAH), in a total of 14 different films. These films were physically characterized by UV-visible, deposition kinetics, growth and degradation were evaluated, including also analyses of AFM, SEM, FTIR and contact angle measurements. Films bioactivity over the fibroblast cells proliferation ratio was performed by MTT assay, as well as this cells morphology studied by SEM. The LbL films were grouped in three systems – *NR proteins* (PEI/proteins and PAH/proteins in pHs 3.0, 7.4 and 9.0), *natural rubber* (PEI/NR, PAH/NR, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+NR and PAH/HA+NR), and *heparin* (PEI/heparin and PEI/heparin+bFGF). These films were linearly self-assembled over polymeric, ceramic and metallic surfaces. They presented stability in aqueous media through periods of 21 days, just not presented bioactivity the *NR proteins system*. Was observed bioactivity on *natural rubber system* films of PAH/NR, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+NR and PAH/HA+NR, through periods of 21 days. Such films presented proliferation ratios similar to bFGF and even 143% higher than detected over plain polystyrene. It implies that NR LbL films bioactivity was not defined by the proteins within this material. *Heparin system* best proliferation ratios were seen on the isolated solutions rather than onto LbL films, although PEI/heparin presented bioactivity on 21st day of the assay. This work proved that the adopted parameters were adequate for films attainments which held commercialization potential. Because of the time required was viable and conditions like – room temperature, much diluted solutions, and quick and cheap sterilization process – were according to industrial scale manufacture.

Key words: *layer-by-layer films; natural rubber latex; protein fraction of natural rubber; biomaterials*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo para crescimento de filmes exponenciais.....	24
Figura 2: Unidade repetitiva do poli-cis-isopreno.....	29
Figura 3: Imagens de ESI/TEM de partículas de látex natural em meio amoniacal.	30
Figura 4: Estruturas moleculares da heparina e da heparana sulfato.	32
Figura 5: Interação entre fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1) e um segmento de heparina.....	32
Figura 6: Procedimento de preparação de filmes LbL.....	35
Figura 7: Diagrama com todos os ensaios físicos e biológicos realizados nos filmes LbL propostos e/ou nas monocamadas das soluções utilizadas em sua confecção (<i>castings</i>).	36
Figura 8: Determinação de ângulo de contato.....	48
Figura 9: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões do mesmo substrato em intervalo de 0,5 min.	59
Figura 10: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões do mesmo substrato em tempos variáveis.....	60
Figura 11: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões em intervalos variáveis usando vários substratos.	61
Figura 12: Resultados dos testes de cinética das soluções de PEI e PAH.	63
Figura 13: Resultados dos testes de cinética para a solução de HA, HA+látex e látex natural.	64
Figura 14: Resultados dos testes de cinética para a solução de heparina sódica	65
Figura 15: Espectro de UV-vis obtidos durante a automontagem do filme LbL de PEI/proteína em pH 7,4.....	67
Figura 16: Filmes LbL de proteína do látex em diferentes tempos e pHs usando PEI e PAH como contraparte positiva para automontagem.	67
Figura 17: Absorbância da 14ª bicamada dos Filmes LbL de proteína do látex com PEI e PAH.....	68
Figura 18: Comparação do crescimento de filmes de PEI e PAH com as proteínas de látex <i>in natura</i> e desnaturadas.....	70
Figura 19: Acompanhamento da automontagem LbL dos filmes de PAH/HA, PEI/HA, PAH/HA+látex, PEI/HA+látex, PAH/látex e PEI/látex até 10 bicamadas.	71

Figura 20: Acompanhamento da automontagem LbL dos filmes de PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF até 10 bicamadas.....	72
Figura 21: Comparação das absorbâncias detectadas na 10 ^a bicamada nos filmes LbL confeccionados.	73
Figura 22: Degradação de filmes PEI/proteína e PAH/proteína em função do tempo de incubação PBS a 37°C.	76
Figura 23: Degradação de filmes PEI/HA, PAH/HA, PAH/HA+látex, PEI/HA+látex, PAH/Látex, PEI/Látex em função do tempo de incubação PBS a 37°C	77
Figura 24: Degradação de filmes PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF em função do tempo de incubação em PBS a 37°C.....	79
Figura 25: Esquematização do processo de degradação do filme PEI/Heparina+bFGF, considerando o modelo de três zonas.....	80
Figura 26: Formula estrutural do a) PEI e b) PAH.....	83
Figura 27: Espectros de FTIR solução de HA+látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.	84
Figura 28: Espectros de FTIR do filme de PEI/Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.	85
Figura 29: Espectros de FTIR do filme de PAH/Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.	85
Figura 30: Espectros de FTIR do filme de PEI/HA+Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.....	86
Figura 31: Espectros de FTIR do filme de PAH/HA+Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.....	87
Figura 32: Imagens de AFM de substrato de mica, sem filme mostrando áreas de 10 μ m ² (escala de 4 μ m.) e 2 μ m ²	88
Figura 33: Imagens de AFM de filmes PEI/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 3 e 4 μ m.	89
Figura 34: Imagens de AFM de filmes PEI/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 4 μ m.....	90
Figura 35: Imagens de AFM de filmes PAH/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 4 μ m.	91
Figura 36: Imagens de AFM de filmes PAH/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas.	92
Figura 37: Imagens de AFM de filmes PEI/HA com 5 e 15 bc. Escala de 4 μ m.....	93

Figura 38: Imagens de AFM de filmes PAH/HA com 5 e 15 bc.	94
Figura 39: Imagens de AFM de filmes PEI/látex com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.	95
Figura 40: Imagens de AFM de filmes PEI/HA+látex com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.....	95
Figura 41: Análise da secção transversal de estrutura apresentada no filme PEI/HA+látex. .	96
Figura 42: Imagens de AFM de filmes PAH/látex com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.	96
Figura 43: Imagens de AFM de filmes PAH/HA+látex com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.....	97
Figura 44: Imagens de AFM de filmes PEI/heparina sódica com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.....	98
Figura 45: Comparação da rugosidade média (Rms) entre os filmes heterogêneos.....	99
Figura 46: Comparação da rugosidade média (Rms) entre os filmes homogêneos.	99
Figura 47: Imagens de PEI/proteína com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 7,5 μ m.	100
Figura 48: Imagens de PAH/proteína com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.	101
Figura 49: Imagens de PEI/látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.....	101
Figura 50: Imagens de PEI/HA+látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.	102
Figura 51: Imagens de PAH/látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.....	103
Figura 52: Imagens de PAH/HA+látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.	103
Figura 53: Imagens de PEI/HA com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μ m.	104
Figura 54: Imagens de PAH/HA com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escalas de 2 e 4 μ m.....	105
Figura 55: Imagens de PEI/Heparina com 5 e 15 bicamadas e substrato de vidro limpo feitas por MEV (3.000x, escala de 3 e 2 μ m).	106
Figura 56: Representação de filme LbL multicamadas com uma partícula (lipídica ou polimérica) incorporada.	107
Figura 57: Ângulos de contato medidos camada a camada para os sistemas de PEI/proteína e PAH/proteína.	108
Figura 58: Ângulos de contato medidos camada a camada para os sistemas de PEI/HA, PEI/látex, PEI/HA+látex, PAH/HA, PAH/látex e PAH/HA+látex.	109
Figura 59: Ângulo de contato medido camada a camada em filmes de PEI/Heparina.....	110

Figura 60: Eletroforese das proteínas do látex em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) indicando a presença de bandas em 14,4 kD, 20kD, 30kD e 45kD.....	111
Figura 61: Curva de calibração com a concentração conhecida de FHN.	112
Figura 62: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de proteína do látex <i>in natura</i> (in) e desnaturado (des).	114
Figura 63: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de proteínas do látex confeccionados com PEI e PAH.	115
Figura 64: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de PEI/HA, PEI/HA+látex e PEI/látex.	117
Figura 65: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de látex confeccionados com PEI.....	118
Figura 66: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de PAH/HA, PAH/HA+látex e PAH/látex.	119
Figura 67: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de látex confeccionados com PAH.....	120
Figura 68: Resultados do ensaio de MTT para os filmes PEI/heparina; PEI/heparina+bFGF e <i>castings</i> de heparina e heparina+bFGF em 7, 14 e 21 dias de cultivo.....	121
Figura 69: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes e <i>castings</i> do sistema de heparina.....	123
Figura 70: Resultado do ensaio de MTT para 7, 14 e 21 dias para os <i>castings</i> das soluções utilizadas.....	124
Figura 71: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os <i>castings</i> de PEI e proteína do látex.....	126
Figura 72: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os <i>castings</i> de PEI e proteína do látex.....	127
Figura 73: Dados de proliferação dos filmes LbL propostos, em porcentagem (positiva ou negativa), em relação ao controle.	128
Figura 74: Dados de proliferação dos <i>castings</i> , em porcentagem (positiva ou negativa), em relação ao controle.	129
Figura 75: Comparação das bioatividades dos filmes, e sua quantificação frente à ação da heparina ligada a bFGF, adotado como padrão.	131
Figura 76: Curva de calibração com a concentração conhecida de FHN.	132
Figura 77: Quantidade de FHN viáveis sobre monocamadas de proteína do látex em diferentes concentrações.	133

Figura 78: Quantidade de FHN cultivados com proteína do látex em diferentes concentrações no meio de cultura.....	134
Figura 79: Imagens de FHN aderidos sobre substratos de vidro.....	135
Figura 80: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/proteína do látex.....	136
Figura 81: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/proteína do látex.....	137
Figura 82: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/látex.....	138
Figura 83: Comparação de células com gotas d'água para extrapolar quais são as forças de interação entre célula-filme LbL.....	139
Figura 84: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/látex.....	140
Figura 85: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/HA+látex.....	141
Figura 86: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/HA+látex.....	142
Figura 87: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/HA.....	142
Figura 88: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/HA.....	143
Figura 89: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/heparina.....	144
Figura 90: Relação entre rugosidade (Rms), quantidade de material (abs.) e ângulo de contato nos filmes estudados.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempos de imersão usados no ensaio de cinética de deposição das soluções do sistema de látex natural	41
Tabela 2: Filmes LbL de proteínas do látex em diferentes pH.	42
Tabela 3: Filmes LbL de Látex Natural e HA.....	43
Tabela 4: Alíquotas utilizadas no ensaio de Eletroforese	51
Tabela 5: Linearidades dos filmes LbL confeccionados.....	74
Tabela 6: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de proteínas do látex.	113
Tabela 7: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de látex, HA e HA+látex com PEI.....	116
Tabela 8: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de látex, HA e HA+látex com PAH.....	119
Tabela 9: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes e <i>castings</i> do sistema de heparina.	121
Tabela 10: Absorbâncias de formazana detectadas em <i>castings</i> das soluções.....	124
Tabela 11: Comparação entre os filmes LbL tomando como referência os <i>castings</i> e o controle.....	130
Tabela 12: Absorbâncias detectadas no ensaio direto de bioatividade da proteína de látex natural.....	133
Tabela 13: Absorbâncias detectadas no ensaio indireto de bioatividade da proteína de látex natural.....	134
Tabela 14: Resumo dos Resultados Quantificáveis.....	148

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

aFGF	Fator �cido de crescimento de fibroblastos
AFM	Microscopia de força atômica
bc	Bicamadas
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
DEAE-celulose	Dietilaminoetil - celulose
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESI/TEM	Electron spectroscopy imaging / transmission electron microscope
FC	Fator de crescimento
FHN	Fibroblastos humanos normais
HA	�cido húmico
HMDS	1,1,1,3,3,3 Hexametildisilazane
LbL	Camada a camada (do inglês <i>layer-by-layer</i>)
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Metiltiazol Tetrazolium
PAH	Cloridrato de alilamina (do inglês <i>polyallylamine hydrochloride</i>)
PBS	Solução de tampão fosfato (do inglês <i>phosphate buffer solution</i>)
PEI	Polietilenimina
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMMA	Polimetil metaacrilato
PS	Poliestireno
Rms	Rugosidade média (do inglês <i>root mean square</i>)
RSA	Adsorção seqüencial aleatória (do inglês <i>random sequential adsorption</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCPS	Poliestireno para cultura celular (do inglês <i>tissue culture polystyrene</i>)
Tris	Tris(hidroximetil) aminoetano

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Filmes Automontados.....	22
2.2 Forças de interação.....	26
2.3 Formação de filmes LbL com partículas e proteínas	27
2.4 Características do Látex natural.....	28
2.5 Filmes LbL com Fator de crescimento e Heparina	31
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	34
4.1 Confeção dos Filmes LbL.....	34
4.2 Extração da Fração Protéica do látex	37
5 MÉTODOS FÍSICOS DE ENSAIO.....	38
5.1 UV-visível.....	38
5.2 Cinética de deposição	39
5.3 Estudo do crescimento dos filmes LbL	42
5.4 Ensaio de degradação do filme	44
5.5 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR .	45
5.6 Microscopia de Força Atômica - AFM	46
5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	47
5.8 Medição de ângulo de contato	48
6 MÉTODOS BIOLÓGICOS DE ENSAIO.....	50
6.1 Ensaio de Eletroforese.....	50
6.2 Curva de crescimento celular.....	52
6.3 Influência das proteínas do látex no crescimento celular	54
6.4 Morfologia celular por MEV	56
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS ENSAIOS FÍSICOS	59
7.1 Cinética de deposição	59
7.2 Estudo do crescimento dos filmes LbL	66

7.3	Ensaio de degradação	75
7.4	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR .	82
7.5	Microscopia de Força Atômica – AFM.....	88
7.6	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	100
7.7	Medidas de ângulo de contato.....	108
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	111
8.1	Caracterização das proteínas do látex por Eletroforese.....	111
8.2	Curva de crescimento celular.....	112
8.3	Influência das proteínas do látex no crescimento celular	132
8.4	Morfologia celular por Mev.....	135
9	DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	146
10	CONCLUSÕES	149
11	PRÓXIMAS ETAPAS	150
	REFERÊNCIAS	151

1 INTRODUÇÃO

A grande complexidade dos sistemas biológicos dificulta a obtenção de materiais sintéticos adequados para o uso como biomateriais. Os maiores desafios desta área residem no desenvolvimento de um biomaterial que atenda, ao mesmo tempo, todas as exigências mecânicas, físico-químicas e biológicas. Um material biocompatível não deve ser tóxico, provocar processos inflamatórios ou alérgicos, sendo aceito pelo período e aplicação requerida sem se decompor. Adicionalmente, caso o material seja absorvido pelo organismo, seus subprodutos também devem ser inócuos ao hospedeiro [Barbanti et al. 2005]. Há também grande interesse em materiais bioabsorvíveis, embora sua obtenção possua desafios específicos, pois tais materiais necessitam permanecer íntegros por tempo suficiente, enquanto o organismo se restabelece, mantendo suas propriedades mecânicas. Temos, por exemplo, o caso de pinos ortopédicos, que devem oferecer suporte mecânico aos ossos por certo período. Em outras palavras, a absorção do biomaterial deve ocorrer de maneira controlada [Barbanti et al., 2005 e 2006].

Na mesma área de estudos, surgiu o interesse em materiais bioabsorvíveis que sejam capazes de liberar componentes terapêuticos de forma controlada ou modulada. Entretanto, o desenvolvimento de materiais que apresentem tais propriedades enfrenta desafios ainda maiores, pois eles precisam ser simultaneamente (i) não-tóxicos, (ii) biocompatíveis, (iii) possuir boas propriedades mecânicas, (iv) ser adequadamente absorvidos e (v) liberar substâncias terapêuticas em tempo controlado. Para desenvolver tais materiais, diversas pesquisas focam a construção de revestimentos. Os revestimentos, em geral poliméricos, agem como liberadores de drogas quando são aplicados sobre outros materiais que atuam como suporte. Isso permite que materiais com baixas propriedades mecânicas recubram materiais com propriedades melhores, mas com baixa biocompatibilidade. Existem duas técnicas muito estudadas para desenvolver revestimentos ultrafinos: a Langmuir-Blodgett [Ulman, 1996] e a automontagem camada a camada (do inglês *layer-by-layer* - LbL) [Decher, 1997]. Ambas são ferramentas da nanotecnologia para construção de estruturas organizadas de baixo para cima (*bottom-up*). Este tipo de construção permite alto controle da estrutura e dos elementos que compõem o revestimento. A técnica Langmuir-Blodgett é mais onerosa e limitada a substâncias anfifílicas, razão pela qual adotou-se aqui a técnica LbL. A técnica LbL

permite a construção camada a camada de filmes altamente estruturados, construídos por atração eletrostática. É uma técnica simples e versátil onde moléculas positivas (policátions) formam uma monocamada molecular e permitem a deposição de nova camada com cargas opostas (poliânions) apenas imergindo um substrato em solução diluída [Decher, 1997]. Esse processo pode ser repetido diversas vezes para se obter filmes multicamadas depositáveis como revestimento sobre diversos materiais, tais como metais, polímeros e cerâmicas. O procedimento será mais detalhado no tópico “Revisão Bibliográfica”.

Há vários estudos para construir revestimentos com filmes LbL que liberam gradativamente fatores de crescimento (FC) [Mao et al., 2004]. Os FCs são peptídeos endógenos, que quando em pequena concentração, aceleram a proliferação celular enquanto estimulam e direcionam o crescimento de novos vasos sanguíneos [Guyton, 2001]. Em alta concentração os FCs induzem a formação de tumores [Aarosan, 1991] e, portanto, apenas a liberação em pequenas doses mantém sua ação benéfica. Outra desvantagem no uso de FCs reside no fato destes peptídeos serem facilmente desnaturados e, portanto, para revestimentos LbL devem usar um estabilizante como a heparina [Lee et al., 2004; Park e Ito, 2000]. Neste trabalho foram confeccionados revestimentos finos LbL de látex da borracha natural extraída da seringueira. A escolha do látex natural baseou-se em relatos de que membranas de látex natural possuem propriedades curativas [Coutinho e Mrue, 2005; Zimmermann et al., 2007; Oliveira et al., 2003; Pinho et al., 2004], com membranas de látex sendo usadas para tratar lesões de pele [Pele Nova S/A]. O objetivo principal deste trabalho é confeccionar e estudar os melhores parâmetros para obter filmes LbL de látex da borracha natural e suas proteínas, a fim de comparar suas características com os filmes LbL descritos na literatura (FCs e heparina). Esses filmes descritos de heparina e heparina ligada a fator de crescimento também foram confeccionados neste trabalho.

Em suma, a maior motivação deste estudo é a possível aplicação destes filmes LbL de látex como biomaterial para revestimento de dispositivos implantáveis como próteses e *stents*, assim como é teorizado para filmes LbL de proteínas [Schultz et al., 2005; Leguen et al., 2007]. O custo desses biomateriais seria reduzido, pois apesar de existirem materiais comercialmente disponíveis, estes são importados e onerosos. Outra vantagem deste trabalho viria em agregando valor tecnológico ao látex natural, produto cujo Brasil já foi o maior produtor mundial. Caso este trabalho desenvolva produto comercializável, com processamentos simples e reprodutivos, gerando um revestimento esterilizável de valor

acessível, traria benefícios a sociedade e a instituição. Estima-se que os filmes LbL propostos de látex tenham baixos valores de produção porque: (i) as soluções são utilizadas em baixa concentração (cerca de 1 g.L^{-1}); (ii) o látex é usado *in natura* sem que beneficiamentos posteriores a sua extração sejam necessários; (iii) a matéria prima é renovável e nacional; (iv) a técnica LbL é simples, rápida e pode ser aplicada como revestimento sobre diferentes materiais, e em peças de geometria complexa; (v) não há aparatos ou equipamentos específicos para utilizar a técnica LbL; (vi) filmes LbL são produzidos em temperatura ambiente no prazo de algumas horas. Todavia, este tempo ainda pode ser reduzido por ajustes à técnica LbL, onde as soluções são usadas na forma de aerossol [Izquierdo et al., 2005].

Academicamente, os resultados deste trabalho foram apresentados em congressos nacionais como VII Encontro da SBPmat, e internacionais como IV International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures e International Conference on the Science and Technology of Synthetic Metals. Este trabalho foi também selecionado para representar a UFABC e o país no encontro mundial “Campus de Excelencia 2008” nas Ilhas Canárias (Espanha), que visa melhorar as condições de vida da população no hemisfério sul através da distribuição de conhecimento, apresentando jovens pesquisadores a cientistas ganhadores de Nobel e chefes de estado [Pardellas, 2008].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filmes Automontados

Filmes ultrafinos podem ser construídos camada a camada ou LbL (do inglês *layer-by-layer* - LbL) pela técnica de automontagem. Por este método obtém-se uma película de material com estrutura organizada em nível molecular e com espessuras que variam de nanômetros a milímetros, dependendo do material empregado. Este método surgiu como uma alternativa mais simples para a técnica Langmuir-Blogett (LB), que é mais onerosa e lenta, embora determinadas características, *e.i.* organização molecular de filmes formados pela técnica LB sejam superiores à organização dos filmes produzidos por automontagem LbL [Paterno et al., 2001]. Além da simplicidade da técnica LbL, outra vantagem é a variedade de materiais que pode ser empregada, se comparada à técnica LB, pois não se restringe apenas a substâncias anfifílicas. Outro benefício obtido por meio da técnica LbL reside na capacidade de revestir peças de geometrias complexas mantendo, de maneira simples, a mesma estruturação dos filmes depositados sobre superfícies planas, algo não observado na técnica LB. Filmes LbL podem ser automontados sobre diferentes tipos de superfície de qualquer tamanho ou forma, com possíveis aplicações, como biomaterial [Hartgerink et al., 2002].

Há vários materiais que podem ser empregados na construção dos filmes LbL, dentre os quais se destacam: polímeros [Erol et al., 2006; Lvov et al., 1997; Ferreira et al., 2006], sacarídeos [Lvov et al., 1996; Mao et al., 2005; Kang et al., 2004], cerâmicas [Peng et al., 2007], proteínas [Landam et al., 2000; 2001], DNA [Ren et al., 2006] e outros materiais biológicos como hidrogéis ou combinação destes [Tan e Desai, 2004; Kizilel et al., 2006; Lee et al., 2004]. A variedade de materiais aplicáveis à técnica LbL confere ampla versatilidade de aplicações aos filmes formados.

A técnica LbL inicia com pré-tratamento químico do substrato (*e.i.* vidro, quartzo, teflon) para gerar uma superfície carregada eletricamente [Tan e Desai, 2004]. Isso capacita o substrato a adsorver em sua superfície, por atração eletrostática, uma camada de moléculas com cargas positivas (policátions) ou negativas (poliânions) [Decher, 1997; Paterno et al., 2001]. A formação de uma monocamada molecular ocorre quando o substrato é imerso em solução com moléculas a serem adsorvidas ou depositadas. A maioria das moléculas adsorvidas permanece depositada mesmo após enxágue do substrato, que é necessário para

retirar apenas moléculas não aderidas [Decher, 1997; Raposo e Oliveira, 1998]. Após o enxágue da primeira camada, é possível depositar nova camada por meio da imersão do substrato em outra solução com moléculas de cargas opostas. As novas moléculas vão se aderir sobre as moléculas anteriormente depositadas, e com isso obtém-se uma bicamada. Repetindo este processo várias vezes obtém-se filmes multicamadas. Inicialmente, acreditava-se que não havia limites para o número de bicamadas automontadas que um filme LbL podia conter [Raposo e Oliveira, 1998]. Entretanto, caso a densidade de cargas seja fraca, o filme pode atingir um limite máximo devido à desorção das camadas subseqüentes [Sun et al., 2005]. Isso ocorre porque há uma densidade de cargas crítica abaixo da qual não ocorre compensação suficiente de cargas na superfície. Sem uma compensação exagerada das cargas não é possível reverter no sinal da carga na superfície e, conseqüentemente, não há adsorção de nova camada [Sun et al., 2005].

A técnica LbL permite o controle da arquitetura dos filmes quanto à espessura, composição, conformação, rugosidade, grau de ligações iônicas e molhabilidade. O controle é realizado através de parâmetros como concentração química dos constituintes, pH, tempo de deposição, força iônica e temperatura [Decher et al., 1997; Sun et al., 2005]. A maneira que cada parâmetro influencia nessas características ainda não é bem definida, assim como ainda não há explicação teórica para todas as interações intermoleculares que ocorrem nos filmes LbL [Landam et al., 2000]. Experimentalmente, observam-se dois tipos de formação ou crescimento de filme: *linear* e *exponencial*. Ambos os termos dizem respeito à maneira que cada camada depositada contribui para o aumento de material adsorvido no filme. Cada tipo de filme LbL possui algumas características próprias:

(i) *Filmes Lineares*: Cada camada contribui com quantidade idêntica de material. São formados por moléculas que interagem fortemente umas com as outras e, por esta razão, possuem elevado grau de organização, dificultando a difusão do meio para o filme, que não incha com facilidade [Stokton e Rubner, 1997]. A espessura das camadas é baixa se comparada a filmes de crescimento exponencial [Lavallo et al., 2002], embora o filme seja mais bem estruturado [Porcel et al., 2006]. Filmes lineares apresentam organização lamelar e menores rugosidades [Porcel et al., 2006] devido ao maior estiramento das moléculas envolvidas [Stokton e Rubner, 1997].

(ii) *Filmes Exponenciais*: Cada camada contribui com uma quantidade de material maior que a anterior, gerando um crescimento exponencial. Assemelham-se aos hidrogéis pela baixa organização estrutural e pela grande quantidade de material agregado por camada [Porcel et al., 2006], mantendo propriedades mecânicas difíceis de prever teoricamente

[Salomäki et al., 2004]. Entretanto Picart et al. [2001, 2002] observou que devido a diferenças nos índices de difusão entre polícatión e poliânions filmes exponenciais podem ainda apresentar uma estrutura aparentemente estratificada com zonas de diferentes concentrações.

Apesar da formação dos filmes lineares ocorrerem de forma simples, com organização das moléculas em camadas lamelares, os filmes exponenciais não seguem, na maioria dos relatos, esta organização. Alguns modelos foram propostos para explicar o crescimento de filmes exponenciais, o mais recente é o modelo de três zonas. O modelo foi proposto por Samoläki [2005] e Hübsch [2004], e foi parcialmente comprovado por Porcel [2006, 2007]. Este modelo sugere a formação do filme LbL por processos de difusão tanto de moléculas internas, ou seja, dentre moléculas que constituem o próprio filme (como anteriormente observado por Picart et al. 2001 e 2002), quanto moléculas externas, que se encontram na solução do meio. A **Figura 1** esquematiza o mecanismo de construção dos filmes exponenciais em três zonas distintas de deposição. A *zona I* é formada pelas primeiras camadas de material depositado, e sua formação depende principalmente das energias de superfície do substrato. Sobre esta primeira camada, mais material é depositado formando uma *zona III*. Esta zona é caracterizada por ligações mais fracas permitindo que processos de difusão ocorram. A difusão provoca o inchamento do material e forma estruturas menos organizadas, como os hidrogéis. Conforme o número de camadas depositadas aumenta, as moléculas da região mais próxima da *zona I* se reestruturam, formando uma *zona II*, mais densa, onde a difusão é menor. A presença da *zona II* foi parcialmente comprovada por Porcel [2007], que observou que fluoróforos não foram capazes de se difundir além de certa espessura da superfície dos filmes exponenciais. Os filmes LbL exponenciais, portanto, crescem com o aumento da espessura da *zona II*, mantendo inalterada a espessura das *zonas I e III*.

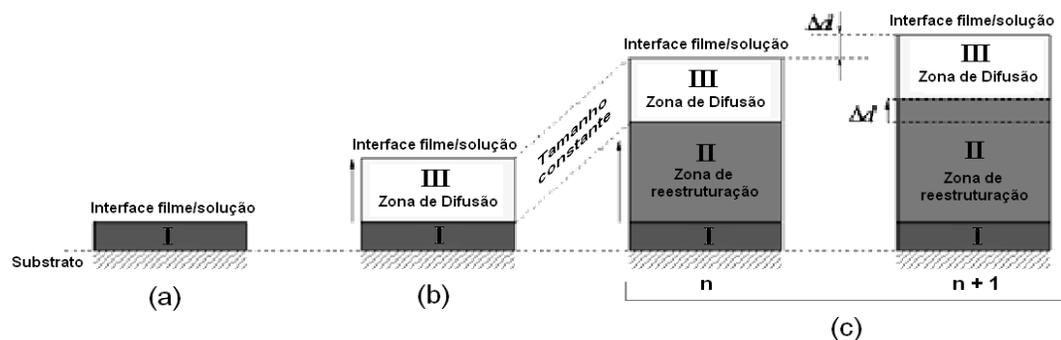


Figura 1: Modelo para crescimento de filmes exponenciais. a) Deposição das primeiras camadas, fortemente ligadas ao substrato; b) Novas deposições permitem alta difusão, formando uma zona III; c) Com o aumento de material há uma reestruturação molecular que forma uma zona II, caracterizado por menor difusão e maior densidade. Fonte: Porcel et al., 2007.

Pelas características apresentadas, os filmes lineares apresentam-se mais atrativos que os exponenciais, devido à superioridade estrutural, pois como os primeiros não se assemelham a géis, isso lhe proporciona maior estabilidade em meio aquoso. A escolha de um tipo de crescimento pode ser realizada pelos materiais empregados, pois alguns polieletrólitos resultam geralmente em filmes lineares e outros em filmes exponenciais [Hübsch et al., 2004]. Embora variando certos parâmetros específicos, como a temperatura [Samoläki et al., 2005], filmes tipicamente exponenciais podem crescer de maneira linear e vice-versa [Porcel et al., 2006 e 2007]. Outros estudos indicam que filmes exponenciais tornam-se filmes lineares após a automontagem de certo número de bicamadas [Hübsch et al., 2004; Porcel et al., 2006]. A explicação para este fenômeno também residiria no modelo de três zonas, pois a mudança exponencial/linear ocorre no momento em que a espessura das *zonas I e III* se estabiliza e o crescimento do filme passa a depender apenas do aumento da *zona II*. Neste estágio, os filmes exponenciais, embora mantendo a estrutura principal, passariam a crescer de forma linear [Porcel et al., 2007]. A transição que ocorre entre os tipos de crescimento atraiu atenção para os filmes exponenciais, por possuírem elevada quantidade de material agregado, com um menor número de camadas depositadas, o que poderia torná-los úteis.

É promissor o estudo de filmes finos para aplicação em biomateriais e para o uso em cultivo celular e em co-culturas (cultura concomitante de mais tipos celulares) [Kang et al., 2004; Fukuda et al., 2006]. Com o simples controle de pH ou da força iônica das soluções empregadas (ou ambos) é possível mudar a arquitetura do filme que permitiriam ou não a adesão celular sobre o material [Mendelsohn et al., 2003]. Outra área de estudo consiste no emprego de substâncias angiogênicas como fator de crescimento (FC), que podem induzir proliferação celular e a formação de novos vasos sanguíneos [Guyton, 2001]. Porém, por se tratar de substância nociva em alta concentração e por suas moléculas serem facilmente degradadas, FC é normalmente estabilizado com moléculas de heparina [Lee et al., 2004; Park e Ito, 2000]. Há descrições de conjugados de FC+heparina aderidos a uma matriz, já que esta última age como imobilizador e acaba por controlar a liberação de FC em nível local [Mao et al., 2005; Park et al., 2000; Wen et al., 1996; Rajangam et al., 2006] e isso será melhor discutido no **item 2.5**.

Há também relatos que membranas de látex natural possuem propriedades similares aos efeitos biológicos do FC [Coutinho e Mrue, 2005; Zimmermann et al., 2007; Oliveira et al., 2003; Pinho et al., 2004]. Essas características e propriedades do látex natural são descritas mais detalhadamente a seguir no **item 2.4**.

2.2 Forças de interação

Conforme descrito anteriormente, a formação dos filmes LbL é governada predominantemente por interações eletrostáticas entre moléculas de cargas opostas. Porém outras interações como pontes de hidrogênio, ligações covalentes, van der Waals [Bai et al., 2006], e impedimentos estéricos podem estar presentes. Portanto, outras forças além da interação eletrostática também podem ser a força dominante na formação dos filmes LbL, dependendo da molécula empregada, sendo comprovado que filmes LbL podem ser obtidos apenas por ligações covalentes [Puniredd e Srinivasan, 2007]; pontes de hidrogênio [Stockton e Rubner, 1997]; e interações biológicas específicas, como por exemplo, avidina/biotina [Erol et al., 2006].

As interações minoritárias em um filme LbL formado por forças eletrostáticas envolvem: (i) interações de van der Waals, que aparecem mesmo em moléculas eletricamente neutras, seja pela atração entre dipolos permanentes e/ou induzidos, ou pela atração entre momentos de dipolos flutuantes criados pelo movimento dos elétrons no átomo [Boal, 2002], (ii) ligações de hidrogênio não suficientemente fortes para sustentar um filme LbL sozinha, que podem agir como força secundária em moléculas com grupos amina [Stockton e Rubner, 1997], como no caso das proteínas, (iii) impedimentos estéricos devido à estrutura molecular (radicais e cadeias laterais) da substância usada e (iv) forças eletrostáticas repulsivas que podem atrapalhar a formação do filme LbL. No entanto, a interação eletrostática em si ainda não é bem entendida [Schein, 2007], o que pode incluir fatores desconhecidos ao processo de deposição molecular sobre substratos. Sabe-se que mesmo moléculas eletricamente neutras [Valadares et al., 2008] apresentam atrações eletrostáticas e especula-se que estas cargas podem ser originárias de átomos adsorvidos do meio ambiente [Gouveia et al., 2005].

Em linhas gerais, pode-se descrever a formação dos filmes LbL pela quantidade de moléculas depositadas sobre um substrato, cuja deposição é o resultado das interações de atração e repulsão. A deposição de material poderia ainda ser definida como o equilíbrio entre os processos de adsorção e dessorção das moléculas do substrato. Podemos então explicar o processo de adsorção iniciando com interações de longo alcance (i.e. atrações eletrostáticas) e, à medida que ocorre a aproximação entre a molécula e a superfície, interações de curto alcance (i.e. Van der Waals) também ocorrem. A dessorção ocorre quando esta interação for fraca, ou quando as interações de repulsão presentes forem mais fortes que as de atração inicial. Neste caso a molécula se dissocia para o meio ambiente novamente. A deposição é dependente de fatores como tempo, concentração, pH [Cheung et al, 1997; Venancio et al.,

2005] e força iônica presente [Sangribsub et al., 2005; Cheung et al, 1997]. No caso dos filmes LbL, o tempo se refere à imersão do substrato. Se o substrato for imerso por tempos suficientemente curtos, pode favorecer a adsorção das moléculas, reduzindo, ou não permitindo, que a dessorção ocorra. Porém se o substrato for imerso por tempos longos demais, haverá a tendência em atingir situação de equilíbrio (adsorção = dessorção) [Venancio et al., 2005]. Caso o filme LbL seja constituído de substâncias que possuam alta afinidade entre si, a relação entre a concentração e o tempo de adsorção é baixa [Cheung et al, 1997]. Porém, independente disso, a deposição de monocamadas poliméricas é, em geral, um processo autolimitante devido à competição pelos sítios da superfície [Cheung et al, 1997].

2.3 Formação de filmes LbL com partículas e proteínas

A deposição de partículas em filmes LbL segue os mesmos preceitos descritos anteriormente. Simulações computacionais de filmes LbL formados apenas com partículas esféricas foram realizadas por Adamczyk et al. [2007, 2008]. Simulando a deposição como ocorrendo por adsorção sequencial aleatória (do inglês *random sequential adsorption* - RSA) consegue-se um grau de recobrimento máximo de 54,7% da superfície. A simulação mostra que há formação de agregados de partículas nas primeiras camadas depositadas, resultando no surgimento de poros em filmes multicamadas [Adamczyk et al., 2008]. Porém, como os filmes LbL propostos neste trabalho não são constituídos apenas de partículas sólidas, mas também de soluções poliméricas, esta simulação não é completamente aplicável. Filmes LbL confeccionados com látex natural intercalados com camadas de polieletrólitos poliméricos (PAH) foram estudados anteriormente por Ferreira et al. [2006] associados com ácido húmico. No entanto, o entendimento sobre o processo de formação deste filme ainda requer elucidação.

Foi estudado por Sruanganurak et al. [2006] a deposição de partículas de polimetilmetaacrilato (PMMA) sobre superfícies quimicamente modificadas de borracha natural, porém, a única semelhança com o proposto neste trabalho reside no tipo de material usado. Estudo mais relevante foi publicado por Sangribsub et al. [2005] que confeccionou filmes LbL com partículas esféricas de PS sobre a superfície de polietilenimina (PEI). Este filme atingiu um grau de recobrimento de 80% da superfície, observando na superfície a presença de partículas tanto isoladas quanto aglomeradas. O alto grau de recobrimento da superfície prova que experimentalmente as partículas não se depositam aleatoriamente

[Sangribsub et al., 2005]. Agregar partículas sólidas em filmes LbL também provoca irregularidades na superfície, cujo grau de irregularidade depende da relação entre o tamanho da partícula e a espessura da camada de polieletrólito [Volodkin et al., 2008]. Experimentalmente ocorre a conformação das camadas poliméricas tanto acima quanto abaixo da partícula [Volodkin et al., 2008]. Este fenômeno é muito estudado na incorporação de vesículas lipídicas (ou lipossomos) em filmes LbL [Volodkin et al., 2007; 2008], pois camadas com baixa conformação resultam no rompimento do lipossomo.

Há diferença na adsorção de proteínas em superfícies sólidas ou em polímeros hidrossolúveis. Os polímeros têm normalmente cadeias com tamanhos diferentes, flexíveis e que se acomodam ao formato das proteínas [Landam et al., 2000]. Nos filmes LbL com proteínas, essas características tornam a teoria de deposição molecular na forma de monocamadas inaplicável. Sendo uma única camada de proteína formada aproximadamente por duas camadas de material, fenômeno observado pela espessura da camada que supera o raio molecular da proteína [Landam et al., 2000]. Em outras palavras, a deposição de proteínas segue na forma de bicamada, onde cada imersão do substrato resulta em duas camadas de material. A razão para a alta deposição de proteínas é a atração existente entre proteína/proteína que forma nova superfície adsortiva sobre a primeira camada depositada [Landam et al., 2001]. De qualquer forma, as proteínas possuem grupos químicos que lhe conferem tanto cargas positivas quanto negativas, permitindo que haja deposição sobre superfícies independentemente da carga elétrica dominante [Landam et al., 2001]. Possivelmente outras interações além das forças eletrostáticas, como pontes de hidrogênio, contribuam para a formação do filme LbL usando moléculas com alta concentração de grupos amina [Stokton e Rubner, 1997]. Entretanto, observa-se uma maior deposição de proteínas sobre as superfícies com cargas de sinal oposto, resultando em recobrimento de 90% da superfície [Landam et al., 2000; 2001].

2.4 Características do Látex natural

A borracha natural teve nos últimos anos grande aumento na produção devido à criação de clones mais produtivos e resistentes a intempéries [Hayashi, 2009]. O látex natural usado neste trabalho foi extraído de clone RRIM600 cuja produção é descrita como quase invariável as condições climáticas [Raj et al., 2005]. O látex natural (*Hevea brasiliensis*) é praticamente neutro (pH 7,0 a 7,2), mas quando exposto ao ar por um período de 12 a 24

horas, o pH cai para 5,0 sofrendo coagulação espontânea, formando o elastômero conhecido como borracha [Kowalski, 2006]. Para evitar a coagulação do látex deve-se adicionar logo após a sua extração um mínimo de 0,05% de amônia para mantê-lo em suspensão [Morton, 1987]. O látex natural é constituído de 40-45% de 1,4 poli-cis-isopreno, 4-5% de não-borrachas e 50% de água [Ferreira et al., 2006]. Os componentes menores de não-borrachas, ainda não completamente identificados são proteínas, minerais, carboidratos, lipídios [Hayashi, 2009] e enzimas [d'Auzac et al., 1989]. O poliisopreno (**Figura 2**) é representado por $(C_5H_8)_n$, sendo n da ordem de 10.000 com massa molar média de 600.000 a 950.000 g/mol [Kowalski, 2006]. O látex natural é um complexo coloidal onde partículas de poli-cis-isopreno ficam dispersas em meio aquoso estabilizado por proteínas fosfolipídicas negativamente carregadas [Rippel et al., 2003; d'Auzac et al., 1989]. Essas partículas possuem formas esféricas, mas podem variar com a idade do material [Rippel et al., 2003] ou tamanho da partícula, apresentando-se piriforme ou oval (forma de paramecium) [d'Auzac et al., 1989]. As partículas pequenas têm pouca quantidade de cadeias de poli-cis-isopreno e podem ainda após evaporação formar um envelope oco [Rippel et al., 2005]. Todas as partículas de látex são constituídas de microgel, rico em cálcio e pobre em nitrogênio, que forma duas regiões distintas dentro das partículas, diferenciadas pela densidade [Rippel et al., 2005]. Imagens de partículas de látex estabilizadas em meio amoniacal foram feitas por *electron spectroscopy imaging/transmission electron microscope* (ESI/TEM) divulgadas por Rippel et al. [2005] e reproduzidas na **Figura 3**. As partículas detectadas apresentam tamanhos aproximados de 1500 a 2340 nm (1,5 a 2,3 μ m) [Rippel et al., 2005], mas sabe-se que podem variar de 5nm a 3 μ m [d'Auzac et al., 1989].

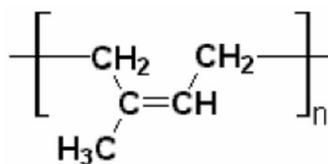


Figura 2: Unidade repetitiva do poli-cis-isopreno. Fonte: Kowalski, 2006.

A borracha natural é muito utilizada na clínica médica em produtos como luvas e preservativos; pela alta propriedade de barreira e impermeabilização a vírus que o material possui [Peng et al., 2007]. Foi também descrito que o látex natural possui ação antifúngica, pois contém substâncias que clivam a quitina da parede celular dos fungos [Bokma et al., 2002] e agem sinérgicamente com outros fungicidas [Giordani et al., 1999; 2002]. Além

disso, estudos com membranas de borracha natural conjugada com hidrobromida de poli-L-lisina [Oliveira et al., 2003; Rabelo et al., 2005; Pinho et al., 2004] aplicadas tanto em humanos [Oliveira et al., 2003] quanto em animais, induziram alta angiogênese (neovascularização). Esses estudos indicaram apenas reações inflamatórias menores com infiltração de fibroblastos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos.

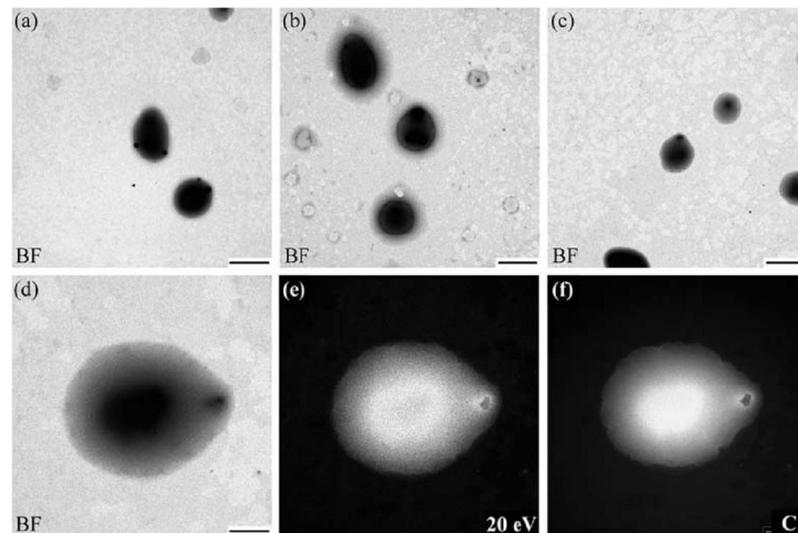


Figura 3: Imagens de ESI/TEM de partículas de látex natural em meio amoniacal. Imagens a-c são de campo-claro e mostram partículas de formas diferentes. Escala = 1500 nm. A imagem d mostra uma partícula piriforme (escala de 500 nm). As imagens e-f correspondem respectivamente, a imagem plasmom e C-map, evidenciando o ponto mais denso no microgel. Fonte: Rippel et al., 2005.

O produto chamado Biocure® disponível comercialmente, e construído à base de borracha natural, é indicado para o tratamento de ferimentos crônicos [Pele Nova S/A]. Oliveira [2003] também ressaltou que há vantagens em utilizar membranas de borracha natural em transplantes, pois não há o risco de transmitir doenças, como há quando se usa membranas de origem humana ou animal. Portanto, as tentativas em aliar as propriedades terapêuticas do látex natural com as técnicas da nanotecnologia podem levar ao desenvolvimento de novos produtos e aplicações, agregando alto valor a esse versátil material nacional.

A confecção de filmes finos LbL de polieletrólitos, látex natural e látex associado a ácido húmico já foi estudada anteriormente [Ferreira et al., 2006] e os filmes exibiram bom desempenho, permitindo a adesão e espalhamento celular. No entanto, filmes LbL formados com as proteínas do látex natural ainda não foram reportados, bem como as influências que o

tipo de polication (PEI e cloridrato de polialilamina - PAH) pode provocar tanto no crescimento do filme, quanto nas suas propriedades físicas e biológicas.

2.5 Filmes LbL com Fator de crescimento e Heparina

Fatores de crescimento (FC) são geralmente peptídeos pequenos e há mais de uma dúzia de tipos identificados. São liberados pelas células animais quando em lesão ou deficiência de oxigênio e nutrientes. Isso promove a criação de novos vasos sanguíneos partindo de brotamentos de vênulas ou capilares, chegando à formação de nova rede de perfusão (angiogênese) [Guyton, 2001]. FC tem vida útil de poucos minutos (15-17 min) [Mao et al., 2005] e se estiverem presentes em altas concentrações levam à proliferação celular exagerada, aumentando os riscos de formação de tumores [Aaronson, 1991]. Muitos esforços em imobilizar FC e liberá-lo de forma controlada e contínua, vêm sendo estudados. Em alguns estudos usa-se heparina para imobilizar moléculas de FC [Mao et al., 2005; Lee et al., 2004; Park et al., 2000; Rajangam et al., 2006; Tammela et al., 2007; Hosseinkhani et al., 2006] que podem ser automontadas usando a técnica LbL. A escolha da heparina como estabilizador químico do FC é devido a sua similaridade com o composto heparana sulfato (**Figura 4**) presente nas membranas celulares. A heparana sulfato protege o FC da degradação proteolítica do meio extracelular aumentando sua meia vida biológica [Fisher et al., 2007] permitindo que o FC atue na célula.

Heparina é um glicosaminoglicano formado principalmente de ácido idurônico (IdoA) e ácido glicurônico (GicA), e a alta concentração de grupos sulfatos e carboxilatos garante alta concentração de cargas negativas [Nelson e Cox, 2006]. Fisiologicamente, a heparina é produzida por algumas células, como os mastócitos e basófilos, sendo liberada em pequena concentração no sangue. Como medicamento, é um forte anticoagulante indicada no tratamento de coagulopatias e em cirurgias com circulação extra-corpórea [Rajangam et al., 2006], age se combinando com a antitrombina III aumentando em até 1000 vezes a eficácia desta em remover a trombina. A trombina, por sua vez, é uma enzima proteolítica imprescindível na formação de coágulos sanguíneos [Guyton, 2001].

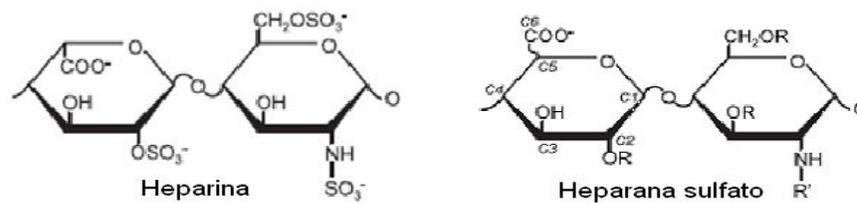


Figura 4: Estruturas moleculares da heparina e da heparana sulfato. Fonte: Buck et al. 2006

A heparina liga-se por atração eletrostática nas áreas de carga positiva das moléculas do FC como representado pela **Figura 5** para o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1 ou aFGF) [Nelson e Cox, 2006]. Uma molécula de heparina possui de 6 a 7 sítios de ligação para fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) [Wen et al., 1996], sendo a afinidade da heparina comprovada para vários tipos de FC como: fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) [Lee et al., 2004; Tammela et al., 2007]; fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF) [Mao et al., 2005] e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) [Aaronson, 1991]. Lee et al. [2004] conseguiu uma liberação contínua por até 10 dias de VEGF conjugando a heparina em hidrogéis. Mao et al. [2005] produziu um filme automontado de PEI com heparina e aFGF observando boa estabilidade em filmes LbL, apesar de que a interação entre heparina e aFGF ser maior que a atração da mistura heparina+aFGF pelo PEI. Como modelo para o estudo comparativo das propriedades angiogênicas do látex natural e suas proteínas será utilizado o composto heparina e bFGF na forma de filme LbL PEI/heparina+bFGF. O bFGF foi escolhido porque sua ação proliferativa não é potencializada pela heparina, assim como ocorre com o aFGF [Thomas e Gimenez-Gallego, 1986], e foge do nosso objetivo de quantificar comparativamente a ação biológica do látex natural apenas com o fator de crescimento.

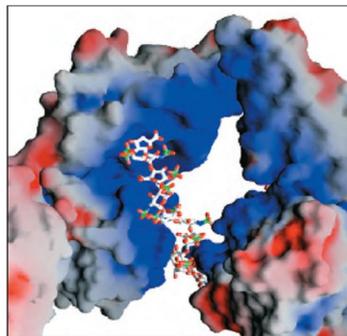


Figura 5: Interação entre fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1) e um segmento de heparina. O vermelho representa as cargas negativa e azul positiva. A heparina (molécula central em pontos e traços) é atraída pela área positiva em azul. Fonte: Nelson e Cox, 2006.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar os melhores parâmetros para a obtenção de filmes LbL de látex e suas proteínas, determinar suas características físicas e biológicas, avaliando o potencial destes como biomaterial. Os filmes LbL propostos foram separados em grupos de acordo com os materiais empregados, a separação em três sistemas distintos facilitará a posterior comparação de suas características:

- **Sistema de proteínas do látex natural:** filmes PEI/proteína e PAH/proteína do látex natural em estado *in natura* e desnaturado;

-**Sistema de látex natural:** filmes PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA+látex, PAH/HA+látex, PEI/HA e PAH/HA.

- **Sistema de heparina:** filmes PEI/heparina sódica e PEI/heparina+bFGF.

Os sistemas foram caracterizados fisicamente pelos seguintes métodos: (i) espectroscopia de UV-visível, para avaliar a cinética de deposição, o sistema de crescimento do filme e a degradação dos filmes; (ii) espectroscopia na região do infravermelho – FTIR, para avaliar os grupos químicos presentes; (iii) microscopia de força atômica – AFM e (iv) microscopia eletrônica de varredura – MEV, para estudar a topografia das amostras; (v) determinação de ângulos de contato, para verificar molhabilidade da superfície dos filmes.

Os filmes LbL foram caracterizados biologicamente por: (i) cultura e contagem celular pela técnica metiltiazol tetrazolium (MTT), para testar a influência dos filmes sobre a proliferação de fibroblastos humanos normais; (ii) MEV para observar as células aderidas sobre os filmes. A fração protéica foi analisada por (iii) eletroforese, e a bioatividade direta e indireta sobre as células foi verificada por MTT (iv).

4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

4.1 Confeção dos Filmes LbL

4.1.1 *Materiais*

Na produção dos filmes LbL foram utilizadas as soluções descritas abaixo:

- Polietilenimina – PEI - $[H(NHCH_2CH_2)_nNH_2]$ - MM 25.000 $g.mol^{-1}$ – adquirido da empresa Sigma Aldrich] solução em concentração de 0,1 $mg.mL^{-1}$ em pH 6,0;
- Cloridrato de Polialilamina - PAH – $[CH_2CH(CH_2NH_2.HCl)]$ - MM 56.000 $g.mol^{-1}$ – adquirido da empresa Alfa Aesar) solução em concentração de 0,5 $mg.mL^{-1}$ em pH 6,0;
- Ácido húmico - HA [adquirido da empresa Fluka] solução em concentração de 0,5 $mg.mL^{-1}$ em pH 9,0;
- Látex natural [extraído da árvore *Hevea brasiliensis*, clone RRIM600 cedido pela Embrapa – Instrumentação Agropecuária] em concentração de 2,5 $\mu L.mL^{-1}$ em pH 9,0;
- Proteína purificada do látex [doador por Ricardo Mendonça e Joaquim Coutinho Netto da FMRP-USP - 14 a 50 kDa, ponto isoelétrico 4.7] solução em concentração de 1 $mg.mL^{-1}$ em tampão tris(hidroximetil) aminoetano 10 mM em pH 7,4;
- Solução 1:1 (v/v) de látex natural (2,5 $\mu L.mL^{-1}$) e HA (0,5 $mg.mL^{-1}$) em pH 9,0.
- Heparina sódica (Porcina – MM 5000g – Fisher BioReagents) em concentração 0,4 $mg.mL^{-1}$ em tampão PBS em pH 7,4.
- Solução de heparina+bFGF – 10 μg fator básico de crescimento de fibroblastos humanos (Recombinante – adquirido da Invitrogen) foram solubilizados em 100 μL tampão tris(hidroximetil) aminoetano 10 mM em pH 7,6. Este volume foi adicionado a 2.900 μL de heparina sódica em PBS, atingindo as concentrações finais de 0,003 $mg.mL^{-1}$ de bFGF e 0,4 $mg.mL^{-1}$ de heparina sódica.

4.1.2 *Procedimento*

Substratos de vidro, quartzo, mica, ouro e placa de poliestireno para cultivo de células (TCPS) foram usados como suporte para a automontagem dos filmes LbL. A escolha do tipo

de substrato utilizado na confecção dos filmes dependeu dos testes realizados e, portanto, esta informação é descrita nos procedimentos de cada técnica. O procedimento usado para a obtenção dos filmes LbL está esquematizado na **Figura 6**, porém, tal procedimento se inicia com a limpeza do substrato.

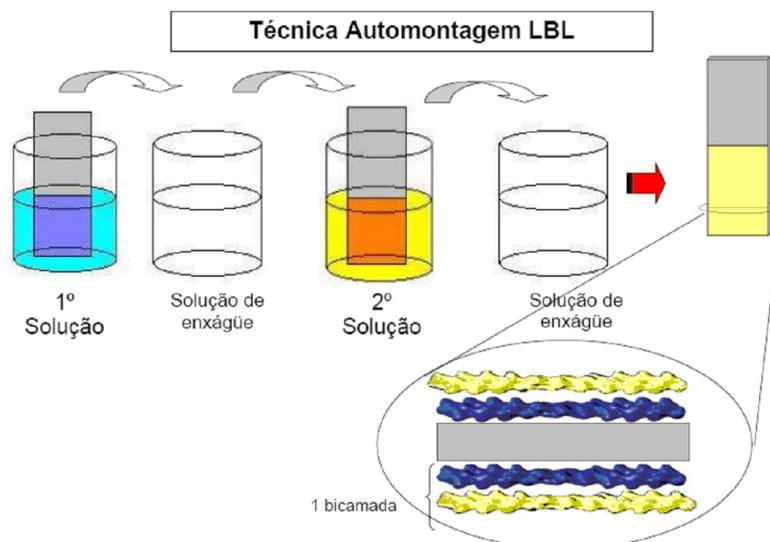


Figura 6: Procedimento de preparação de filmes LbL. O substrato é imerso na 1ª solução por alguns minutos, enxaguado e novamente imerso na 2ª solução com carga contrária. É mantido por alguns minutos na nova solução, obtendo uma bicamada após enxágue.

Cada tipo de substrato possui um procedimento próprio de limpeza. *Substratos de quartzo e vidro* são limpos por solução “piranha”: imersão em soluções básica (NH_4OH , H_2O_2 e H_2O , 1:1:6 v/v) por 10 minutos seguido de imersão em solução ácida (HCl , H_2O_2 e H_2O , 1:1:5 v/v) por 5 minutos, ambas as soluções aquecidas a 80°C ; sendo os substratos enxaguados em água MilliQ entre cada imersão. *Substratos de ouro* são limpos apenas com os solventes: acetona e álcool etílico. *Substratos de mica* são limpos através da desfolhação das camadas mais externas do material com a ajuda de uma fita adesiva. *Substratos de TCPS* foram usados conforme recebidos, sem limpeza adicional por se tratar de placa estéril para cultura celular.

Após a limpeza do substrato, o mesmo foi imerso na 1ª solução constituída de polieletrólitos positivos (PEI ou PAH). O substrato foi mantido imerso na solução por um tempo determinado para obtenção de uma monocamada. O excesso de solução foi eliminado por enxágue e o substrato foi seco logo em seguida por fluxo de nitrogênio. O substrato foi novamente imerso na 2ª solução constituída de polieletrólitos negativos (látex, látex+HA, HA

e proteínas do látex), permanecendo por tempo determinado, e após novo enxágue e secagem, obtém-se uma bicamada. A quantidade de camadas confeccionadas neste trabalho variou conforme o teste até um máximo de vinte bicamadas. As unidades repetitivas dos filmes LbL são usualmente representadas com a sigla do polycation/sigla do poliânion, e.g. PEI/HA ou (PEI/HA)_n; sendo n o número de bicamadas do filme. Neste trabalho adotaremos apenas a primeira grafia.

Os filmes LbL foram divididos em três grupos de acordo com os materiais empregados: (i) sistema de proteínas do látex, (ii) sistema de látex natural e (iii) sistema de heparina sódica.

- (i) Para o sistema de proteínas do látex foram confeccionados os filmes PEI/proteína e PAH/proteína nos pHs 3,0; 7,4 e 9,0 para determinar o pH cujos os filmes sejam melhor depositados.
- (ii) Para o sistema de látex natural, os filmes PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex foram fabricados.
- (iii) Para o sistema de heparina, filmes PEI/heparina sódica foram feitos.

Os tempos de imersão do substrato para obtenção de uma monocamada, das soluções de proteínas do látex, foram obtidos após o estudo da cinética de deposição, conforme descrito no **item 5.1.1**. Os filmes citados acima foram analisados por ensaios físicos e químicos, resumidamente dispostos no diagrama da **Figura 7**.



Figura 7: Diagrama com todos os ensaios físicos e biológicos realizados nos filmes LbL propostos e/ou nas monocamadas das soluções utilizadas em sua confecção (*castings*).

4.2 Extração da Fração Protéica do látex

A fração protéica usada neste trabalho foi extraída do látex natural seguindo o procedimento desenvolvido por Ricardo J. Mendonça [2008]: (i) 500mL da solução de látex foram diluídos sob agitação branda com 2,2% de ácido acético na proporção de 1:2 (v/v). (ii) Após repouso absoluto de 30 minutos para a completa coagulação da borracha, o soro de aspecto límpido e amarelado foi decantado. (iii) O soro diluído em 1:1 (v/v) com água destilada teve seu pH corrigido para 9,0 com NaOH 5M. (iv) A solução foi passada por coluna cromatográfica de DEAE-celulose (5 cm x 50 cm) em tampão de bicarbonato de amônio 0,01 M (pH 7,8), que separou os componentes com cargas negativas. O fluxo empregado foi de 7 ml/min e o eluato foi monitorado a 280 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000. (v) O líquido eluído em tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, foi novamente passado pela coluna de cromatografia com gradientes descontínuos e crescentes de NaCl (0 M; 0,15 M; 0,25 M e 1,5 M). (vi) O material foi coletado de acordo com o perfil cromatográfico e submetido à diálise contra água destilada. (vii) As proteínas resultantes foram liofilizadas e armazenadas à -20° C.

A fração protéica, ou simplesmente as proteínas do látex como passarão a ser denominadas, foram doadas por Ricardo Mendonça e Joaquim Coutinho Netto, do laboratório de bioquímica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. O ponto isoeletrico das proteínas purificadas foi identificado em pH 4,7, próximo do pI identificado para o látex (pH 4,0 – 4,6) [d'Auzac et al., 1989]. Por ponto isoeletrico, ou pI, entende-se o valor de pH onde uma molécula de proteína apresenta carga elétrica efetiva igual à zero. O ensaio de eletroforese foi efetuado para determinar o tamanho das proteínas que compõem o material recebido. O procedimento de análise e os resultados estão dispostos, respectivamente, nos **itens 6.1 e 8.1** deste trabalho.

5 MÉTODOS FÍSICOS DE ENSAIO

5.1 UV-visível

Por meio de dados de UV-visível pode-se determinar a concentração das amostras pela lei de Lambert-Beer, que relaciona a absorvância de luz como sendo diretamente proporcional à concentração do material. O aparelho funciona a partir da radiação, com comprimentos de onda do UV ao visível, emitida por uma lâmpada. Esta luz atravessa a amostra e é focalizada na entrada de um espectrofotômetro. A intensidade da luz transmitida através da amostra, ou inversamente absorvida por esta, é quantizada separadamente para cada comprimento de onda. A quantização é realizada por comparação com a intensidade de luz de um feixe de referência que não passa pela amostra. A absorção em regiões do visível afeta diretamente a cor dos reagentes envolvidos, enquanto que na região eletromagnética do espectro as moléculas sofrem transições eletrônicas [Skoog, et al., 2006].

Neste trabalho a espectroscopia de UV-visível foi adotada para realizar três investigações diferentes: (i) determinar cinética de deposição das soluções utilizadas; (ii) acompanhar o processo de formação ou crescimento dos filmes LbL; e (iii) verificar a degradação dos filmes em meio aquoso. Para realizar esses ensaios os filmes LbL foram automontados em substratos de quartzo que são transparentes à luz UV. As determinações foram realizadas no Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados – LEMN da UFABC em equipamento UV-vis da marca Varian, modelo Cary 50.

5.2 Cinética de deposição

5.2.1 Sistema de proteínas do látex

O tempo de imersão do substrato é um parâmetro importante na técnica LbL e sua escolha pode ser norteada pelo estudo da cinética de deposição das moléculas. Neste trabalho a cinética foi estudada por três testes diferentes que nos permitiu observar a deposição das soluções sobre diferentes regimes: A) imersão de mesmo substrato por 30 segundos; B) imersão de mesmo substrato por períodos variáveis; C) imersão de vários substratos. Esses testes seguiram o procedimento descrito por Venâncio et al. [2005]. A cinética das proteínas do látex foi avaliada (testes A, B e C) em soluções com pHs 3,0; 7,4 e 9,0. As soluções com pH 7,4 e 9,0 foram tamponadas com tris(hidroximetil) aminoetano 10 mM, no pH determinado, e as soluções com pH 3,0 foram tamponadas com tampão acetato 0,1M.

A) Imersão de mesmo substrato por 30 segundos: Neste procedimento um mesmo substrato de quartzo limpo foi imerso na solução de teste por 0,5 minuto, secado com fluxo de nitrogênio e analisado em UV-vis com varredura de 200 a 500 nm. Este procedimento foi repetido por 14 vezes. O tempo de 0,5 minuto de deposição favorece a absorção e não a dessorção de material, por não permitir que a deposição entre em equilíbrio. É esperado que neste regime haja um aumento na deposição, caso as moléculas possam se automontar sobre si mesmas [Venancio et al., 2005].

B) Imersão de mesmo substrato por períodos variáveis de tempo: Um mesmo substrato de quartzo limpo foi imerso por tempos variáveis na solução de teste e foi analisado conforme descrito no teste A. Foram realizadas 3 imersões do substrato com tempos de 0,5 minuto; 3 imersões de 1,0 minuto; 3 imersões de 2,0 minutos e mais 3 imersões com tempos de 4,0 minutos. A variação do tempo permite observar se há mudanças na deposição em regimes que favoreçam primeiramente a adsorção, e que migra para o equilíbrio entre a absorção e dessorção conforme são imersos por tempos mais longos. É esperado que em regime de equilíbrio a quantidade de material adsorvido e dessorvido sejam idênticas e a deposição de material se estabilize com o tempo [Venancio et al., 2005].

C) Imersão de vários substratos: Quatro substratos de quartzo diferentes foram imersos apenas uma vez na solução de proteínas do látex em diferentes tempos. Os tempos ensaiados foram 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 minutos. Depois da imersão, cada substrato foi seco com fluxo de nitrogênio e analisado em UV-vis. Este teste avalia a deposição em condição de equilíbrio e permite visualizar quanto material é depositado em uma única camada, sem a

interferência provocada por várias secagens ou deposições adicionais. Os resultados deste teste estão apresentados no **item 7.1.1**.

5.2.2 *Sistema de látex natural*

A cinética de deposição das moléculas de PEI, PAH, HA, HA+látex e látex natural foi estudada por dois testes diferentes. Ao contrário dos sistemas de proteínas do látex e heparina, onde o estudo de cinética foi necessário para determinar os tempos de imersão para confeccionar os filmes LbL, esse ensaio para o sistema de látex natural teve outro propósito. Como outros estudos haviam sido previamente realizados com filmes de PAH/HA [Crespilho et al., 2005] e PAH/látex [Ferreira et al., 2006] os mesmos tempos foram adotados neste trabalho. Portanto, o estudo de cinética realizado para o sistema de látex natural teve intuito confirmatório, e não informativo para o tempo de imersão a ser adotado. Dois testes foram realizados em cada solução e devido a similaridades com os ensaios previamente descritos no **item 5.2.1** foram identificados como teste B e C.

B) Imersão de mesmo substrato: Um mesmo substrato de quartzo limpo foi imerso por períodos de tempo determinado na **Tabela 1** na solução de teste, sendo seco com fluxo de nitrogênio e analisado em UV-vis conforme descrito no **item 5.2.1**.

C) Imersão de vários substratos: Cinco substratos de quartzo diferentes foram imersos apenas uma vez nas soluções em teste por períodos diferentes de tempo, conforme discriminado na **Tabela 1**. Depois da imersão, cada substrato foi seco e analisado em UV-vis. Os resultados destes testes são apresentados no **item 7.1.2**.

Tabela 1: Tempos de imersão usados no ensaio de cinética de deposição das soluções do sistema de látex natural

Solução Analisada	Teste B		Teste C
	Número de imersões	Tempo (min)	Tempos (min)
HA	1	0,5	1,0; 3,0; 5,0; 7,0; e 10,0
	5	1,0	
	3	5,0	
HA+látex	1	0,5	1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0
	5	1,0	
	3	5,0	
Látex	1	0,5	1,0; 1,5; 3,5 e 5,0
	6	1,0	
	2	5,0	
PAH	5	0,5	1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0
	5	1,0	
	5	2,0	
	7	3,0	
PEI	5	0,5	1,0; 3,0; 5,0; 7,0; e 10,0
	5	1,0	
	5	2,0	
	7	3,0	

5.2.3 Sistema de heparina

A cinética de deposição de solução de heparina sódica ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$) foi ensaiada com os mesmos procedimentos descritos para as soluções de proteína do látex (**item 5.2.1**). Os resultados dos testes A, B e C para heparina sódica em pH 7,4, são apresentados no **item 7.1.3**.

5.3 Estudo do crescimento dos filmes LbL

O estudo do crescimento do filme LbL permite determinar seu tipo de deposição, linear ou exponencial. Em filme linearmente automontado cada camada contribui com quantidade idêntica de material e, portanto, observa-se um aumento proporcional na absorvância por espectroscopia de UV-visível (500 a 200 nm). Empregou-se o mesmo equipamento descrito no **item 5.1**.

5.3.1 Sistema de proteínas do látex

Filmes LbL de PEI/proteína e PAH/proteína do látex foram automontados em triplicata até 10 bicamadas, seguindo os tempos de deposição determinados na **Tabela 2**. Medidas de UV-visível foram realizadas durante a formação dos filmes a cada duas bicamadas automontadas. Outros filmes de PEI/proteína e PAH/proteína do látex em pH 7,4 foram feitos, mas com as proteínas previamente desnaturadas por ação térmica (aquecidas a 90°C por 10 minutos). Esses filmes serviram para testar se o estado das proteínas pode influenciar na confecção de filmes LbL. Resultados são apresentados na no **item 7.2.1**.

Tabela 2: Filmes LbL de proteínas do látex em diferentes pH.

Policação	Tempo de imersão (min)	Poliânion	Tempo de imersão (min)
PEI	3	Proteína pH 3,0	3
PEI	3	Proteína pH 7,4	3
PEI	3	Proteína pH 9,0	3
PAH	3	Proteína pH 3,0	5
PAH	3	Proteína pH 7,4	3
PAH	3	Proteína pH 9,0	3

5.3.2 Sistema de látex natural

Filmes de PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA, PAH/HA, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex natural foram confeccionados em triplicata com os tempos de imersão mostrados na **Tabela 3**, até 10 bicamadas. O látex natural é constituído de partículas de borracha com cadeias poliméricas de alta massa molar, com grande tendência a se aglomerar. Portanto, acredita-se

que a associação do látex com HA favoreça a dispersão das partículas de látex natural, formando filmes LbL mais homogêneos. O HA também pode favorecer a confecção dos filmes de látex ao elevar a densidade de cargas negativas da solução de poliânions. Todos os resultados são apresentados no **item 7.2.2**.

Tabela 3: Filmes LbL de Látex Natural e HA

Policación	Tempo de imersão (min)	Poliânion	Tempo de imersão (min)
PEI	3	Látex	5
PEI	3	HA+látex	5
PAH	3	Látex	5
PAH	3	HA+látex	5
PEI	3	HÁ	5
PAH	3	HÁ	5

5.3.3 *Sistema de heparina*

Filmes de PEI/heparina sódica e PEI/heparina+bFGF foram confeccionados em triplicata usando tempos de deposição de 3 minutos para ambas as soluções. Esses filmes foram previamente estudados por Mao et al. [2005] que acompanhou o crescimento após conjugar as moléculas e heparina e fator de crescimento com substância fluorófora. Como foi possível acompanhar o crescimento sem a utilização de corantes que podem influenciar na formação dos filmes, esse procedimento não foi adotado neste trabalho. Os resultados desta análise são apresentados no **item 7.2.3**.

5.4 Ensaio de degradação do filme

O ensaio de degradação dos filmes LbL foi realizado para estudar o tempo que o filme permanece íntegro em meio aquoso. Este parâmetro serve para estimar o tempo de ação deste filme quando implantado no organismo. O teste proposto consiste em incubar as amostras em solução tampão fosfato (PBS) a 37°C em 5% de CO₂ e acompanhar, com leituras periódicas de UV-visível, a variação na absorbância do filme. Este procedimento segue, com adaptações, a norma ASTM F1635-04a para degradação *in vitro* de polímeros hidroliticamente degradáveis aplicados a implantes cirúrgicos.

Amostras dos filmes PEI/HA, PAH/HA, PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA+látex, PAH/HA+látex, PEI/proteína, PAH/proteína, PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF com 10 bicamadas foram fabricados em triplicata, automontados sobre substratos de quartzo. Os filmes, devidamente identificados, foram acondicionados em placas de cultura contendo 1,5 mL de PBS em cada poço (placa com 24 poços). O suporte para amostras sólidas do aparelho de UV-vis modelo Cary 50 da Varian Inc. foi fixado de maneira que a região de leitura da absorbância fosse à mesma em todos os dias de ensaio. Leituras de UV-vis foram realizadas de 12h em 12h nos primeiros 2 dias, diariamente até o 6º dia, e a cada 2 dias até completar o período de 21 dias de ensaio (o último intervalo de tempo foi de 3 dias). Após cada determinação a solução PBS foi descartada, a placa foi lavada com álcool 70% sendo mantida sob luz UV por 15 minutos antes de receber nova solução PBS. Este procedimento foi adotado para evitar que a proliferação de microrganismos alterasse a degradação dos filmes e contaminasse a estufa de CO₂. Os resultados deste ensaio são apresentados e discutidos **no item 7.3.**

5.5 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

FTIR é uma técnica para identificar os grupos funcionais e a estrutura molecular presente na amostra. Em linhas gerais, uma fonte de infravermelho que emite radiação de baixa energia interage com a matéria em três processos: absorção, emissão e espalhamento de radiação [Silverstein et al., 2007]. O infravermelho provoca uma vibração normal na molécula, que pode ser de estiramento, deformação angular e torção das ligações dos átomos que a compõem. As interferências em cada comprimento de onda são registradas na forma de um espectro, um perfil espectral [Carnevarolo Jr., 2003]. A identificação dos picos é feita por comparação com a literatura publicada, o que permite acompanhar os processos que ocorrem entre as moléculas que compõem os filmes LbL.

Apenas as amostras PEI/HA+látex; PEI/látex; PAH/HA+látex; PAH/látex do sistema de látex natural automontadas até 20 bicamadas sobre substrato de ouro foram analisadas. Como padrões comparativos, foram confeccionados *castings* das soluções utilizadas, obtidos a partir da secagem de gotas das soluções usadas sobre o substrato de ouro. Todas as amostras foram secas a 37°C por 3h antes da análise, para evitar interferência do grupo OH da água. As determinações foram realizadas no Grupo de Polímeros da IFSC-USP em equipamento ATR-FTIR, marca Thermo-Nicolet, modelo Nexus 470 em espectro de 500 a 4000 cm^{-1} número de ondas, em atmosfera inerte (N_2). Os resultados dessas análises são apresentados no **item 7.4**.

5.6 Microscopia de Força Atômica - AFM

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que permite obter imagens da topografia, informações como rugosidade e parâmetros como fricção de amostras, com a vantagem de não necessitar de recobrimento com filme metálico, o que facilita a preparação das amostras [Canevarolo Jr, 2003]. A imagem é gerada por sucessivas varreduras das amostras com uma ponta com dimensões nanométricas chamada cantilever. Os movimentos de subida e descida do cantilever são detectados por um laser que incide sobre ele, revelando assim o relevo das amostras.

Foram confeccionados para o sistema de proteínas do látex filmes LbL de PEI/Proteína do látex e PAH/Proteína do látex nos pHs 3,0; 7,4 e 9,0. Para o sistema de látex foram confeccionados os filmes PEI/HA+látex; PEI/látex; PEI/HA; PAH/HA; PAH/HA+látex e PAH/látex. Para o sistema de heparina foi confeccionado o filme PEI/heparina sódica, e além dos filmes um substrato de mica também foi analisado. Todos os filmes foram automontados em duplicata sobre substratos de mica até o total de 5 e 15 bicamadas (bc). As determinações foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos - USP em equipamento de AFM marca Digital Instruments, modelo Nanoscope III utilizando-se cantilever de silício com constante de mola de 70 N.m^{-1} . Exceto os filmes de proteínas do látex em pH 3,0 e 9,0 que foram analisados no Laboratório Multiusuários da UFABC, em aparelho marca Agilent Technologies modelo 5.500, com cantilever de silício com constante de mola de 48 N.m^{-1} . Os dados de Rms (*root mean square*) para rugosidade da superfície foram obtidos com programa computacional (*Nanoscope III*) da Digital Instruments e as imagens pelo programa computacional Gwyddion (v. 2.16). Os resultados dessas análises são apresentados no **item 7.5**.

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Análises em MEV permitem a observação topográfica de áreas maiores do que as observáveis por AFM. A varredura é feita por um feixe de elétrons gerado normalmente por um catodo com filamento de tungstênio. O feixe colimado de elétrons varre as amostras, e os elétrons ao interagirem com as amostras são espalhados. O aparelho detecta o espalhamento elástico ou inelástico dos elétrons em cada ponto das amostras, gerando a imagem. A resolução do MEV pode ampliar a imagem de 10 a 300.000 vezes. As amostras necessitam, impreterivelmente, ser condutoras para obtenção de imagens por MEV [Cao, 2004], e as amostras não-condutoras devem ser revestidas de material condutor antes da análise [Yao e Wang, 2005].

Foram analisadas as mesmas amostras previamente confeccionadas para AFM (item **5.5**), automontadas sobre substratos de vidro. As amostras coladas sobre porta-amostras foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador Sputter Coater marca Balzers, modelo SCD 059 sendo analisadas em seguida. As imagens de MEV foram adquiridas no IFSC-USP em equipamento Digital Scanning Microscope marca Zeiss, modelo DSM 960, operando com feixe de elétrons de 20 KV em 10^{-5} mmHg. Devido a problemas técnicos ocorrido com o aparelho do IFSC-USP as amostras de PAH/HA (5bc), PEI/heparina (5 e 15 bc) e branco (substrato limpo) foram analisadas no IQSC-USP em equipamento descrito no **item 6.4**. Os resultados dessas análises são apresentados no **item 7.6**.

5.8 Medição de ângulo de contato

O ângulo formado na região de contato entre uma gota de líquido e uma superfície sólida sofre influência de energias presentes na parte mais externa da superfície (3-10 Å) [Johnston e Ratner, 1995]. Dentre essas energias encontram-se: tensão superficial; atração de solutos (no líquido) pela superfície; interfaces (sólido-líquido, líquido-ar, sólido-ar); a própria superfície e sua geometria [Israelachvili, 1991]. Esses fatores influenciam no ângulo de contato, que reflete a molhabilidade da superfície. Baixa molhabilidade indica alto ângulo de contato (**Figura 8A**), e a alta molhabilidade é caracterizada por baixos ângulos de contato (**Figura 8B**).

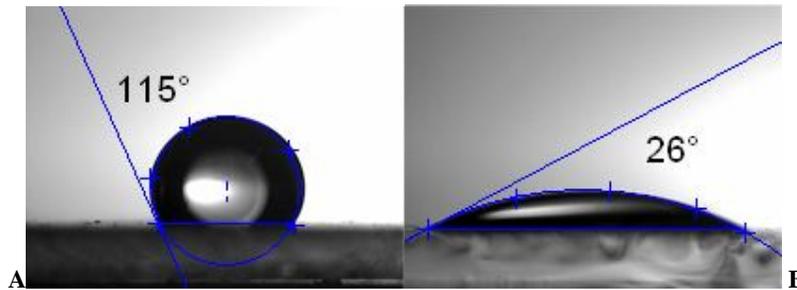


Figura 8: Determinação de ângulo de contato. A) Gota de água sobre filme de 16 bicamadas de PEI/látex, superfície hidrofóbica (115°). B) Gota de água sobre substrato de quartzo tratado com solução “piranha”, superfície hidrofílica (26°).

Se definirmos a tensão superficial entre sólido-ar e líquido-ar como sendo γ_s e γ_L , respectivamente, enquanto que a densidade de energia da interface entre líquido-sólido como γ_{SL} . Ainda assumindo que a forma da gota depositada como uma esfera truncada de raio R , a área curva seria definida por $A_{curva} = 2\pi R^2(1 - \cos \theta)$ e a área plana por $A_{plana} = \pi R^2 \sin^2 \theta$; onde θ é o ângulo de contato. Têm-se a energia total de adesão desta gota por $E = (\gamma_{LS} - \gamma_s) A_{plana} + \gamma_L A_{curva}$. A forma da gota será definida como um estado de menor energia, estado esse atingido quanto o ângulo entre a gota e a superfície for θ_0 . Desta forma atinge-se a equação de Young para explicar ângulo de contato de gotas sobre superfícies lisas $\cos \theta_0 = (\gamma_s - \gamma_{SL}) / \gamma_L$ [Boal, 2002; Israelachvili, 1991]. Boal [2002] exemplifica o contato entre uma gota e uma superfície de cera da seguinte maneira. Como o ângulo de contato é dependente da magnitude relativa entre as energias de interface, se considerar os dados $\gamma_L =$

0,073; $\gamma_s = 0,025$; $\gamma_{SL} = 0,051 \text{ J/m}^2$ e $\theta_o = 111^\circ$. A gota sobre a cera apresenta $\gamma_{SL} > \gamma_s$, ou seja, requer menos energia para a gota criar nova área entre a fase sólido-ar que na interface sólido-líquido. Para líquidos menos polares que a água γ_{SL} pode ser muito menor e conseqüentemente $\theta_o < \pi/2$. A equação de Young vale apenas para superfícies lisas; sobre superfícies rugosas o ar preso nas irregularidades da superfície influencia na molhabilidade, e deve ser incluído nos cálculos [Marmur, 2004]. Portanto para superfícies rugosas devem-se usar as equações de Wenzel ou Cassie-Baxter [Marmur, 2004; Hikita et al., 2005] que consideram também a área não molhada da superfície, devem ser usadas.

Todavia, a molhabilidade sozinha não determina se o material permitira ou não a adesão celular [Mendelson et al., 2003], mas mesmo assim este ainda é um fator a ser considerado. A forma inicial que uma célula adere na superfície se assemelha a uma gota de líquido, mesmo que as células possuam propriedades físicas mais complexas, isto serve como uma introdução [Boal, 2002]. Aparentemente, as células tendem a se aderir mais sobre substratos com ângulos de contato intermediário (60 a 80°), no entanto, fibroblastos aderem sobre superfícies independentemente deste parâmetro [Lanza et al., 2007].

Neste ensaio foram confeccionados 9 amostras de cada filme LbL, com número, crescente de camadas (1 a 9 camadas) automontados sobre substratos de vidro. Desta maneira foi possível verificar como cada camada depositada contribuiu na variação do ângulo de contato. Foram analisados os sistemas de *proteínas do látex* (filmes PEI/proteína e PAH/proteína do látex em pH 7,4); *látex natural* (filmes PEI/HA+látex; PEI/látex; PAH/HA+látex; PAH/látex; PEI/HA e PAH/HA) e *heparina sódica* (PEI/heparina). Os ensaios foram realizados no Grupo de Polímeros da IFSC-USP, fotografando gotas de 10 μL de água MilliQ com câmera CCD marca LG[®]. Os ângulos de contato foram posteriormente calculados analisando-se as imagens obtidas pelo programa computacional Surftens (versão 3.0). Os resultados dessas análises são apresentados no **item 7.7**.

6 MÉTODOS BIOLÓGICOS DE ENSAIO

6.1 Ensaio de Eletroforese

Eletroforese é a migração de íons em um campo elétrico, e as proteínas, normalmente, possuem uma carga elétrica efetiva, positiva ou negativa, dependendo da mistura de aminoácidos carregados que elas contêm. Quando um campo elétrico é aplicado a uma solução de proteínas, ela migra com velocidades que dependem da sua carga, tamanho e forma molecular [Campbell e Farrell, 2007].

Foi realizada eletroforese da fração protéica do látex em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) colocada em um suporte de vidro, previamente polimerizado com catalisador Temed. As moléculas de proteína se ligaram as moléculas negativamente carregadas do detergente SDS, e migraram em direção ao eletrodo positivo onde uma voltagem foi aplicada. Como proteínas de mesmo tamanho tendem a migrar com velocidades similares, isso significa que elas têm a mesma quantidade de cargas negativas por se ligarem ao SDS de forma similar. Em ensaio de eletroforese, proteínas maiores com mais carga migram com velocidades menores, sendo que o inverso ocorre com proteínas menores. A proteína do látex foi fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molar. As bandas de proteínas são visualizadas após a sua coloração (Coomassie Brilliant Blue, ácido acético e álcool isopropílico) por 40 minutos, seguida da descoloração do gel (ácido acético e álcool isopropílico) por 30 minutos.

A eletroforese foi realizada em 5 colunas paralelas de proteínas, cujas alíquotas seguiram o ensaio descrito na **Tabela 4**. As alíquotas das amostras foram tratadas em uma solução contendo: água MilliQ, Tris, HCl, glicerol, SDS, 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol e seus pHs foram ajustados para 6,8. Os resultados são apresentados no **item 8.1**.

A desnaturação das proteínas foi feita em banho-maria a 90°C por 10 minutos, sendo estocadas a -20°C para minimizar a atividade proteolítica de enzimas ainda presentes.

Tabela 4: Alíquotas utilizadas no ensaio de Eletroforese

Identificação	Alíquotas
Padrão	100µg de padrão com peso molecular conhecido.
A	100µg de proteína extraída do látex desnaturada
B	100µg de proteína extraída do látex <i>in natura</i>
C	50µg de proteína extraída do látex desnaturada
D	50µg de proteína extraída do látex <i>in natura</i>

6.2 Curva de crescimento celular

O ensaio de metiltiazol tetrazolium (MTT) é uma técnica colorimétrica que permite determinar através de dados de absorvância a quantidade de células viáveis em um dado meio [ATCC, 2008]. Este ensaio permite verificar a biocompatibilidade dos filmes estudados e observar quantitativamente o impacto deste sobre a proliferação celular de fibroblastos humanos normais (FHN).

Foram automatizados filmes do *sistema de látex natural* (PAH/HA, PEI/HA, PAH/látex, PEI/látex, PAH/HA+látex e PEI/HA+látex), *sistema de proteínas do látex* (PEI/proteína e PAH/proteína do látex) com proteínas no estado *in natura* e desnaturada e *sistema de heparina* (PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF). Os filmes LbL foram confeccionados até 5 bicamadas, depositados diretamente sobre os poços de TCPS. Padrões de HA, látex, proteínas, PAH, PEI, heparina e heparina+bFGF na forma de *castings*, também foram analisados. Os *castings* foram confeccionados permitindo que gotas das soluções secassem sobre as placas de TCPS, com exceção das soluções de heparina e heparina+bFGF, que foram feitas com imersão de 30 minutos. O controle positivo do ensaio foi feito com FHN cultivados apenas sobre TCPS. Todas as amostras, controle e padrões foram confeccionados com $n = 9$, onde 6 réplicas foram semeadas com FHN (*amostras positivas*) e 3 réplicas receberam apenas meio de cultura (*amostras negativas*). Esta distinção entre amostras positivas e negativas é importante para descontar possíveis interferências que os materiais usados nos filmes possam provocar na absorvância do teste de MTT. As absorvâncias reais das amostras ensaiadas foram obtidas subtraindo os valores das amostras positivas dos valores obtidos nas amostras negativas.

Uma quantidade de FHN de 10^3 células foi semeada diretamente sobre as superfícies em teste, onde a quantidade de células foi previamente determinada manualmente em câmara de Neubauer. A contagem ocorreu após a suspensão das FHN com 0,25% de tripsina em tampão fosfato (PBS); centrifugação a 1500 rpm por 5 min em temperatura de 37 °C e redução do volume total para 1 mL. Deste volume, uma alíquota de 120 µL foi adicionada a 380 µL de tripan azul. Desta solução resultante, alguns microlitros foram transferidos para câmara de Neubauer, e os FHN viáveis (não corados em azul) foram contados nos quatro quadrantes maiores. Esse procedimento de contagem foi utilizado tanto para determinar a quantidade de células a serem semeadas sobre as amostras quanto para construir a curva de

calibração. As células semeadas foram cultivadas com meio de 10% soro fetal bovino, 90% DMEM a 37°C, e em 5% de CO₂.

O conjunto de amostras (positivas e negativas) e dos padrões (castings das soluções) tal como descrito anteriormente foram cultivados por tempos de 7, 14 e 21 dias para determinar a curva de crescimento celular. Ao final do tempo de cultivo a quantidade de FHN foi determinada por MTT, portanto, foi confeccionado um conjunto de teste (amostras + padrões) para cada dia de ensaio. O ensaio de MTT consistiu em adicionar 100 µL de metiltiazol tetrazolium (5 mg.mL⁻¹) ao meio das células, mantendo-as por mais 4 horas em estufa até a formação de cristais de formazana nas mitocôndrias das células saudáveis. Em seguida adicionou-se 1 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) em HCl 0,01M, mantendo novamente em cultura por mais 24 horas. O SDS solubiliza as membranas e libera os cristais de formazana, corando o meio de cultura. O meio é então transferido em três alíquotas de 200 µL para três poços diferentes de uma placa de cultura com 96 poços. A quantificação dos cristais de formazana foi realizada com leitor de ELISA em 570 nm, marca Bio Tek Instruments Inc., modelo EL800-Universal Microplate Reader.

A relação entre o número de células e a absorbância detectada foi realizada pela equação da reta obtida na curva de calibração. A curva de calibração foi confeccionada no último dia de cultura com diluições seriadas do concentrado de células suspensas. Os FHN usados na curva de calibração foram mantidos nas mesmas condições iniciais de cultura, em placa separada das usadas no ensaio. As diluições de FHN com concentração conhecida de células foram transferidas em triplicata para uma placa de 24 poços, totalizando 6 padrões. Após a semeadura, as células da curva de calibração receberam os reagentes de MTT, tendo suas absorbâncias determinadas conforme descrito previamente. Os resultados dessas análises são apresentados no **item 8.2** sendo interpretados como índice de bioatividade dos filmes LbL. As determinações foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Farmácia da USP-SP, sob supervisão da Prof^a. Primavera Bonelli. Os fibroblastos utilizados foram doados pelo Dr. Fabio Forti do Instituto de Química da USP-SP.

6.3 Influência das proteínas do látex no crescimento celular

Dois ensaios diferentes, *direto* e *indireto*; foram conduzidos para verificar o efeito apenas da proteínas do látex sobre a adesão e proliferação dos FHN. Foram testadas soluções com diferentes concentrações de proteínas do látex *in natura* (0,1; 0,5 e 1,0 g.L⁻¹) em pH 7,4; as soluções foram esterilizadas por filtro com poros de 0,22 µm. Os ensaios foram conduzidos nos diversos laboratórios da UFABC e a determinação da quantidade de células foi realizada no Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) em equipamento UV-vis da marca Varian, modelo Cary 50 com leituras em 570nm.

6.3.1 Ensaio Direto

Este ensaio teve o intuito de verificar qual o impacto das proteínas do látex sobre o desenvolvimento dos FHN. Para ensaio direto foram utilizadas seis substratos redondos de vidro, imersos por 4 horas em cada solução de proteínas (concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 g.L⁻¹). Após a imersão, os substratos foram acondicionados em poços da placa de cultura. Como controle positivo foi usado substratos de vidro limpos.

Três substratos de cada amostra foram semeados com 10³ células de FHN (amostras positivas) e as demais receberam apenas meio de cultura (amostras negativas). As células foram cultivadas por 5 dias, seguido de quantificação das células por MTT; o procedimento de cultivo seguiu conforme descrito anteriormente no **item 6.2**.

6.3.2 Ensaio Indireto

O ensaio indireto iniciou com o cultivo de 10³ células de FHN (conforme descrito no **item 6.2**) semeadas em meia placa de cultura de 24 poços. Esta cultura foi mantida por 3 dias para aclimação dos FHN, permitindo o desenvolvimento adequado destes sobre a placa. No quarto dia o meio de cultura foi trocado por outro mais pobre (0,3% soro fetal bovino, 99,7% DMEM), mas foram mantidas as mesmas condições de cultivo (37°C, em 5% de CO₂) por mais 5 dias. No sexto dia de ensaio 6 alíquotas de 100 µL de proteínas do látex *in natura* nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ (em pH 7,4) foram transferidas para a placa de cultura. Foi tomado o devido cuidado para que as alíquotas de proteínas do látex fossem transferidas para 3 poços com células (amostras positivas) e 3 poços sem células (amostras negativas). Os seis poços da placa de cultura que não receberam a solução de proteínas foram tratados como controle. As células em cada poço foram quantitativamente determinadas por MTT conforme

descrito no **item 6.2** após 3 dias de cultivo com proteínas do látex no meio de cultura. Nova curva de calibração foi confeccionada (conforme descrito no **item 6.3.1**) e a equação da reta foi utilizada para determinar a quantidade de FHN presente nos ensaios direto e indireto. Neste estudo não foi possível obter fotomicroscopias ópticas das células em cultivo por não dispormos de microscópio invertido com câmera acoplada. Os resultados são apresentados no **item 8.3**.

6.4 Morfologia celular por MEV

6.4.1 Embasamento teórico

Este teste foi realizado para estudar a interação dos filmes LbL confeccionados com as células de fibroblastos humanos normais, pela observação da adesão e espalhamento de fibroblastos. A adesão celular cria vários sinalizadores químicos intracelulares que induzem a proliferação celular e promovem a sobrevivência da célula [Alberts et al., 2008]. Este ensaio é relevante para avaliar biomateriais, entretanto, vários fatores influenciam no processo de adesão e espalhamento celular, e para melhor avaliar as imagens de MEV faremos uma breve introdução destes fatores.

Se considerarmos as células como gotas líquidas, o formato delas em contato com uma superfície sólida poderia ser descrito, de maneira simplista, pelo seu ângulo de contato conforme descrito no **item 5.7**. Entretanto, as células possuem de um ponto de vista físico, interações e propriedades elásticas difíceis de descrever, e que também influenciam na adesão [Boal, 2002; Poon e Andelman, 2006]. Por uma ótica biológica, há ainda interações específicas entre os constituintes: membrana celular; matriz extracelular (MEC); e/ou substrato em estudo [Boal, 2002; Lanza et al., 2007].

A membrana plasmática é uma bicamada lipídica fluídica cuja composição varia entre o lado interno e externo. Há proteínas inseridas na membrana que mesmo em menor quantidade (50:1 lipídio - proteína), representam 50% da massa total. Polissacarídeos e íons salinos dissolvidos no glicocálix também estão presentes [Boal, 2002]. Os grupos fosfatos presentes na membrana são negativos, porém, as cargas totais dos fosfolipídios são, em geral, neutras com exceção das serinas que mantêm a carga negativa [Boal, 2002]. Apesar disso, mesmo membranas negativas (com alta concentração fosfatidilserina, tem carga $0,3 \text{ C/m}^2$) podem apresentar carga global neutra devido à anti-íons positivos no meio de cultura que balanceia as cargas [Boal, 2002]. A adesão dessas células originalmente negativas pode variar de acordo com a carga da superfície do substrato. O fato das membranas negativamente carregadas em meio iônico atraírem íons positivos, mantendo os íons negativos mais distantes, gera uma pressão eletrostática que também interfere na adesão. Isso se torna uma interação repulsiva que dificulta o contato entre superfícies caso ambas tenham carga de mesmo sinal [Boal, 2002]. A pressão eletrostática repulsiva entre membrana e superfícies é atenuada pela alta concentração de eletrólitos do meio. Isso ocorre pela redução da distância de Debye (região onde os íons do meio são influenciados pela superfície) onde as forças

eletrostáticas são rapidamente extintas. Nestas condições a atração célula-substrato é dominada por interações de van der Waals e as forças eletrostáticas mantêm-se importantes apenas em distâncias intermediárias [Boal, 2002]. As forças de van der Waals estão presentes mesmo nos fosfolipídios eletricamente neutros, pois existem forças intramoleculares que geram dipolos (induzidos ou permanentes), que criam pressão atrativa com influência variável com a distância [Boal, 2002].

Em longas distâncias da membrana (± 5 nm), há presença de interações de van der Waals e eletrostáticas [Boal, 2002]. Todavia, em curtas distâncias, aparecem conflitos estéricos entre a matriz extracelular (MEC) e as forças provenientes da membrana [Boal, 2002]. Esses conflitos ou forças estéricas são geradas pela repulsão entrópica entre as moléculas da membrana e a matriz, que excedem tanto as forças de van der Waals quanto à repulsão eletrostática [Boal, 2002]. A natureza fluídica da membrana plasmática contribui para essas forças repulsivas devido às oscilações térmicas. Como a membrana oscila, não há camada molecular estacionária ao seu redor, o que dificulta a organização do solvente ao redor da célula. Isso gera forças de solvatação (ou hidratação), geralmente repulsivas, devido à resistência entrópica da membrana a compressão [Boal, 2002].

Todavia, sendo a membrana plasmática não apenas de natureza fluídica, existem áreas que resistem à expansão da sua forma sobre a superfície. Dentre as propriedades mecânicas das células o módulo de compressão (K_A) e a rigidez (κ_b) ou módulo de curvatura, formam resistência a deformação e interferem na angulação da membrana [Poon e Andelman, 2006; Zimmerberg e Kozlov, 2006].

Somado aos fatores descritos anteriormente, a presença de proteínas ligadas não-covalentemente em receptores específicos e outras estruturas adesivas agem como junções do citoesqueleto [Boal, 2002] dentro da célula. Dentre as proteínas de ligação mais comuns, as integrinas participam da adesão célula-substrato [Alberts et al, 2008]. Essas proteínas não são arrancadas da célula por estresse, pois a força dessas ligações, mesmo menor que as covalentes, varia enormemente dependendo da velocidade de aplicação da força (valores típicos entre 50 e 150 pN) [Boal, 2002]. Além dessas proteínas da membrana, há também as proteínas presentes no meio de cultivo. Essas proteínas se adsorvem no substrato e participam ativamente da adesão, propagação, maturação e diferenciação celular [Lanza et al., 2007]. Sobre superfícies poliméricas as proteínas formam uma camada em alguns minutos, influenciando na forma da célula aderida. A “adesividade” da superfície é determinada pela altura média da célula na superfície, o grau de propagação e a forma geral que está diretamente ligada ao grau de proliferação celular [Lanza et al., 2007].

6.4.2 *Procedimento experimental*

Novas amostras foram feitas dos sistemas de proteínas do látex (filmes PEI/proteína e PAH/proteína do látex), látex natural (filmes PEI/HA+látex; PEI/látex; PAH/HA+látex; PAH/látex; PEI/HA e PAH/HA) e heparina (PEI/heparina) com 5 bc sobre substratos de vidro. Outro substrato limpo de vidro foi usado como branco. Os filmes foram acondicionados em placa de TCPS, posteriormente semeada com 10^3 FHN e mantidos em condição fisiológica (DMEM a 37°C, 5% CO₂). Após 3 dias de cultura, as células foram fixadas sobre o substrato seguindo o procedimento descrito por Lobo [2008], metalizadas e analisadas por MEV.

Para a fixação foram feitas as soluções: fixador 1 (tampão Tris-HCl em pH 7,2; paraformaldeído 4% e glutaraldeído 3% nas proporções de 55, 40 e 5% respectivamente, v/v); fixador 2 (álcool etílico absoluto e hexametildisilazane 98% - HDMS [Cas:999-97-3], nas proporções 1:1, v/v; cuidado! – utilizar exaustor e luvas); e para a desidratação das células foi feita uma seqüência de soluções de álcool etílico com diferentes concentrações (30, 50, 70, 90 e 100%). Após a cultura, o meio foi retirado com cuidado para não as descolar células dos substratos e 1 mL do fixador 1 foi adicionada sobre cada amostra mantendo em temperatura ambiente por 2 horas. Depois deste período as células foram desidratadas adicionando 1 mL de álcool etílico 30%, mantendo as células em solução por 10 minutos. A desidratação prosseguiu adicionando soluções alcoólicas mais concentradas, pelo mesmo período, até atingir a solução 100%. Depois de desidratadas as células receberam o fixador 2 em quantidade suficiente para cobrir as amostras, mantendo-as imersas também por 10 minutos. O último passo da desidratação consistiu em adicionar 500 µL de HDMS concentrado sobre cada amostra, mantendo em temperatura ambiente até a completa evaporação.

As amostras com células fixadas foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador Coating System marca BAL-TEC, modelo MED 020 sendo imediatamente analisadas. As fotomicrografias de MEV foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química da IQSC-USP em equipamento de marca LEO, modelo 440 com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20 KV. As imagens dos FHN sobre as amostras foram dispostas no **item 8.4**.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS ENSAIOS FÍSICOS

7.1 Cinética de deposição

7.1.1 Sistema de proteínas do látex

As absorvâncias obtidas em 200 nm na proteína do látex em cada imersão do teste A (imersão de mesmo substrato por 30 segundos) são ilustradas na **Figura 9**. A figura ilustra as absorvâncias em função do tempo de imersão nas soluções em pH 3,0; 7,4 e 9,0. O comprimento de 200 nm representa região do espectro com maior absorvância não apenas nesse, mas em todos os sistemas estudados (idêntico à **Figura 15**). Observou-se em pH 3,0 uma maior absorvância em função do tempo, com aumento linear da absorvância de 0,207 para 0,311. A cinética da proteína do látex em pH 7,4 apresentou dois comportamentos, inicialmente permaneceu com absorvância inalterada ($0,183 \pm 0,006$) durante os primeiros 4,0 minutos, e posteriormente as absorvâncias elevaram para 0,279 aos 7,0 minutos. Em pH 9,0, nas mesmas condições, observa-se após uma queda inicial, absorvância permaneceu constante ($0,171 \pm 0,006$) durante todo o período do teste. Por este gráfico observa-se diferenças em como o tempo afeta a deposição das proteínas nos diferentes pHs.

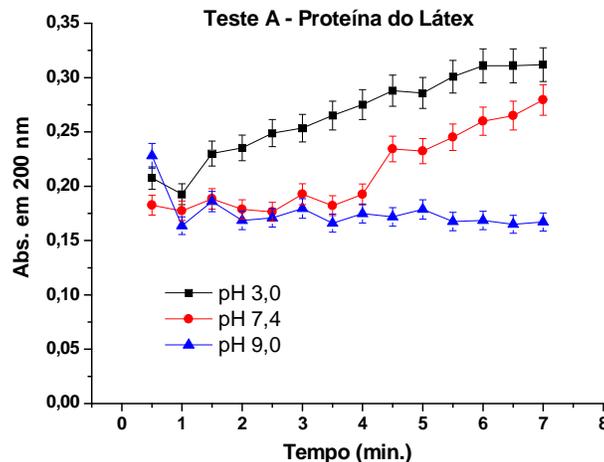


Figura 9: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões do mesmo substrato em intervalo de 0,5 min.

Para o teste B (imersão de mesmo substrato por períodos variáveis de tempo), a **Figura 10** dispõe os valores de absorvância da proteína do látex em função do tempo de imersão. A cinética observada em pH 3,0 apresentou elevação na absorvância de 0,104 para 0,225, ao final um aumento similar ao observado no teste A. Entretanto, a deposição da proteína em pH 3,0 apresentou comportamento diferente; o mesmo crescimento linear foi observado quando as deposições eram realizadas com tempos de 0,5 e 1,0 minuto, mas em tempos mais longos (2,0 e 4,0 minutos) a deposição tende a formar um platô. Em pH 7,4 foram observadas as maiores absorvâncias do teste B, que seguem o mesmo comportamento visto em pH 3,0, com aumento pronunciado da absorvância em tempos curtos, e formando platô com tempos maiores. Em geral, houve aumento na absorvância de 0,176 para 0,310, respectivamente, para tempo inicial e final. Em pH 9,0 as proteínas mantiveram o mesmo comportamento observado no teste A, com absorvância constante ($0,210 \pm 0,014$), embora com elevação discreta na absorvância em função do tempo.

A tendência à formação de platô, observada quando tempos maiores de imersão foram empregados, sugere que a deposição de material tende a uma estabilização, comprovando a existência de um regime de equilíbrio.

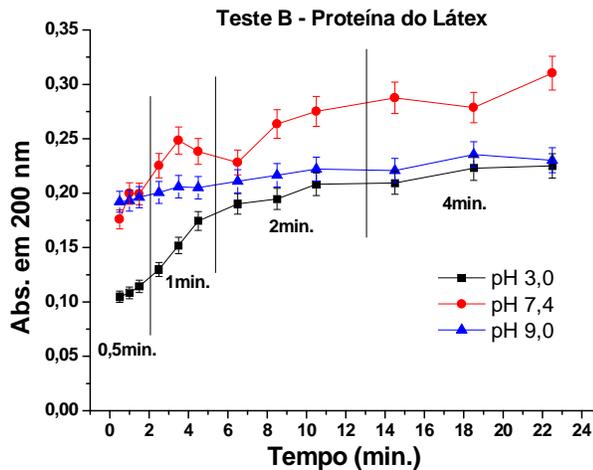


Figura 10: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões do mesmo substrato em tempos variáveis.

Os resultados do teste C (imersão de diferentes substratos) para a proteína do látex nos pHs 3,0; 7,4 e 9,0 foram testados nos tempos de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 minutos, e estão dispostos na **Figura 10**. Nos pHs 3,0 e 7,4 um mesmo comportamento foi observado: queda inicial na

absorbância, seguida de um máximo obtido aos 2,0 minutos, com ocorrência de nova queda aos 4,0 minutos de imersão. Entretanto, em pH 3,0 a quantidade de material adsorvido no substrato com imersão de 4,0 minutos foi à menor registrada no teste. O ensaio em pH 9,0 demonstrou aumento na quantidade de material, e assim como nos outros pHs, um pico de deposição foi observado aos 2,0 minutos, seguido de queda aos 4,0 minutos. Como neste teste cada substrato foi depositado uma única vez, não há influência de sucessivas secagens, e a formação de uma monocamada de material é determinada apenas pelo balanço entre a quantidade de material adsorvido e dessorvido no substrato. Sabe-se que tempos mais longos de imersão favorecem o equilíbrio entre a absorção e a dessorção de material [Venâncio et al, 2005], e o pico observado aos 2,0 minutos, seguido de queda, sugere que naquele intervalo de tempo a adsorção ainda era maior que a dessorção. Detectar o tempo em que a deposição do material atinja o equilíbrio não é objetivo deste trabalho, mas sim identificar o período em que a deposição seja máxima. Portanto, no teste C, observa-se que independentemente do pH estudado, o tempo de imersão para construir filmes LbL com proteína do látex não deve ultrapassar 2-3 minutos.

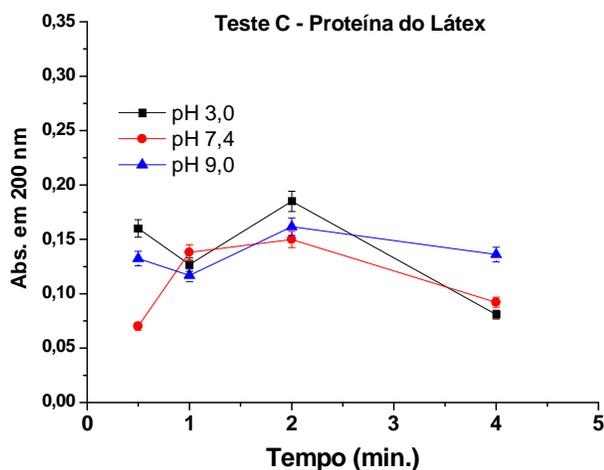


Figura 11: Estudo da cinética de deposição da proteína do látex, em diferentes pHs, com imersões em intervalos variáveis usando vários substratos.

Correlacionando os dados obtidos com a informação de ponto isoelétrico da proteína, é possível formular algumas hipóteses. Como o substrato de quartzo foi limpo quimicamente para possuir cargas negativas em sua superfície, era esperada uma maior atração e deposição de moléculas com cargas positivas. Apenas em pH 3,0 - a única com pH abaixo do ponto

isoeletrico (pI 4,7) - as proteínas do látex são predominantemente positivas. Portanto, era esperada uma deposição maior neste pH, mas esta teoria parece prevalecer apenas em situação de não-equilíbrio, com tempos curtos de deposição (teste A). É provável que em outras situações, como na condição de equilíbrio (como evidenciado no teste C aos 240 segundos), ocorra repulsão entre as moléculas e isso reduza a quantidade de material depositado. Em pHs acima do pI, as proteínas do látex são predominantemente negativas, como o estudado em pH 7,4 e 9,0, e portanto, sua atração por substratos negativos seria baixa. Os resultados em pH 9,0 seguiram conforme o esperado, ou seja, absorvência inferior ao observado em pH 3,0. Entretanto, a cinética de deposição das proteínas do látex em pH 7,4, que deveria ocorrer de maneira idêntica ao pH 9,0, pois ambos encontram-se acima do pI, não aconteceu. As proteínas em pH 7,4 apresentaram uma deposição maior no teste B e um aumento na deposição após certo período no teste A. É possível que este comportamento em pH 7,4; intermediário aos pH 3,0 e 9,0 (principalmente observado no teste A), se deva ao fato de estar mais próximo ao pI que as moléculas em pH 9,0. Isso lhe conferiria uma densidade de cargas e repulsão molecular menor e maior deposição, apesar de ainda serem predominantemente negativas.

A deposição das proteínas do látex em todos os pHs foi realizada sobre substratos de quartzo limpo para evitar que outras interações com polieletrólitos influenciassem nos resultados. A deposição sobre substratos positivos não foi realizada, pois essas informações foram obtidas diretamente pela deposição das proteínas sobre monocamadas dos polications nos filmes LbL confeccionados no **item 7.2**.

7.1.2 Sistema de látex natural

Para facilitar a exposição dos resultados deste sistema, agrupamos os dados em dois conjuntos: (i) soluções dos polications (PEI e PAH) e (ii) soluções dos poliânions (HA, látex e HA+látex), que serão discutidos separadamente a seguir.

(i) Soluções dos polications

Os resultados de absorvência obtidos nos testes de cinética B (imersão de mesmo substrato) e C (imersão de diferentes substratos) para as soluções de PEI e PAH são demonstradas na **Figura 12**. Em ambos os ensaios o PEI apresentou maior absorvência que o PAH, fato atribuído às diferentes concentrações entre as soluções de PEI ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e PAH ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). Apesar disso, os resultados do PEI são da mesma ordem de grandeza do observado para o PAH. No teste B observa-se que ambos os polieletrólitos depositam-se em maior quantidade em tempos menores de imersão e que as quantidades se estabilizam em tempos

maiores. PEI apresentou em 40 minutos deposições maiores que nos tempos iniciais, mostrando uma tendência a elevar a quantidade de material adsorvido com o tempo. Apesar das diferenças nos resultados terem gerado um alto desvio padrão, todas as amostras do grupo mostravam o mesmo comportamento. O PAH por sua vez, manteve uma absorbância constante durante o ensaio. A mesma deposição constante do PAH foi observada no teste C, no qual a absorbância manteve-se com elevação discreta ($0,114 \pm 0,007$). A quantidade de PEI elevou de 0,119 para 0,172 em 10 minutos, concordando com os resultados vistos no teste B. Os resultados do teste C indicam que o PAH possui menor dependência do tempo de imersão com a quantidade de material depositado que o PEI, pois este último apresentou maior elevação na absorbância.

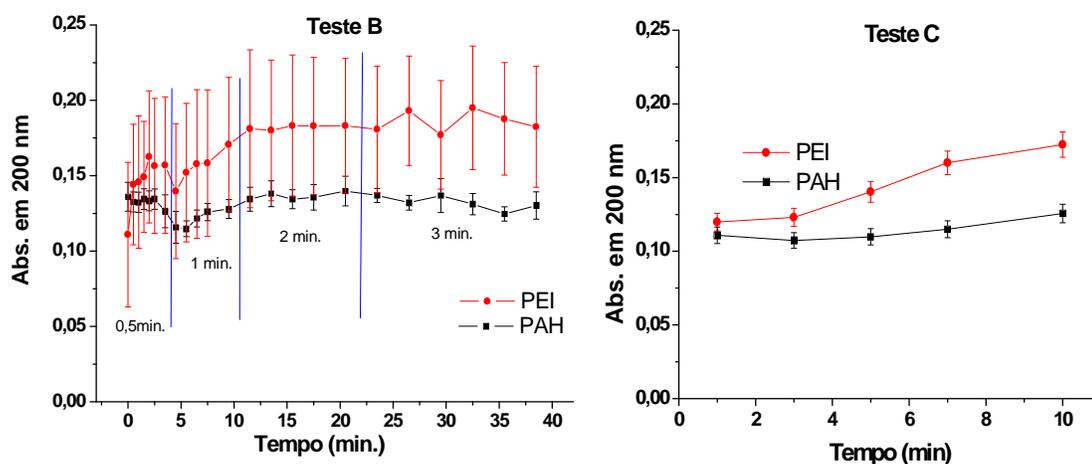


Figura 12: Resultados dos testes de cinética das soluções de PEI e PAH.

(ii) Soluções dos poliânions

A Figura 13 apresenta os resultados de absorbância em função do tempo de imersão obtidos para as soluções de HA, HA+látex e látex natural em todos os ensaios de cinética realizados. No teste B (imersão por período de tempos variáveis) observa-se aumento na absorbância (de 0,051 para 0,176) da mistura de **HA+látex** de maneira quase linear nos primeiros 5 minutos, formando platô dos 5 aos 20 minutos. A solução de **látex natural** apresentou dois picos de absorbância (0,0823), um no primeiro minuto de imersão e outro aos 5 minutos de teste. Esses picos de absorbância foram seguidos de queda na quantidade de material detectado. Após este período de oscilação a deposição apresentou formação de platô

dos 6 aos 15 minutos de teste quando tempos mais longos de imersão foram ensaiados. Observou-se elevação na absorbância **HA** no teste B, que apesar de inconstante, pois apresentou queda aos 15 minutos, no total aumentou de 0,024 para 0,167. O máximo de deposição de HA foi detectado aos 10 e 20 minutos de teste, e é possível que o equilíbrio tenha sido atingido com esses tempos, pois a tentativa de depositar mais material (aos 10 minutos) provocou a diminuição na quantidade de moléculas depositadas. No teste C a solução de **HA+látex** apresentou queda inicial na absorbância seguida de pico (0,239) detectado aos 4 minutos de imersão. Na solução de **látex natural** observa-se pico de absorção aos 1,5 e 5 minutos do teste C. Comparando esses dados com o teste B observa-se que apenas o pico inicial no primeiro minuto é equivalente em ambos os ensaios. Provavelmente, o aumento na deposição aos 5 minutos observado no teste C tenha sido favorecido pelos processos de secagens que permitiu maior agregação de material no teste B. O **HA** apresentou no teste C absorbâncias mais constantes ($0,143 \pm 0,009$) que no teste B, com pico novamente observado aos 10 minutos de ensaio. Aparentemente, sem a influência dos vários processos de secagem, a quantidade de material depositado torna-se quase independente do tempo de imersão para o HA.

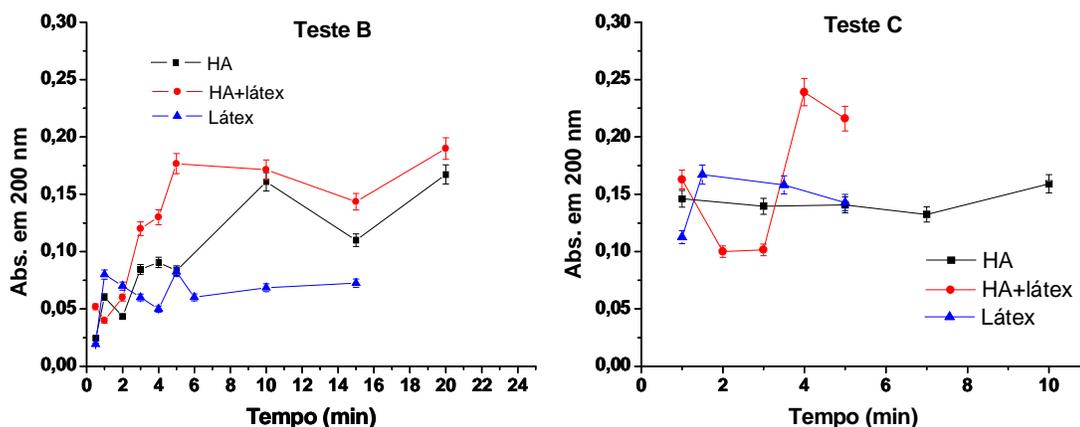


Figura 13: Resultados dos testes de cinética para a solução de HA, HA+látex e látex natural.

7.1.3 Sistema de heparina

A **Figura 14** apresenta a absorbância em função do tempo de imersão obtido nos ensaios de cinética (A, B e C) realizados. A heparina apresentou no teste B (imersão de mesmo substrato por períodos variáveis de tempo) material depositado em quantidade

constante e inalterada com o tempo de ensaio. O mesmo comportamento de deposição, com valores de absorbância idênticos foi observado no teste C (imersão de vários substratos). O teste A (imersão de mesmo substrato por 30 segundos) foi o único que apresentou maior quantidade de material depositado. Aparentemente, as imersões em tempos curtos favorecerem a agregação das moléculas de heparina sobre si mesmas, resultando em mais material depositado. Porém, conforme foi observado nos testes B e C, a absorbância observada no teste A após atingir seu ápice (em 2 minutos), estabilizou-se e apresentou uma deposição invariável com o tempo.

Pelos ensaios de cinética conclui-se que a deposição da heparina praticamente independe da situação de equilíbrio entre a adsorção e a dessorção, ou o que é mais provável, o tempo para que a heparina atinja equilíbrio na deposição seja curto. Possivelmente, a deposição da heparina atinja equilíbrio em períodos inferiores ou próximos a 30 segundos, e por esta razão os resultados dos testes B e C foram idênticos, pois ambos utilizavam períodos maiores. Para a confecção de filmes LbL de PEI/heparina; e conseqüentemente, para o sistema de PEI/heparina+bFGF; o tempo de imersão do substrato na solução de heparina parece não ser relevante. Contudo, os resultados sugerem que maior quantidade de material pode ser agregada caso sucessivas imersões (no mínimo 3) com tempos curtos (30 segundos ou menos) sejam feitas.

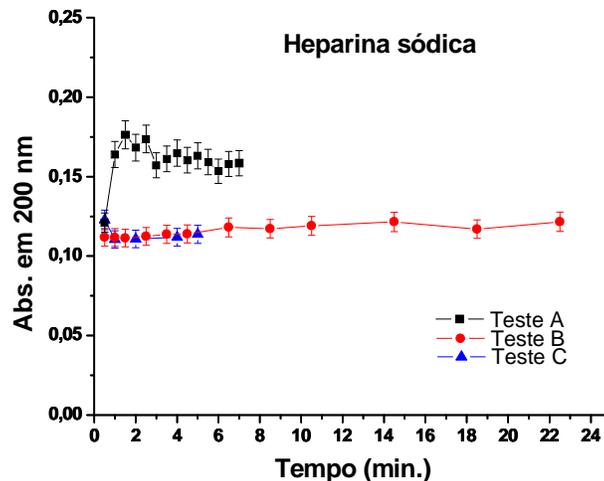


Figura 14: Resultados dos testes de cinética para a solução de heparina sódica A quantidade de material praticamente não se altera com o tempo de deposição.

7.2 Estudo do crescimento dos filmes LbL

7.2.1 Sistema de proteínas do látex

- Filmes de proteína do látex. Os filmes de PEI/proteína do látex e PAH/proteína do látex foram automontados até 14 bicamadas. A máxima absorvância detectada nas amostras em 200 nm (exemplo mostrado na **Figura 15**) é demonstrada em função do número de bicamadas na **Figura 16**. Os filmes PEI/proteínas apresentam maior quantidade de material agregado que os filmes de PAH/proteínas. Observa-se que os filmes de PEI/proteína do látex possuem crescimento linear com $R^2 = 0,913$; $0,998$ e $0,990$, respectivamente para os pHs 3,0; 7,4 e 9,0. R^2 é o quadrado do coeficiente de correlação entre os dados e os valores previsíveis a partir deles em uma regressão linear, que variam entre 0 e 1. A melhor linearidade e maior absorvância foram detectadas no filme com proteína do látex em pH 7,4. A segunda maior deposição foi observada no filme PEI/proteína em pH 9,0, e em pH 3,0 o filme apresentou absorvâncias inferiores aos outros sistemas, com valores comparáveis às absorvâncias dos filmes com PAH.

Para o sistema com PAH, o filme PAH/proteína em pH 7,4 apresentou a melhor linearidade de crescimento ($R^2 = 0,995$), seguido do filme com proteína em pH 3,0 ($R^2 = 0,967$). O crescimento do filme com 14 bicamadas em pH 9,0 ($R^2 = 0,870$) tendeu a formar platô após a 10^a bicamada automontada. A maior absorvância foi detectada no filme de PAH/proteína em pH 9,0; mas a melhor estruturação do filme (linearidade e maior absorvância) foi observada em pH 7,4 através da deposição linear de material.

Para a melhor comparação entre os sistemas PEI e PAH com proteína do látex, a **Figura 17** foi confeccionado com os dados de absorvância detectados na 14^a bicamada em cada filme LbL e pH estudados. Observa-se que os filmes LbL de PEI/proteína do látex nos pH 7,4 e 9,0 possuem, respectivamente, 10 e 6 vezes (aproximadamente) mais material depositado que a média dos outros filmes. No sistema PAH/proteína a maior deposição foi detectada, respectivamente, no pH 9,0 e 7,4; o inverso do observado no sistema PEI. Pode-se constatar na **Figura 17** que as menores absorvâncias nos dois sistemas (PEI e PAH) foram obtidas em pH 3,0.

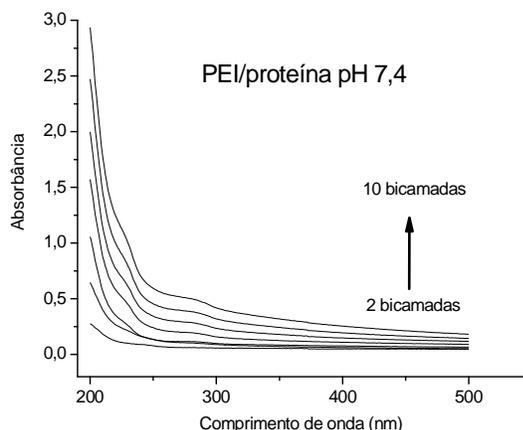


Figura 15: Espectro de UV-vis obtidos durante a automontagem do filme LbL de PEI/proteína em pH 7,4.

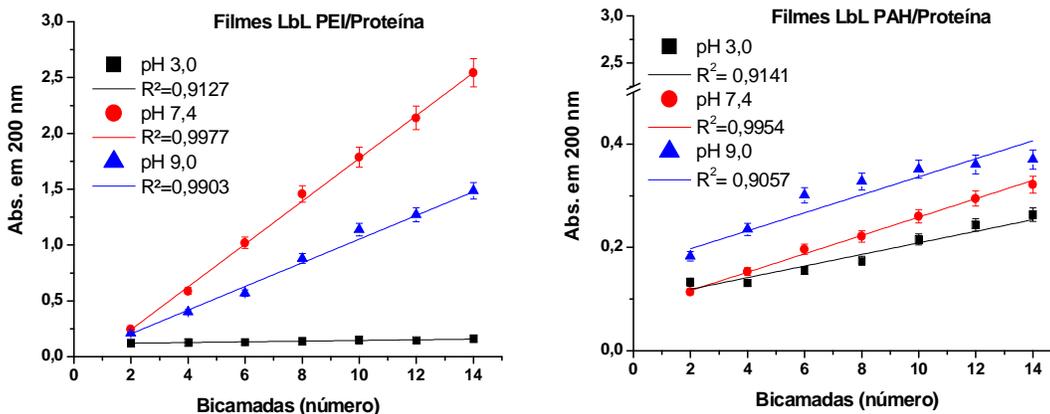


Figura 16: Filmes LbL de proteína do látex em diferentes tempos e pHs usando PEI e PAH como contraparte positiva para automontagem.

As mesmas hipóteses aplicadas nos testes de cinética, se novamente aplicadas aqui, explicam o porquê do crescimento dos filmes com proteínas em pH 7,4 e 9,0 foram maiores. Isso se deve as moléculas de proteína, com cargas predominantemente negativas, apresentarem melhor deposição sobre as monocamadas de policátions (PEI e PAH), com cargas de sinal oposto. Em teoria, as proteínas com pH muito superiores ao pI (pI 4,7) seriam mais negativamente carregadas que as moléculas em pH mais próximo de pI. Portanto, supõem-se que as proteínas em pH 9,0 estão mais eletronegativas que em pH 7,4. Considerando esta suposição, esperava-se que os filmes LbL com proteínas em pH 9,0 mostrassem deposições maiores que filmes em pH 7,4; mas apenas os filmes LbL com PAH confirmaram este resultado esperado. Filmes com PEI foram melhor automontados em pH 7,4, com aproximadamente o dobro da absorbância observada em pH 9,0. Possivelmente a

cobertura da superfície de PEI por moléculas de proteína seja reduzida por repulsão entre as proteínas do látex em pH 9,0, mais negativas do que em pH 7,4.

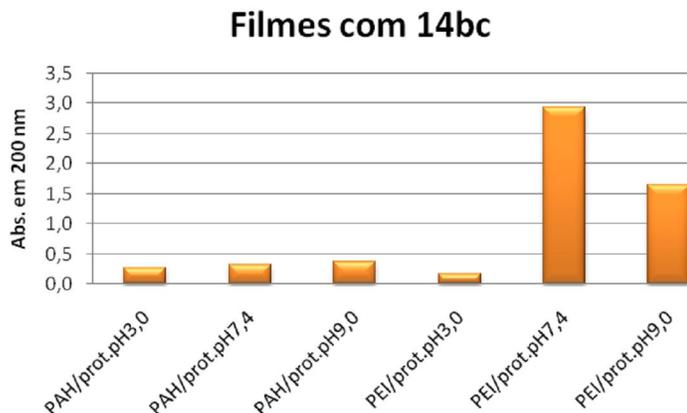


Figura 17: Absorbância da 14^a bicamada dos Filmes LbL de proteína do látex com PEI e PAH. Filmes com PEI, apresentaram absorbância maior em pH 7,4. Filmes com PAH apresentam valores ligeiramente melhores em pH 9,0.

Entretanto, observa-se que as proteínas em pH 3,0 também se depositaram em menor quantidade, formando o filme LbL sobre os policátions (PEI e PAH) apesar das cargas predominantes serem de mesmo sinal. Esta observação, a primeira vista, contradiz a teoria de formação dos filmes LbL por atração eletrostática, mas esses resultados são condizentes com o publicado por Ladam et al. [2000 e 2001]. Landam verificou que é possível obter filmes LbL de proteínas (albumina), independente da carga dominante, atribuindo este fenômeno a duas possíveis causas:

- (i) *A presença de ambos os domínios de cargas nas moléculas de proteínas.* Como as proteínas possuem domínios positivos e negativos, monocamadas poderiam se formar mesmo sobre superfícies com mesma carga, apenas mais fracamente aderidas. Isto também implica na existência de atração entre proteína/proteína, permitindo que uma nova superfície absorptiva se forme, aumentando a quantidade de material agregado.
- (ii) *A interpenetração de camadas.* Monocamadas de policátions poderiam atravessar a superfície das monocamadas de proteínas, garantindo que cargas opostas estejam presentes na superfície mais externa, formado filmes LbL por interpenetração das camadas.

- (iii) E ainda uma terceira causa poderia ser a *formação de ligações de hidrogênio*, entre os grupos amina da proteína, que podem agir como força secundária a atração eletrostática na formação do filme LbL [Stokton e Rubner, 1997].

Os dados de cinética de deposição sugerem que a primeira hipótese é plausível, pois no **item 7.1**, as proteínas do látex aderiram sobre os substratos com superfície negativa (limpos e sem polímeros aderidos), independentemente de estarem positivas ou negativamente carregadas. A segunda hipótese poderia explicar a diferença na absorvância dos filmes com PEI e PAH. Se avaliarmos a **Figura 12** com os dados de cinética de deposição do PEI e PAH, observa-se que ambos os polímeros com 3 minutos de deposição (teste C) possuem absorvâncias equivalentes, não justificando a maior deposição de material observada apenas nos filmes LbL com PEI. Porém, moléculas de PEI (MM 250.000 g/mol⁻¹) são consideravelmente maiores que as moléculas de PAH (MM 56.000 g/mol⁻¹) o que poderia resultar em maior interpenetração das camadas poliméricas. Outra explicação para esta diferença seria a densidade de cargas presente nos polímeros [Elzbieciak et al., 2009] cujos resultados sugerem ser maior no PEI que no PAH. A terceira hipótese poderia ser comprovada detectando as ligações de hidrogênio por análises de FTIR.

- Filmes de proteína do látex desnaturada. Os filmes de PEI/proteína e PAH/proteína em pH 7,4 foram selecionados como os sistemas mais favoráveis segundo os dados de crescimento anteriores, pela melhor linearidade de crescimento. Os filmes de PEI/proteína e PAH/proteína em pH 7,4 foram refeitos em triplicata até 10 bicamadas e comparados com filmes idênticos, confeccionados com as proteínas do látex desnaturadas. As proteínas do látex em pH 7,4 foram desnaturadas por aquecimento a 90°C por 10 minutos. Este ensaio foi realizado para verificar se a proteína do látex, mesmo desnaturada, ainda permite a automontagem de filmes LbL, pois para realizar os testes biológicos propostos são necessários filmes para controle negativo. A **Figura 18** ilustra as absorvâncias em função do número de bicamadas. Os resultados indicam que é possível confeccionar filmes com as proteínas do látex desnaturadas, mantendo o regime de crescimento linear, $R^2 = 0,990$ e $0,968$ para PEI e PAH, respectivamente, similar ao observado nos filmes com proteína *in natura* ($R^2 = 0,995$ e $0,959$, respectivamente, com PEI e PAH). O filme de PAH/proteína desnaturada apresentou absorvância máxima de 0,483, levemente maior que no filme de proteína *in natura* (0,366), e o mesmo ocorreu nos filmes com PEI. Nos filmes com PEI/proteína do látex, a maior absorvância foi de 1,317 no estado desnaturada, e 0,947 quando *in natura*.

A desnaturação afeta as ligações fracas em uma proteína, principalmente as ligações de hidrogênio, que provoca uma mudança estrutural na molécula protéica, e,

consequentemente, a perda da função biológica [Nelson e Cox, 2002]. Neste teste utilizamos a desnaturação térmica, embora proteínas também possam ser desnaturadas por pHs extremos, surfactantes e solventes orgânicos [Nelson e Cox, 2002]. Como a perda de função de uma proteína é atribuída impreterivelmente à mudança de sua forma (ou enovelamento), sem que haja quebra de ligações covalentes, permanecendo então com os grupos químicos da proteína inicial [Nelson e Cox, 2002]. Isto explica porque os filmes LbL com proteínas desnaturadas permanecem com crescimento idêntico. O fato dos filmes de proteína desnaturada apresentar maiores absorvâncias que com proteína *in natura* pode não ser significativo.

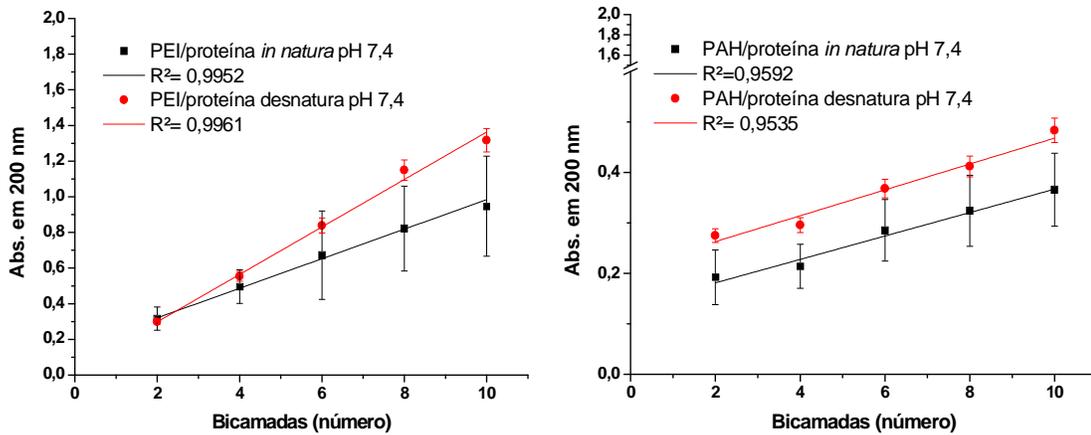


Figura 18: Comparação do crescimento de filmes de PEI e PAH com as proteínas de látex *in natura* e desnaturadas.

7.2.2 Sistema de látex natural

A **Figura 19** descreve a absorvância analisada em função do número de bicamadas dos filmes LbL do sistema de látex natural confeccionados em triplicata. Novamente, foi observado que filmes com PEI apresentaram maiores absorvâncias que filmes com PAH. A seguir segue a discussão de cada filme separadamente:

- Filmes de Látex natural. Filmes LbL de PEI/látex e PAH/látex apresentaram crescimento linear, com R^2 de 0,991 e 0,839, respectivamente. O filme com PAH, inclusive, demonstra menor deposição de material com 10 bicamadas (abs. 0,204 u.a.) que os filmes com PEI (abs. 1,391).

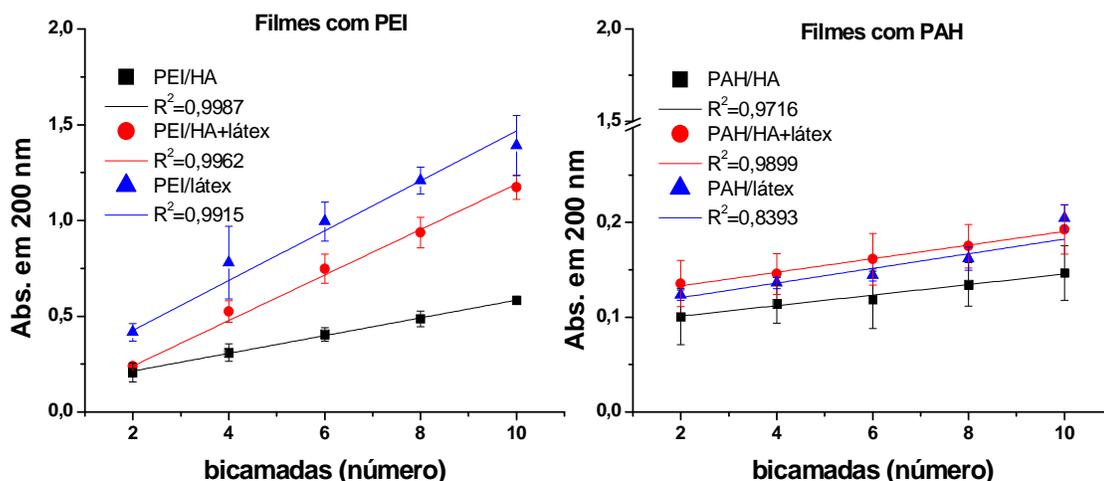


Figura 19: Acompanhamento da automontagem LbL dos filmes de PAH/HA, PEI/HA, PAH/HA+látex, PEI/HA+látex, PAH/látex e PEI/látex até 10 bicamadas.

- Filmes de ácido húmico. Os filmes LbL de PEI/HA e PAH/HA representaram menor absorvância que os outros sistemas com ambos os policátions (PEI e PAH). O crescimento destes filmes ocorreu de forma linear, com R^2 de 0,999 (absorvância máxima de 0,584) e 0,972 (absorvância máxima de 0,147), respectivamente, para os filmes de PEI/HA e PAH/HA.

- Filmes de Látex natural e HA. Filmes LbL de PEI/HA+látex e PAH/HA+látex obtiveram crescimento linear, respectivamente $R^2 = 0,996$ e $0,990$. Houve elevação na linearidade dos filmes quando comparado com resultados dos filmes formados apenas com HA ou látex. As absorvâncias detectadas nos filmes de com HA+látex (1,173, com PEI e 0,1925, com PAH) foram medianas as encontradas nos filmes confeccionados apenas com látex ou ácido húmico. Por esse resultado observa-se que o látex absorve mais no espectro do visível que o HA, e que a associação de HA+látex não resulta em maior absorvância. Esse resultado é conflitante com o observado nos testes de cinética de deposição das soluções de HA, látex e HA+látex (**Figura 13**) cuja deposição foi maior para a solução de HA+látex (teste B).

7.2.3 Sistema de heparina

Filmes de PEI/Heparina (**Figura 20**), confeccionados em triplicata, apresentaram crescimento discreto usando tempos de deposição de 3-3 minutos. Ao contrario dos filmes anteriormente estudados, o filme de PEI/heparina apresentou em 10 bicamadas um crescimento mais próximo do regime exponencial ($R^2=0,981$) que linear ($R^2=0,976$). Entretanto, como esta diferença é mínima, possivelmente o crescimento exponencial

observado não implique em graves alterações nas características estruturais dos filmes com heparina como apresentado na revisão bibliográfica. Isso será confirmado pelas outras caracterizações físicas descritas ao longo deste trabalho. Os filmes de PEI/heparina confeccionados por Mao [2005] apresentavam crescimento linear. A diferença entre o filme PEI/heparina deste trabalho e o publicado anteriormente possivelmente se deva aos tempos de deposição aplicados. Os tempos utilizados por Mao foram de 20 minutos por camada, e nós utilizamos os resultados do estudo de cinética que comprovou a deposição da heparina não varia com o tempo.

Filmes PEI/heparina+bFGF (**Figura 20**) foram confeccionados em triplicata até 10bc usando os mesmos tempos adotados para PEI/heparina. O estudo de cinética não foi realizado para a mistura heparina+bFGF devido a racionamento do reagente bFGF. Mesmo sem averiguar a cinética, foi possível a automontagem do filme que apresentou regime de crescimento claramente exponencial ($R^2=0,995$).

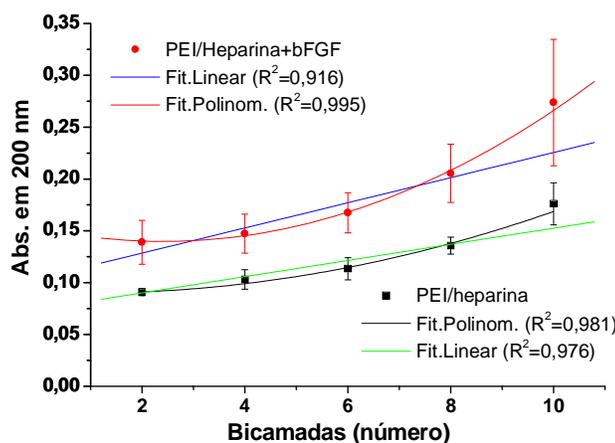


Figura 20: Acompanhamento da automontagem LbL dos filmes de PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF até 10 bicamadas.

Com o estudo do crescimento comprovou-se que os filmes propostos são “automontáveis” e apresentam crescimento linear, com exceção dos filmes do sistema de heparina cujos crescimentos poderiam ser classificados como exponencial. A seguir compararemos os filmes LbL confeccionados de duas formas: (i) em função da quantidade de material depositado; e (ii) em função da linearidade observada.

- (i) *Comparação pela quantidade de material.* A **Figura 21** ilustra as absorbâncias detectadas na 10ª bicamada em todos os filmes feitos. Observa-se que, dentro de um

mesmo sistema, todos os filmes confeccionados com PEI possuem mais material depositado que os filmes com PAH. Esta comparação direta pode ser realizada devido ao estudo de cinética (**Figura 12**) que demonstrou que os polímeros possuem absorvâncias equivalentes com tempos de imersão de 3 minutos. Comparando os filmes entre os diferentes sistemas, observa-se que as maiores quantidades de material foram agregadas nos filmes PEI/látex, PEI/HA+látex, respectivamente. As menores quantidades de absorvância foram detectadas nos filmes PAH/HA, PAH/HA+látex e PEI/heparina. É interessante observar que em ambos os grupos, tanto com PEI quanto com PAH, as absorvâncias apresentadas nos filmes de Látex, HA+látex e HA estejam na mesma ordem decrescente de intensidades. Entretanto, todas estas comparações não estão livres de ressalvas, pois os polieletrólitos empregados, apesar de absorverem na mesma região do espectro (de 200 a 250 nm), podem absorver a luz com intensidades diferentes.

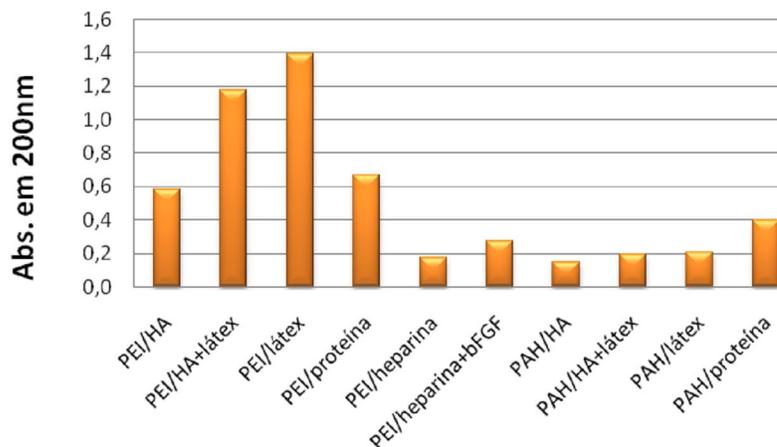


Figura 21: Comparação das absorvâncias detectadas na 10ª bicamada nos filmes LbL confeccionados.

- (ii) *Comparação pelas linearidades.* As linearidades obtidas nos filmes em R^2 foram dispostas na **Tabela 5** em ordem decrescente, assim como os respectivos dados de absorvância. Observa-se que não há clara relação entre a linearidade e a absorvância detectada. Os melhores filmes, ou seja, que apresentaram comportamento mais linear foram PEI/HA e PEI/HA+látex, e os de menor linearidade foram os filmes PAH/proteína (*in natura* e desnaturada). A **Tabela 5** mostra os dados de crescimento dos filmes de proteína apresentados na **Figura 18**.

Tabela 5: Linearidades dos filmes LbL confeccionados.

Filme LbL	Linearidade* (R ²)	Abs. (u.a.) na 10 ^a bicamada
PEI/HA	0,999	0,584
PEI/HA+látex	0,996	1,173
PEI/proteína <i>in natura</i>	0,995	0,947
PEI/heparina+bFGF	0,995	0,274
PEI/látex	0,991	1,391
PEI/proteína desnaturada	0,990	1,317
PAH/HA+látex	0,990	0,192
PEI/heparina	0,981	0,176
PAH/HA	0,972	0,147
PAH/proteína desnaturada	0,968	0,483
PAH/proteína <i>in natura</i>	0,959	0,366
PAH/látex	0,839	0,204

* R² dos filmes com heparina foram obtidos com ajuste polinomial e não linear.

7.3 Ensaio de degradação

Os filmes propostos foram automontados em triplicata sobre substratos de quartzo e imersos em 1,5 mL de solução PBS. As amostras acondicionadas em placa de cultura celular de 24 poços foram mantidas em estufa a 37°C e foram periodicamente analisadas por UV-vis. O teste de degradação teve duração de 21 dias para acompanhar os filmes pelo mesmo período do ensaio de MTT. Os períodos de tempo identificados com índices negativos (-5 a -1) nos gráficos a seguir, referem-se à absorvância obtida durante o processo de construção dos filmes LbL. O período de tempo 0 indica a absorvância obtida antes de iniciar o ensaio de degradação, pois os filmes não foram imediatamente analisados depois da confecção. Os gráficos deste item também trazem as absorvâncias obtidas em um substrato limpo de quartzo que foi incubado em solução PBS para detectar possíveis interferências nas determinações das amostras. Considerando as informações acima e para facilitar a discussão dos resultados, os dados de degradação foram agrupados em seus devidos sistemas.

7.3.1 Sistema de proteínas do látex

A **Figura 22** ilustra as absorvâncias obtidas nas amostras em função dos dias de incubação. Nota-se crescimento anômalo no filme entre os pontos -1 e 0 (dias) nos filmes PEI/proteína e PAH/proteína, com intensidades de absorvância equivalente a deposição de uma bicamada. Observa-se, também que no período correspondente ao ensaio de degradação propriamente dito, houve queda inicial na quantidade de material nos dois primeiros dias do teste. Após esta queda inicial, a absorvância elevou-se tanto em PEI/proteína (de 0,629 para 1,652) quanto em PAH/proteína (de 0,628 para 1,203), atingindo ápice no 8º dia de ensaio. Pela **Figura 22** verifica-se que apesar dos filmes com PEI possuírem mais material que os filmes com PAH, ambos comportam-se similarmente em meio aquoso, chegando a igualar suas intensidades no 14º dia em diante. Ambos os filmes testados não atingiram o valor inicial de absorvância em 21 dias, concluindo que os filmes de proteínas do látex não se degradam totalmente durante o período avaliado.

O substrato de quartzo adsorveu solução PBS, que foi detectada em 200 nm. A solução de PBS apresentou elevação discreta na absorvância do tempo zero ao 10º dia de incubação (de 0,065 para 0,140), que foi o período máximo avaliado até o momento de entrega desta dissertação. Atribui-se o aumento das absorvâncias dos filmes a incorporação de PBS em sua estrutura.

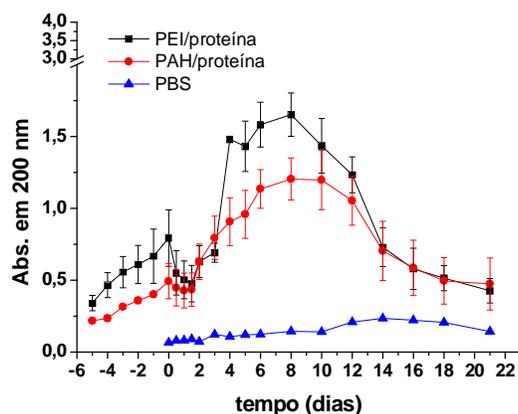


Figura 22: Degradação de filmes PEI/proteína e PAH/proteína em função do tempo de incubação PBS a 37°C, absorvância detectada em PBS também é mostrada.

Explicando mais detalhadamente o processo de degradação observado, sabe-se que ambientes altamente iônicos podem provocar o desaparecimento de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio pela mudança de pH, desconstruindo os filmes automontados [Serizawa et al., 2006]. Wood et al., [2005] acompanhou a desconstrução de filmes poliméricos por elipsometria e também observou que filmes LbL aumentam de espessura, só apresentando redução na espessura após a saturação do inchamento. Esse aumento na espessura foi atribuído ao balanço entre processos de hidrólise e o inchamento do material seco, processo que precede a degradação dominada apenas por hidrólise [Wood et al., 2005]. Acredita-se que a degradação dos filmes LbL deste sistema iniciou com uma desconstrução parcial das ligações de hidrogênio que reestruturou o filme permitindo, ou acelerando, a difusão de PBS para dentro do filme, levando ao inchamento do material. Após o inchamento, o processo seguiu por hidrólise que degradou as moléculas que compõe o filme de proteínas. Monocamadas de PEI usadas como filme base para automontagem LbL foi descrito como estável por mais de 200 dias em meio aquoso [Wood et al., 2005].

7.3.2 Sistema de látex natural

A **Figura 23** apresenta os resultados do ensaio de degradação em função do tempo para os filmes do sistema de látex natural com PEI (à esquerda) e PAH (à direita). Filmes com PEI (PEI/HA, PEI/HA+látex e PEI/Látex) apresentaram o mesmo crescimento anômalo observado no sistema de proteínas no látex, com elevação da absorvância entre os tempos de -1 a 0 dias. Não sabemos qual a causa do crescimento anômalo nos filmes dos sistemas látex e proteínas, mas especula-se tratar de adsorção de moléculas de água da atmosfera.

No início deste ensaio os filmes do sistema de látex não apresentaram redução acentuada nas absorvâncias, como observado no sistema anterior. Porém, novamente observou-se elevação nas absorvâncias após 2 dias de incubação com ápice no 10º dia de ensaio. Aparentemente dois dias é o período necessário para iniciar os processos de difusão nos filmes do sistema de látex, mesmo sem apresentarem a queda inicial vista nos filmes com proteínas. Do 10º ao 16º dia os filmes apresentaram queda nas absorvâncias, que se mantiveram estáveis até o 21º dia. Este comportamento foi observado na maioria dos filmes deste sistema, porém houve exceções, pois a degradação ocorreu diferentemente nos filmes com PEI e PAH.

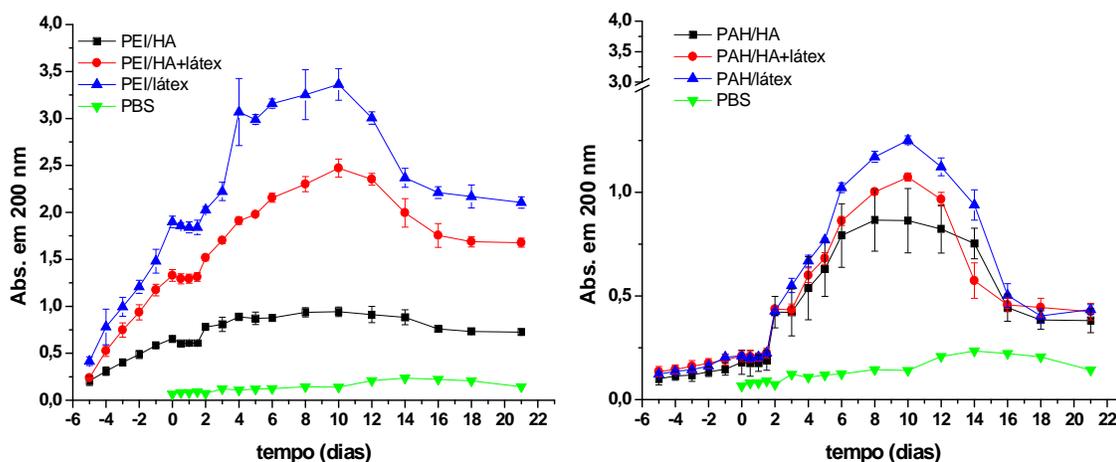


Figura 23: Degradação de filmes PEI/HA, PAH/HA, PAH/HA+látex, PEI/HA+látex, PAH/Látex, PEI/Látex em função do tempo de incubação PBS a 37°C, absorvância detectada em PBS também é mostrada.

O filme PEI/HA apresentou durante todo o ensaio valores estável de absorvância, com discreta elevação na quantidade de material no 2º dia e discreta diminuição no 16º dia, mas manteve absorvâncias constantes nesse ínterim ($0,889 \pm 0,042$). Os outros filmes com PEI se comportaram como descrito anteriormente, porém apresentando absorvâncias máximas (em 10 dias) e mínimas (em 16 dias) com intensidades diferentes. Filme PEI/látex apresentou absorvâncias máximas de 3,362 e mínimas de 2,211, enquanto que PEI/HA+látex apresentou 2,471 e 1,754, para os mesmos períodos.

Os filmes com PAH apresentaram absorvâncias máximas com intensidades diferentes (PAH/HA 0,863; PAH/HA+látex 1,073; e PAH/Látex 1,251), mas após o 16º os filmes se iguaram ($0,468 \text{ u.a} \pm 0,031$). As diferenças entre esses filmes com PEI e PAH

possivelmente se devem as quantidades iniciais de material em cada filme, que variam mais nos filmes com PEI que nos com PAH. Observou-se também algumas similaridades, pois os filmes com PEI e PAH apresentaram picos de absorbância decrescentes quando automontados com Látex, HA+látex e HA, respectivamente. Importante ressaltar que o sistema de látex natural apresentou maior inchamento dois dias depois que o sistema de proteínas do látex.

7.3.3 Sistema de heparina

A degradação em meio aquoso dos filmes PEI/heparina sódica e PEI/heparina+bFGF em função do tempo é apresentada na **Figura 24**. Os dados de absorbância adquiridos foram inferiores aos demais sistemas estudados, e seu comportamento apresentaram algumas singularidades. Nos filmes PEI/heparina, não foi identificado crescimento anômalo entre os tempos de -1 a 0, como nos outros filmes. A absorbância se manteve estável no período de -1 ao 2º dia de ensaio, apresentando elevação com ápice no 8º dia (de 0,365 para 1,061) seguido de queda até o 21º dia. O filme PEI/heparina não apresentou estabilização distinta entre o 16º e o 21º dia, sugerindo que esta etapa do processo de degradação seja mais severa para este filme de sacarídeo.

Os filmes PEI/heparina+bFGF (**Figura 24**), cujos testes ainda não foram concluídos, apresentaram no período total de 10 dias de avaliação comportamento muito diferente de PEI/heparina. Primeiramente, observa-se que apesar de PEI/heparina+bFGF apresentar absorbâncias maiores durante o crescimento do filme, o aumento durante a degradação foi menor. A absorbância apresentou discreta elevação no 3º dia, mas no geral ocorreu estabilidade ($0,310 \pm 0,023$) de zero ao 6º dia, seguido de elevação discreta até o 10º dia. Os resultados indicam que o processo de degradação de PEI/heparina+bFGF é diferente de PEI/heparina.

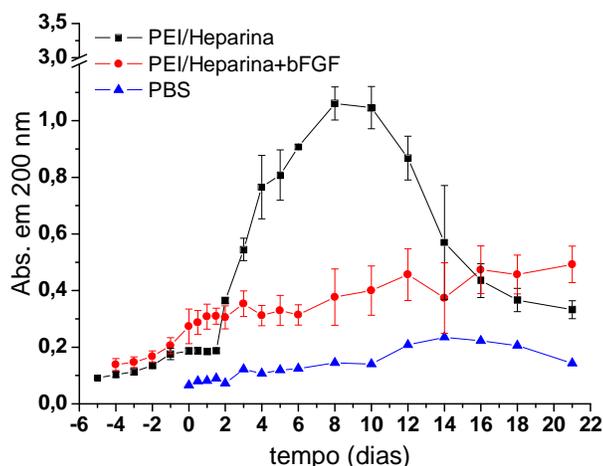


Figura 24: Degradação de filmes PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF em função do tempo de incubação em PBS a 37°C, absorvância detectada em PBS também é mostrada.

O filme PEI/heparina+bFGF foi o único que não reagiu ao período de 2 dias de incubação e também não apresentou inchamento identificável em 10 dias. Ambos os filmes deste sistema foram previamente estudados por Mao et al. [2005], que analisou o decaimento na concentração de cada constituinte dos filmes LbL separadamente. Mao observou que a concentração de heparina mantém-se praticamente estável no filme PEI/heparina, enquanto que complexo Heparina+aFGF decaem mais rapidamente no filme PEI/heparina+aFGF. Ele detectou taxas de decaimento de 10% para heparina e 55% para Heparina+aFGF, atribuindo este resultado a uma menor interação entre o complexo Heparina+aFGF e o PEI. É importante ressaltar que a metodologia empregada por ele usou fluoróforos ligados ao FC e a heparina, algo que pode influenciar na cinética e nas forças de interação que formam os filmes LbL.

Com base nos resultados, acredita-se que a degradação dos filmes do sistema de heparina se processa da seguinte maneira:

- (i) Filmes PEI/heparina degradam-se inicialmente apresentando estabilidade na quantidade de material até o 2º dia em meio PBS. Seguem com o inchamento do material, apresentando saturação entre o 8-10º dia, e progredindo com degradação que não foi completa no período avaliado.
- (ii) Filmes PEI/heparina+bFGF possivelmente degradem conforme esquematizado na **Figura 25**. Ocorre uma estabilização inicial com leve aumento nas absorvâncias dos filmes até o 6º dia de ensaio. Esta estabilização, provavelmente provocada pelo equilíbrio entre as difusões do complexo heparina+bFGF para fora do filme, e, de PBS para dentro do filme. Os filmes, então sofrem inchamento (do 8º ao 21º dia)

provocado pelo desequilíbrio entre os processos de difusão. O desequilíbrio seria causado pela perda de heparina+bFGF para o meio, deixando o filme mais parecido como um gel rico em PEI e inchado com PBS. Esta idéia colabora com a estabilidade reportada para filmes de PEI por Wood et al. [2005].

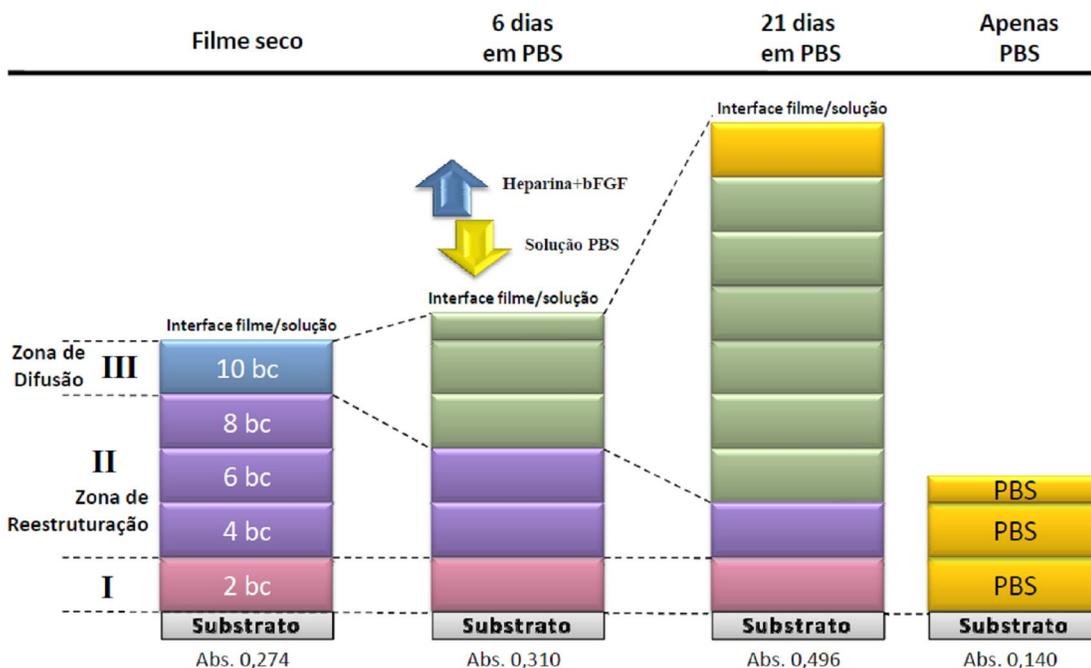


Figura 25: Esquemática do processo de degradação do filme PEI/heparina+bFGF, considerando o modelo de três zonas.

O filme PEI/heparina+bFGF apresentou crescimento exponencial, este modelo de crescimento foi anteriormente esquematizado na Figura 1. Com base nesta figura, acredita-se que a degradação do filme exponencial PEI/heparina+bFGF ocorreria pelo processo inverso ao de crescimento. Havendo durante a desconstrução do filme, um aumento da zona de difusão (III) que induziria a desestruturação da zona II do filme (Figura 25). Em outras palavras, em meio aquoso a zona III permitiria a “entrada” de líquido do meio, e conseqüentemente a saída de moléculas do filme. No caso, o complexo heparina+bFGF, se considerarmos o observado em filmes similares estudados por Mao et al. [2005].

Na Figura 25 a absorbância foi linearmente separada em bicamadas para facilitar a visualização, e todos os filmes esquematizados seguem proporcionalmente as absorbâncias detectadas. A absorbância discriminada no filme “6 dias em PBS”, é a média dos valores detectados entre os dias 0 e 6, porém, o filme “21 dias em PBS” ilustra valores detectados

apenas no dia indicado. Para inferirmos a taxa de decaimento de heparina+bFGF nos filmes estudados com base na **Figura 25**, teríamos que considerar uma difusão em equilíbrio, e que o filme em 6 dias absorveu uma “camada” de PBS (abs. 0,140). Desta forma, poderíamos dizer que o filme PEI/heparina+bFGF perdeu, com 6 dias em meio aquoso, quantidade de heparina+bFGF similar a 4bc do filme original, algo próximo a 40% do material. Obviamente estas conjecturas ainda carecem de mais dados para comprovação experimental.

7.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Foram realizadas análises de FTIR apenas para alguns filmes do sistema de látex natural (PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex) e os padrões *castings* das soluções utilizadas. Os espectros de cada *casting* e seu respectivo filme LbL foram agrupados em um mesmo gráfico. Nos gráficos, os espectros apresentam picos cuja localização e atribuição em números de onda (cm^{-1}) foram identificadas pela literatura. As identificações e dos picos estão representadas nos gráficos pelo os números de onda (cm^{-1}) identificados em nossas análises. Com o intuito de facilitar o entendimento, descreveremos separadamente os espectros dos padrões e das amostras. Tentativas de analisar os sistemas de proteína do látex e heparina por FTIR foram frustrados pela baixa resposta destas soluções ao infravermelho. Novas tentativas talvez funcionem se realizadas com filmes contendo mais de 20 bicamadas.

7.4.1 Padrões das soluções (castings)

- Polietilenimina – PEI. Possui como principais grupos o CH_2 , NH e NH_3^+ [Yang et al., 2006] estruturalmente distribuídos conforme a **Figura 26a**. O grupo CH_2 apresentou vibração assimétrica em 2929 cm^{-1} (identificada na literatura em 2952 cm^{-1}), simétrica em 2849 cm^{-1} (descrito em 2862 cm^{-1}), e deformação angular fora do plano em 1455 cm^{-1} (descrito em 1453 cm^{-1}). Os grupos NH (NH e NH_3^+) apresentaram pico de deflexão em 1583 cm^{-1} (descrito em 1585 cm^{-1}), e há também a presença do grupo C-N observado em 1157 cm^{-1} (descrito em 1122 cm^{-1}) [Yang et al., 2006; Silverstein et al., 2007].

- Cloridrato de polialilamina – PAH. Apresentou o pico em 2957 cm^{-1} atribuído ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH (descrito em 2950 cm^{-1}). Assim como os picos 1604 cm^{-1} (descrito em 1608 cm^{-1}) e 1511 cm^{-1} (descrito em 1510 cm^{-1}) ambos referentes à deformação angular da ligação N-H [Crespilho et al., 2005]. A fórmula estrutural da unidade repetitiva do PAH esta representada na **Figura 26b**.

- Látex natural. Material formado principalmente de poli-cis-1,4-isopreno (cuja estrutura foi previamente apresentada na **Figura 2**) e proteínas, têm como principais grupos químicos C=CH , C=C , CH_3 e CH_2 . Os picos 3037 , 2962 e 2857 cm^{-1} (descritos na literatura em 3035 , 2962 e 2850 cm^{-1}) foram atribuídos, respectivamente, a deformação axial do $=\text{CH}$; e a deformação axial assimétrica e angular do CH_3 . O grupo CH_3 também possui deformação angular adicional no pico 1375 cm^{-1} . O grupo CH_2 apresentou deformação angular em 1448 cm^{-1} (descrito na literatura em região $1445\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$). E o grupo C=C foi representado pelo

pico 1662 cm^{-1} (descrito em 1664 cm^{-1}) [Preedep et al., 2006; Galiani et al., 2007; Healey et al., 1995].

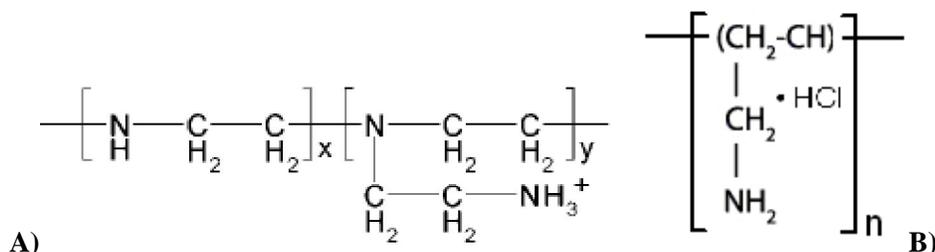


Figura 26: Formula estrutural do a) PEI e b) PAH. Fontes: Elzbieciak et al., 2009; <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> e <http://www.polysciences.com/Catalog>

- Ácido húmico. É constituinte da matéria orgânica do solo e, portanto a sua composição pode variar de acordo com a região de extração [Dupuy e Douay, 2001]. Sua forma molecular é complexa e variável, todos os compostos orgânicos do ácido húmico foram revisados por Schulten e Schnitzer [1998], mas não é interessante expô-los neste trabalho. Como principais grupos químicos identificam-se o $-\text{CH}$, $\text{C}=\text{C}$, CH_2 , CH_3 , $\text{C}-\text{O}$ e OH . A ligação $-\text{CH}$ alifático está presente nos picos 2917 e 2848 cm^{-1} (descritos na literatura na região $2930\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$). O grupo $\text{C}=\text{C}$ ligado ao radical COOH foi identificado em 1608 cm^{-1} , embora seja originalmente identificado em 1650 cm^{-1} na literatura. Os grupos CH_2 ou CH_3 apareceram como deformação angular em 1459 cm^{-1} (descrito em 1460 cm^{-1}). E os grupos $\text{C}-\text{O}$ e OH do ácido carboxílico, fracamente identificados no pico 1274 cm^{-1} , são descritos na literatura na região de $1200\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$, com pico adicional do $\text{C}-\text{O}$ em $1150\text{-}1170\text{ cm}^{-1}$ que não foi observado [Crespilho et al., 2005; Dupuy e Douay, 2001; Li et al., 2003; Pérez et al., 2004; Castaldi et al., 2005].

- Solução de HA+látex. A solução 1:1 de ácido húmico ($0,5\text{ g.L}^{-1}$) e látex natural ($2,5\mu\text{L.mL}^{-1}$) foi também analisada por FTIR e o espectro obtido é apresentado na **Figura 27** junto com o das soluções precursoras. O gráfico apresenta picos identificados na literatura para HA e látex natural. Tendo as linhas pontilhadas como guias para comparação entre os diferentes espectros, observa-se que os picos das soluções precursoras permanecem na solução HA+látex. A única exceção foi o pico 1274 cm^{-1} (grupos $\text{C}-\text{O}$ e OH) do HA que era fracamente identificado e não aparece na solução HA+látex.

Observa-se que o espectro da solução HA+látex (**Figura 27**) é idêntico ao espectro da solução de látex sozinha, porém a região $1750\text{-}2250\text{ cm}^{-1}$ (área em destaque) é característica da solução de ácido húmico. O pico 1618 cm^{-1} (área menor em destaque) apresenta claramente elementos das duas soluções precursoras: pico logo 1608 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ ligado a

COOH) pertencente ao HA com “ombro” pertencente ao pico 1662 cm^{-1} (C=C) do látex natural. Por essas informações conclui-se que a solução HA+látex trata-se de simples mistura, pois não há evidências de reações entre os seus componentes.

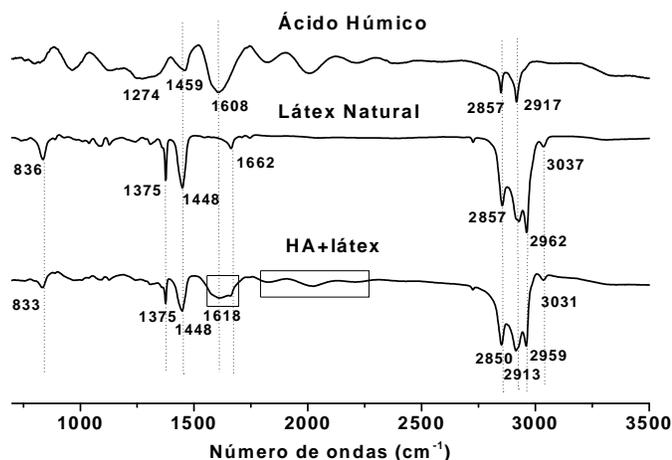


Figura 27: Espectros de FTIR solução de HA+látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.

7.4.2 Sistema de látex natural

- Filme PEI/látex. O espectro do filme PEI/látex (**Figura 28**) apresenta pico em 3032 cm^{-1} que pode ser atribuído ao pico 3037 cm^{-1} (=CH) do látex natural. Apresenta pico 2959 cm^{-1} atribuído a um deslocamento do pico 2962 cm^{-1} (-CH₃) do látex. O pico em 2915 cm^{-1} , também presente no látex, mas pode ser atribuído a um deslocamento do pico 2929 cm^{-1} (CH₂) do PEI. O filme de PEI/látex também apresenta pico em 2850 cm^{-1} , na mesma região que os picos 2857 cm^{-1} (CH₃) do látex natural e 2849 cm^{-1} (CH₂) do PEI, podendo ser atribuído a ambos. O pico 1446 cm^{-1} se apresenta na região dos picos 1448 e 1455 cm^{-1} do grupo CH₂ pertencente ao látex e PEI, respectivamente. O filme também apresenta vibração em 1377 cm^{-1} pertencente à deformação angular do CH₃ (em 1375 cm^{-1}) do látex. O grupo -CN (1157 cm^{-1}) do PEI está ausente no filme PEI/látex talvez pela baixa intensidade deste pico. O grupo -NH (1583 cm^{-1}) do PEI possivelmente está presente no filme LbL na forma de “ombro” no pico 1658 sobreposto pelo grupo C=C (1662 cm^{-1}) do látex. E por último o pico 835 cm^{-1} pertencente à deformação angular do C=CH do látex natural, aparece na mesma região.

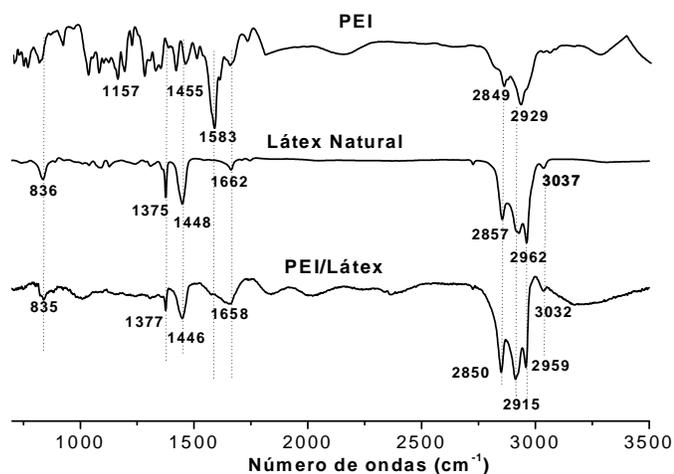


Figura 28: Espectros de FTIR do filme de PEI/Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.

- Filme PAH/látex. O filme PAH/látex (**Figura 29**) manteve inalterado o pico 3037 cm^{-1} ($=\text{CH}$) do látex, e apresentou o pico 2956 cm^{-1} na mesma região de 2962 cm^{-1} (CH_3) do látex e 2957 cm^{-1} (NH_3) do PAH. O pico 2847 cm^{-1} presente neste filme é provavelmente um deslocamento do pico 2857 cm^{-1} (CH_3) do látex. O pico 1640 cm^{-1} situa-se na mesma região do pico 1662 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$) do látex e talvez possa ser atribuído ao deslocamento do pico 1604 cm^{-1} ($-\text{NH}$) do PAH. O filme de PAH/látex também apresentou picos 1445 , 1375 e 835 cm^{-1} , referentes aos grupos CH_2 (1448 cm^{-1}), CH_3 (1375 cm^{-1}) e $\text{C}=\text{CH}$ (836 cm^{-1}) do látex natural. Há ausência apenas do pico 1406 cm^{-1} referente à deformação angular do grupo $-\text{NH}$ do PAH, possivelmente provocado pela baixa intensidade do espectro do PAH.

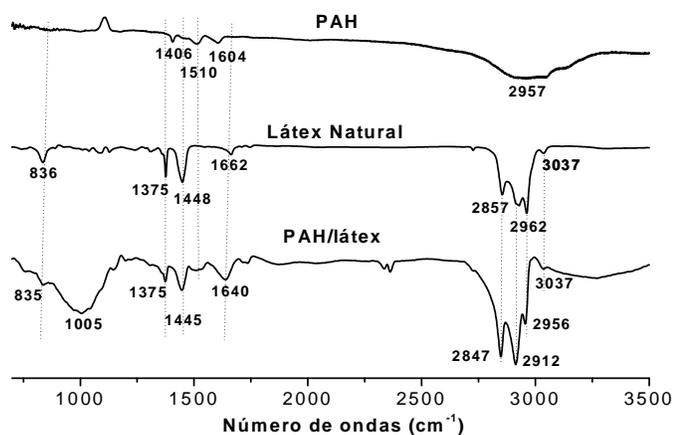


Figura 29: Espectros de FTIR do filme de PAH/Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.

- Filme PEI/HA+látex. No filme de PEI/HA+látex (**Figura 30**) o grupo =CH (3031 cm^{-1}) é quase imperceptível, mas o pico 2955 cm^{-1} atribuído ao grupo $-\text{CH}_3$ (2962 cm^{-1}) está presente, ambos originários da solução HA+látex. O pico em 2910 cm^{-1} pode ser atribuído ao grupo $-\text{CH}$ (2913 cm^{-1}) do HA+látex. Outro pico 2849 cm^{-1} está na mesma região dos grupos $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_3$ (2850 cm^{-1}) do HA+látex e $-\text{CH}_2$ (2849 cm^{-1}) do PEI. A amostra também apresentou um pico largo em 1623 cm^{-1} , situado na região dos grupos C=C (1618 cm^{-1}) do HA+látex e $-\text{NH}$ (1583 cm^{-1}) do PEI. Note que o formato do pico 1623 cm^{-1} não apresenta o mesmo “ombro” visível no pico 1618 cm^{-1} do HA+látex. O grupo $-\text{CH}_2$ também foi detectado no filme PEI/HA+látex em 1456 cm^{-1} , na mesma região (1448 cm^{-1}) do HA+látex e (1583 cm^{-1}) do PEI. O filme de PEI/HA+látex também apresentou o grupo C=CH (833 cm^{-1}) do HA+látex deslocado para 845 cm^{-1} .

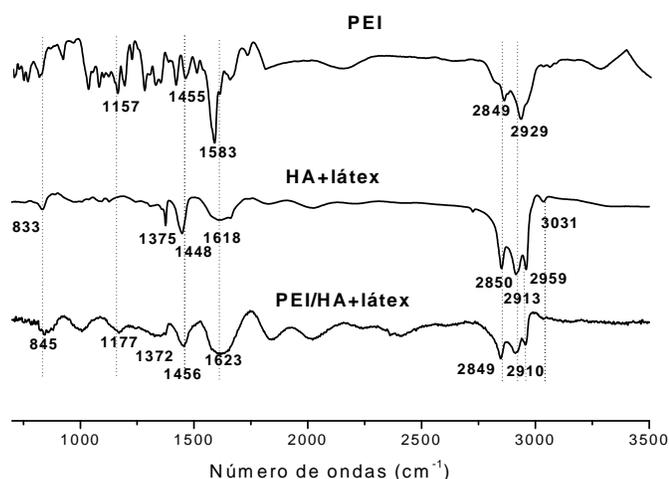


Figura 30: Espectros de FTIR do filme de PEI/HA+Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.

- Filme PAH/HA+látex. O filme de PAH/HA+látex (**Figura 31**) apresenta pico 3031 cm^{-1} (grupo =CH do HA+látex), e pico 2957 cm^{-1} (grupos $-\text{CH}_3$ e NH_3 do PAH). O pico 2913 cm^{-1} ($-\text{CH}$) do HA+látex aparece no filme em 1914 cm^{-1} , assim como o pico 2850 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}$) aparece deslocado para 2853 cm^{-1} . A amostra também apresentou um pico discreto em 1657 cm^{-1} na mesma região dos grupos C=C (1618 cm^{-1}) e $-\text{NH}$ (1604 cm^{-1}) oriundos das soluções HA+látex e PAH, respectivamente. O grupo $-\text{CH}_2$ foi detectado em 1447 cm^{-1} , na região 1448 cm^{-1} da solução HA+látex. Este filme LbL também apresentou os grupos CH_3 (1375 cm^{-1}) e C=CH (833 cm^{-1}) do HA+látex, respectivamente deslocados para 1377 cm^{-1} e 830 cm^{-1} .

Os filmes automontados apresentam espectros muito similares à solução do látex sozinha, aparentemente a intensidade do látex é superior aos outros materiais usados. Entretanto, as soluções utilizadas apresentarem grupos químicos, (mesmo que diferentes) nas mesmas regiões do espectro o que impossibilita distinguir, no filme, a procedência real desta vibração. Porém, observa-se que os grupos mais importantes das soluções precursoras mantêm-se no filme após a sua confecção, confirmando que as suas moléculas estão presentes nos filmes LbL confeccionados.

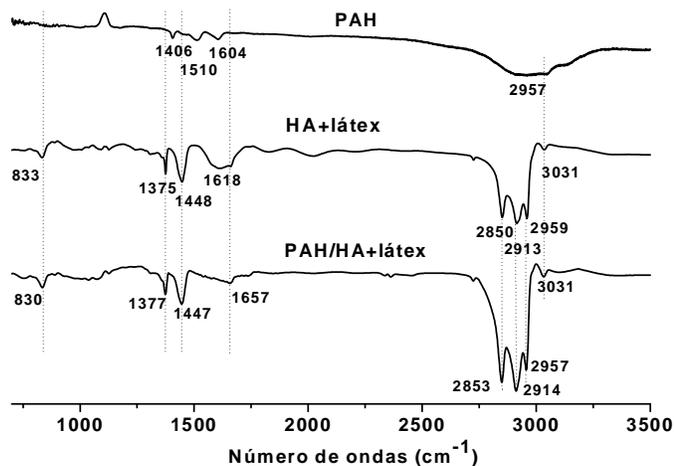


Figura 31: Espectros de FTIR do filme de PAH/HA+Látex com os picos identificados conforme descritos na literatura.

7.5 Microscopia de Força Atômica – AFM

Ensaio foram realizados em filmes com 5 e 15 bicamadas (bc) dos sistemas de proteína do látex, látex natural e heparina. A topografia dos filmes foi estudada em área de $10 \mu\text{m}^2$ e para as amostras menos rugosas, imagens de $2 \mu\text{m}^2$ também foram obtidas. A análise de AFM foi feita com cantilever de silício, com varredura de contato intermitente (*tipping mode*). Os dados de rugosidade média (Root-mean square – Rms) foram obtidos pelo programa computacional (Nanoscope III) do aparelho de AFM da Digital Instruments, e as imagens em programa computacional livre, Gwyddion (versão 2.16).

Um substrato de mica sem filme foi analisado para determinar a topografia e rugosidade original, permitindo assim sua comparação com as amostras confeccionadas. A superfície do substrato (**Figura 32**) apresentou rugosidades de 73,1 nm em varredura de $10 \mu\text{m}^2$ e Rms de 11,9 nm com aumento de $2 \mu\text{m}^2$. As demais imagens apresentadas nesta seção seguirão o mesmo modelo da **Figura 32**, ou seja, as imagens com maior ampliação serão mostradas em 3D e as demais em imagens planas.

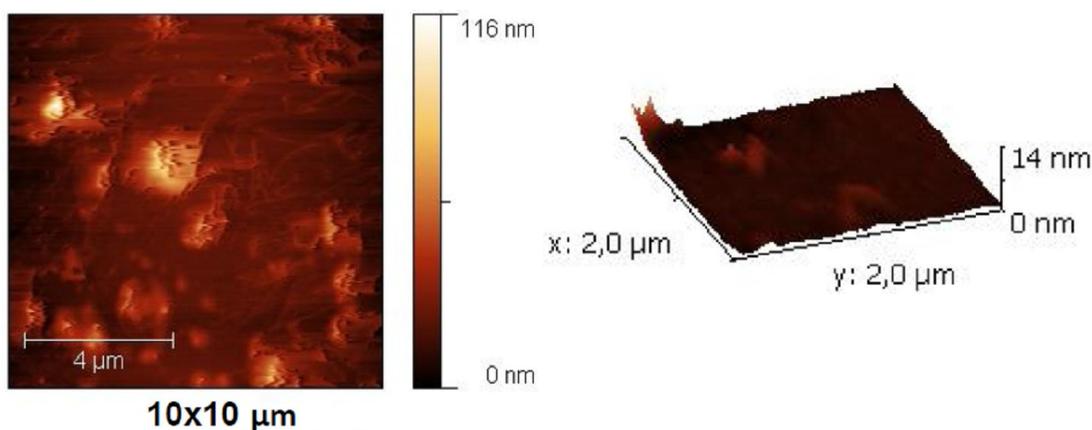


Figura 32: Imagens de AFM de substrato de mica, sem filme mostrando áreas de $10 \mu\text{m}^2$ (escala de $4 \mu\text{m}$.) e $2 \mu\text{m}^2$.

7.5.1 Sistema de proteínas do látex

A **Figura 33** apresenta as imagens de AFM com varredura em $10 \mu\text{m}^2$ para os filmes PEI/proteína do látex nos pH 3,0; 7,4 e 9,0. O filme PEI/proteína em pH 3,0 apresentou rugosidades de 6,8 e 2,8 nm para 5bc e 15b e pelas imagens fica evidente que o filme com

15bc possui topografia mais uniforme que o filme com 5bc. Houve redução nas irregularidades da superfície com o aumento no número de camadas. Entretanto o filme PEI/proteína em pH 7,4 apresentou rugosidades de 7,6 nm para 5bc e 15bc, ou seja a rugosidade se manteve inalterada com o aumento do número de bicamadas. Pela **Figura 33** é possível identificar em ambas as imagens em pH 7,4 poucas estruturas claras com maior elevação no eixo Z (máximo de 96 nm) e cerca de 1 μm de dimensão. No filme PEI/proteína em pH 9,0 os índices de Rms mudaram de 4,4 nm em 5bc para 8,2 nm em 15bc um, havendo, portanto, uma elevação na rugosidade da superfície com o aumento do número de bicamadas.

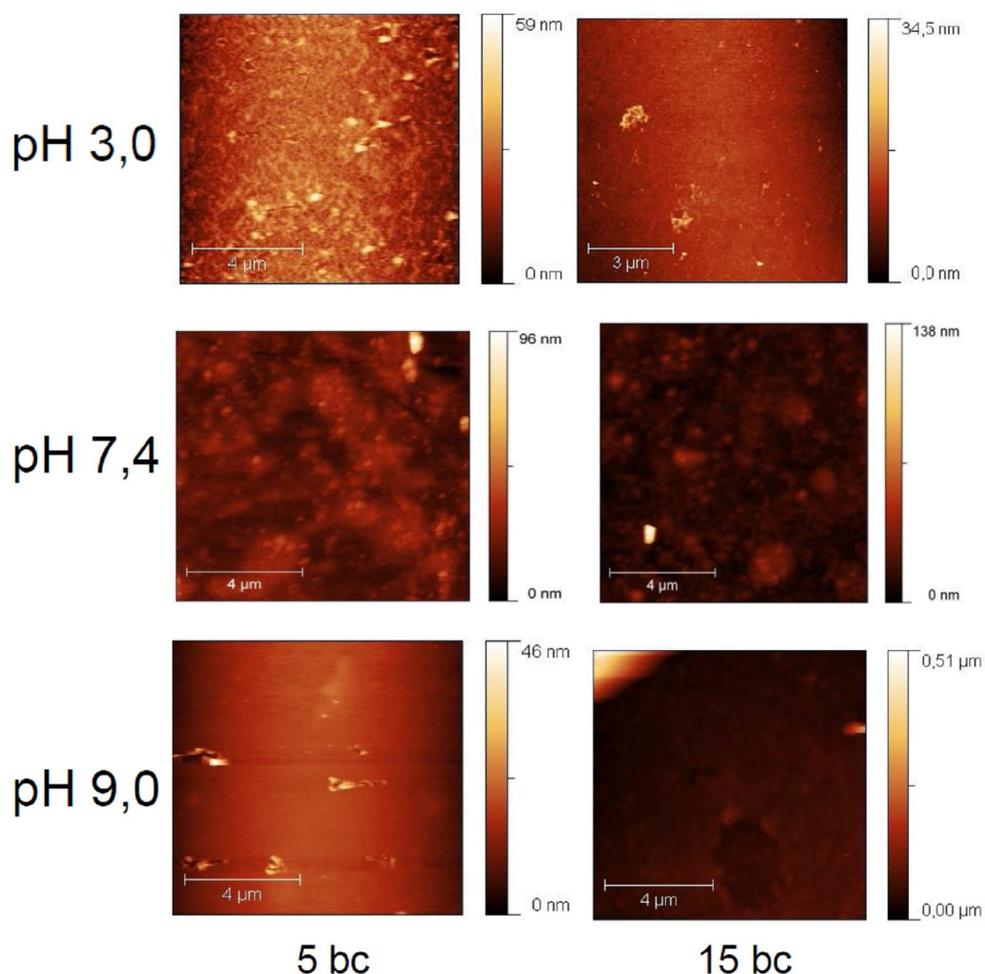


Figura 33: Imagens de AFM de filmes PEI/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 3 e 4 μm .

As imagens com 2 μm^2 (**Figura 34**) exemplificam melhor a diferença na topografia dos filmes PEI/proteína nos vários pHs. Observa-se redução dos valores no eixo Z nos filmes

em pH 3,0 (de 22,0 para 7,3nm), estabilidade em pH 7,4 (de 23,0 para 25,0 nm) e elevação em pH 9,0, apesar das estruturas vistas em 5bc (altura 36,0 nm) não permitirem uma comprovação numérica. O filme PEI/proteína em pH 9,0 com 15bc apresentou topografia similar aos filmes em pH 7,4.

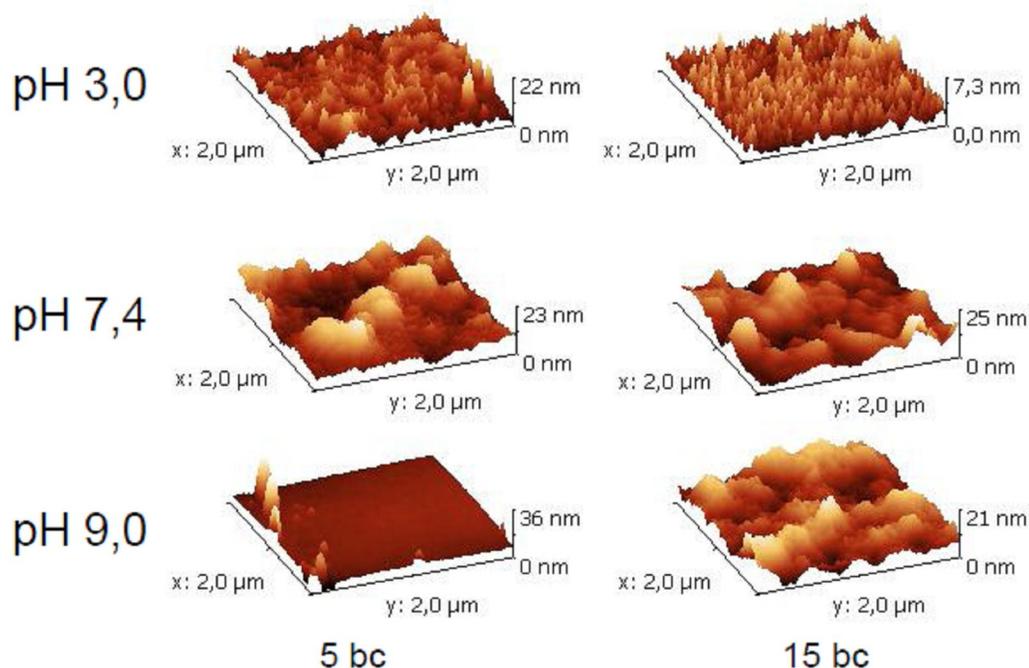


Figura 34: Imagens de AFM de filmes PEI/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 4 μ m.

Para os filmes de proteínas do látex confeccionados com PAH a topografia apresentou-se diferente da observada anteriormente. A **Figura 35** apresenta imagens da superfície uniforme dos filmes PAH/proteína em pH 3,0 com Rms de 3,7 e 5,0 nm para 5bc e 15bc, respectivamente. Apenas poucas estruturas foram detectadas com a elevação máxima de 62 nm na imagem de 15bc, e foi possível constatar a discreta elevação na rugosidade com mais bicamadas. O sistema em pH 7,4 apresenta topografias com baixa rugosidade, com Rms de 5,3 e 8,7 nm para 5bc e 15bc, respectivamente. Observa-se que a superfície do filme com 5bc é uniforme e lisa por vários micrômetros, apresentando pontos dispersos com elevação (eixo Z) inferior a 50 nm. Com o aumento do número de bicamadas a quantidade de pontos dispersos na superfície se eleva, mas a altura máxima é menor que no filme com 5bc. Comportamento similar foi apresentado pelos filmes PAH/proteína em pH 9,0 cujos índices de Rms se elevaram de 4,3 nm em 5bc para 7,2 nm em 15bc.

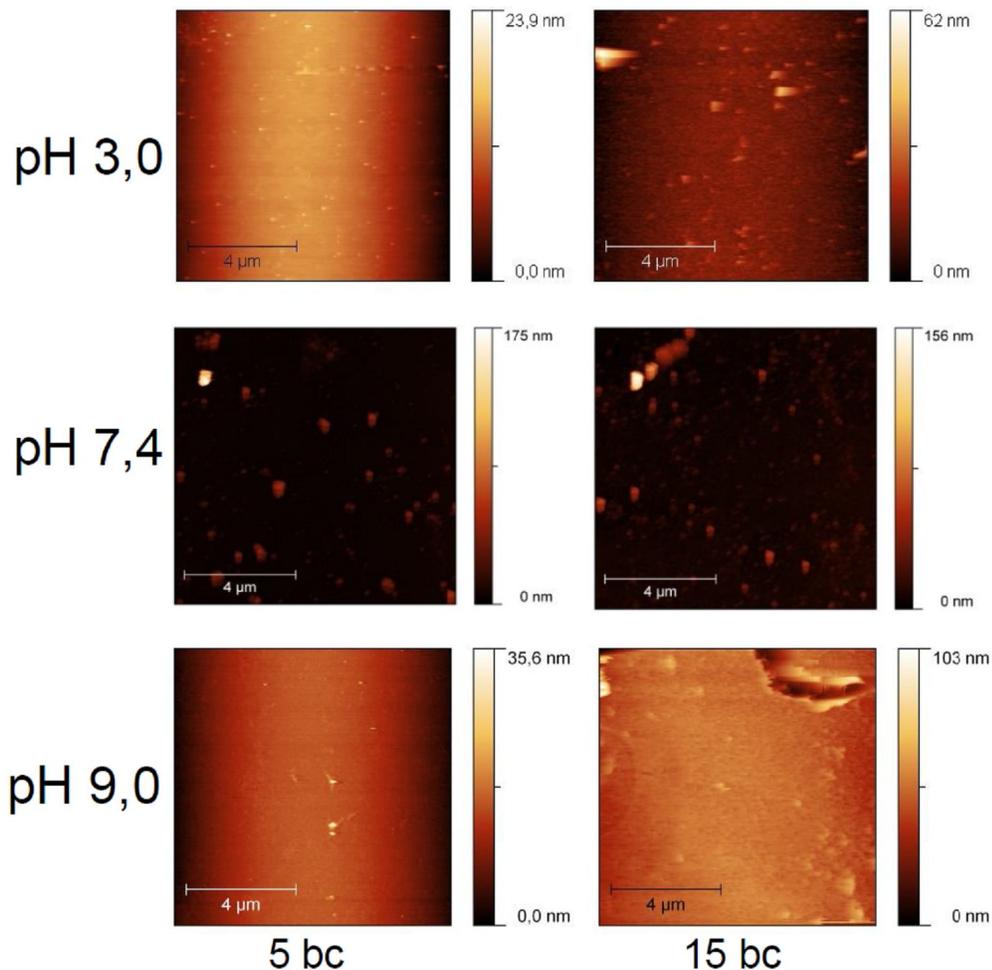


Figura 35: Imagens de AFM de filmes PAH/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas. Escala de 4μm.

Através da **Figura 36** percebe-se a tendência dos filmes de proteínas do látex com PAH em tornarem-se mais rugosos com o aumento do número de bicamadas. Isso é claramente perceptível pela elevação nas imagens nos valores do eixo Z de 8,7 para 22,0 nm (em pH 3,0) e de 8,6 para 36,0 nm (pH 9,0), respectivamente para 5 e 15bc. Nas imagens de PAH/proteína em pH 7,4 observa-se estruturas maiores em 5bc, com o dobro da altura que em 15bc, porém, essas estruturas são isoladas e no geral a topografia aparenta ser mais uniforme com 5bc, concordando com os dados de Rms.

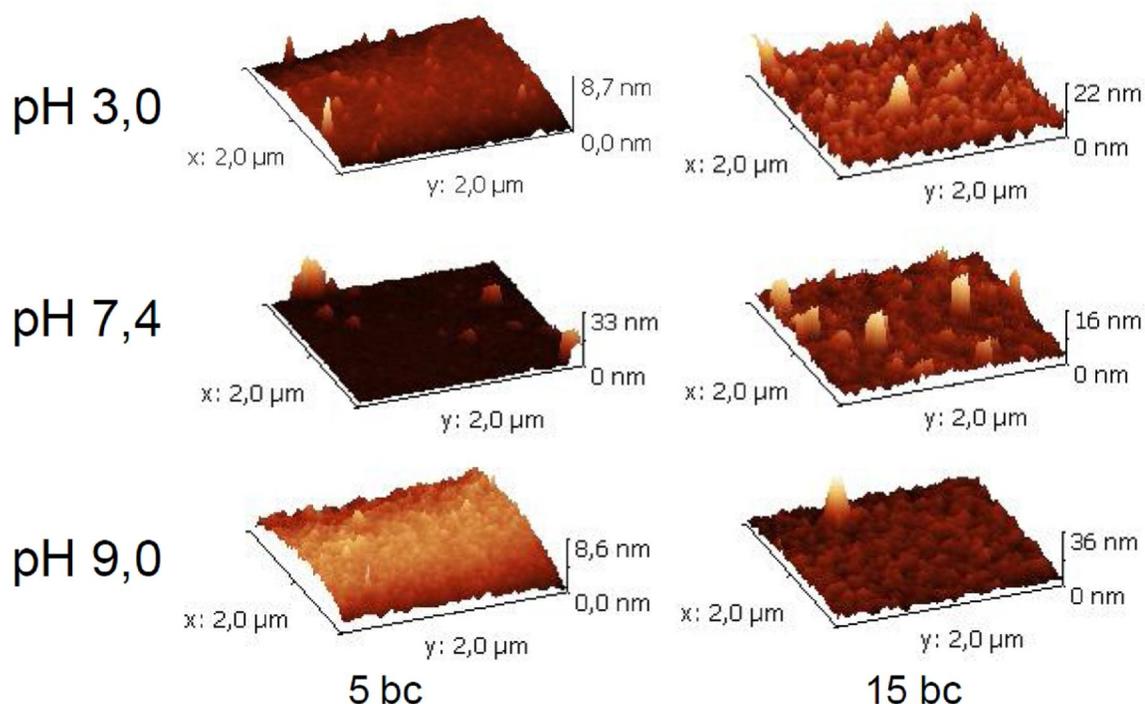


Figura 36: Imagens de AFM de filmes PAH/proteína do látex em pH 3,0; 7,4 e 9,0 com 5 e 15 bicamadas.

Apesar da pouca diferença entre as rugosidades dos filmes de proteínas do látex automontados com PEI e PAH, há diferenças topográficas. Em geral filmes com PEI são mais globulares que os filmes com PAH e apesar da topografia de ambos se alterar com o pH, isso se processa diferentemente nos filmes com cada polieletrólito. Filmes com PAH elevam a rugosidade com o número de bicamadas em todos os pHs, o que ocorreu com PEI apenas em pH 9,0; pois em pH 3,0 a rugosidade diminuiu e em pH 7,4 não se alterou.

A explicação para os comportamentos dos filmes PEI/proteína pode estar na quantidade de material agregado (vide **Figura 17**) que varia muito mais que nos filmes com PAH. A redução de Rms vista pH 3,0 possivelmente se relaciona com a baixa quantidade de material depositado no filme. Observa-se também que em pH 7,4 a quantidade de material foi à maior, quase o dobro que em pH 9,0. Esses resultados sugerem que a rugosidade dos filmes PEI/proteína se estabiliza a partir de certa quantidade de material depositado. Isso explicaria também o porquê apenas o filme com 15bc em pH 9,0 tem topografia idêntica com os filmes em pH 7,4 (5 e 15bc). Em suma, os filmes do sistema de proteínas do látex contêm irregularidades equiparáveis com a superfície do substrato de mica.

7.5.2 *Sistema de látex natural*

Os filmes PEI/HA (**Figura 37**) apresentaram rugosidades de 25,1 nm para 5bc e 58,3 nm para 15bc. Este aumento nas rugosidades só se torna visível pelas imagens da **Figura 43** quando se considera as escalas. As imagens do PEI/HA com 5bc mostra grande quantidade de estruturas, tanto dispersas quando aglomeradas (dimensões de $2\mu\text{m}$ aproximadamente) com altura máxima de 273 nm. O filme com 15bc contém estruturas em menor quantidade e mais dispersas que o filme com 5bc, com dimensão maior que $1\mu\text{m}$, porém com alturas máximas de 630 nm (na imagem $0,63\mu\text{m}$). As imagens de $2\mu\text{m}^2$ revelam topografias globulares como às observadas nos filmes PEI/proteína do látex, considerando as devidas proporções.

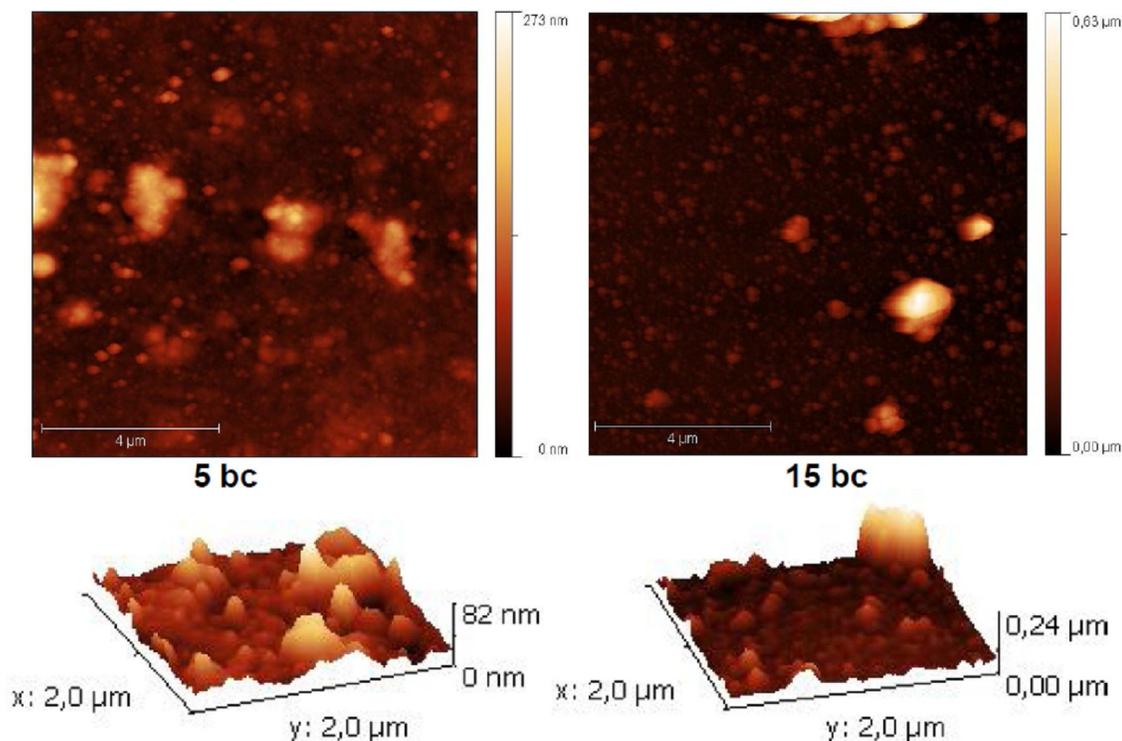


Figura 37: Imagens de AFM de filmes PEI/HA com 5 e 15 bc. Escala de $4\mu\text{m}$.

O filme PAH/HA (**Figura 38**) apresentou Rms de 7,7 e 12,8 nm, respectivamente, para 5 e 15bc. PAH/HA com 5bc tem superfície homogênea, apresentando estruturas com elevação máxima de 66 nm e dimensões da ordem de poucas dezenas de nanômetros. O mesmo filme com 15bc apresentou apenas duas estruturas maiores que $1\mu\text{m}$ (eixo Z máximo de 291 nm) e estruturas menores homogeneamente dispersas no restante da superfície. Pelas imagens 3D observa-se que PAH/HA com 15bc parece mais homogêneo que 5bc apesar de

apresentar estruturas maiores. Puderam-se observar diferenças entre os filmes automontados com PEI ou PAH com ácido húmico; com filmes PAH apresentando menor variação na rugosidade com o aumento do número bicamadas que os filmes com PEI.

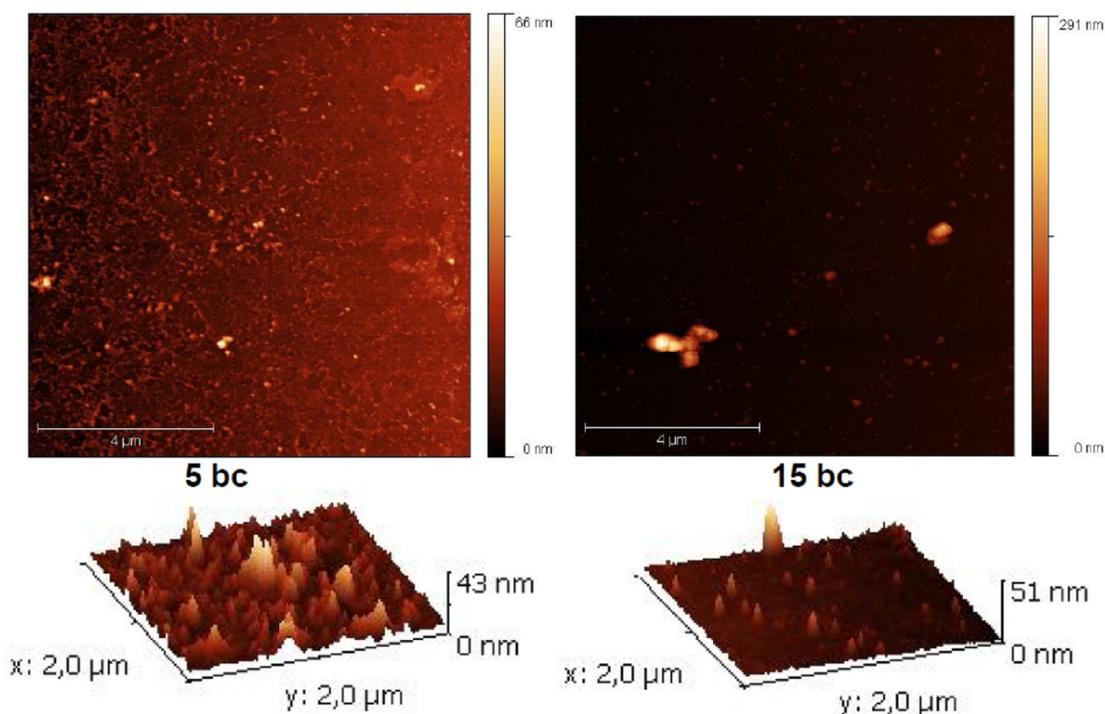


Figura 38: Imagens de AFM de filmes PAH/HA com 5 e 15 bc.

Os filmes com látex natural em sua constituição (PEI/látex, PEI/HA+látex, PAH/látex e PAH/HA+látex) apresentaram superfícies heterogêneas e por esta razão varreduras de AFM com $2 \mu\text{m}^2$ não foram realizadas, pois não retratariam o filme como um todo. A **Figura 39** retrata o filme PEI/látex no qual se observou elevação na Rms de 120,3 nm (em 5bc) para 256,6 nm (em 15bc). O filme com 5bc apresentou estruturas globulares maiores com dimensões aproximadas de $5,0 \times 4,0 \times 0,6 \mu\text{m}$, sendo circundadas por estruturas menores que preenchem as áreas próximas. Com 15bc não se diferencia áreas com estruturas de tamanhos diferentes como em 5bc, visualizando apenas estruturas globulares com contorno pouco definido (eixo Z máximo de 1.530 nm).

As características apresentadas nos filmes PEI/látex sofreram muitas alterações quando HA foi adicionado na composição do filme. PEI/HA+látex (**Figura 40**) apresentou também considerável elevação na rugosidade com o aumento do número de bicamadas, com Rms de 34,2 e 205,9 nm para 5bc e 15bc, respectivamente. Entretanto, a superfície de ambos os filmes PEI/HA+látex com 5 e 15bc apresentam estruturas menores, com contornos melhor

delimitados que os filmes PEI/látex. No filme PEI/HA+látex (com 15bc) há estrutura com relevo muito maior que foi analisado em um corte transversal, realizado pelo programa computacional do aparelho, para melhor avaliar a estrutura.

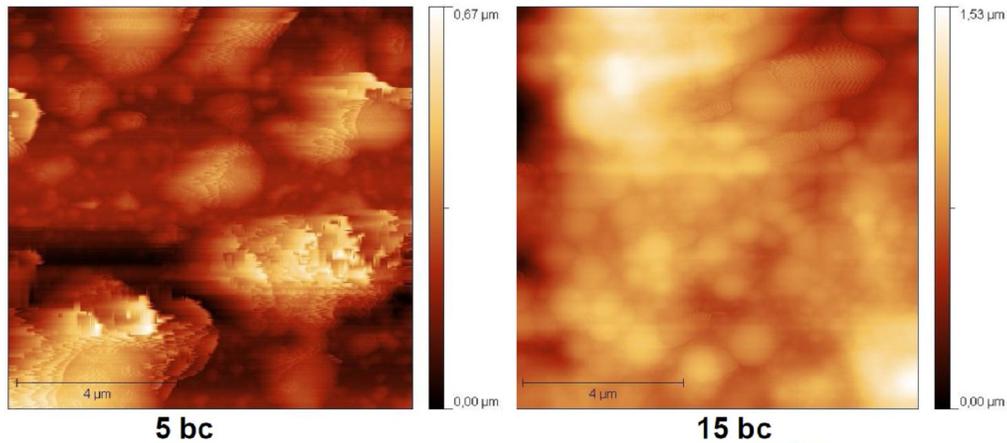


Figura 39: Imagens de AFM de filmes PEI/látex com 5 e 15 bc. Escala 4μm.

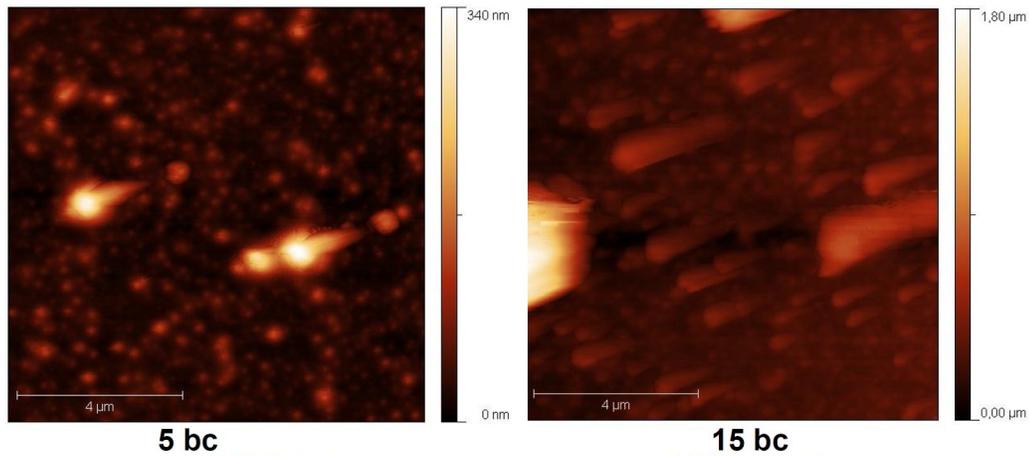


Figura 40: Imagens de AFM de filmes PEI/HA+látex com 5 e 15 bc. Escala 4μm.

A **Figura 41** ilustra que o relevo da estrutura encontrada é maior que 1.000 nm possuindo um formato arredondado. Este resultado é condizente com o tamanho das partículas de látex (1,5 a 2,5 μm) descritos na literatura por Rippel et al. [2005]. Com base nisso a estrutura em PEI/HA+látex foi identificada como uma partícula de látex natural maior que as demais. Aparentemente, a associação de HA e látex permitiu que as partículas se dispersassem melhor sobre a superfície do filme PEI/HA+látex.

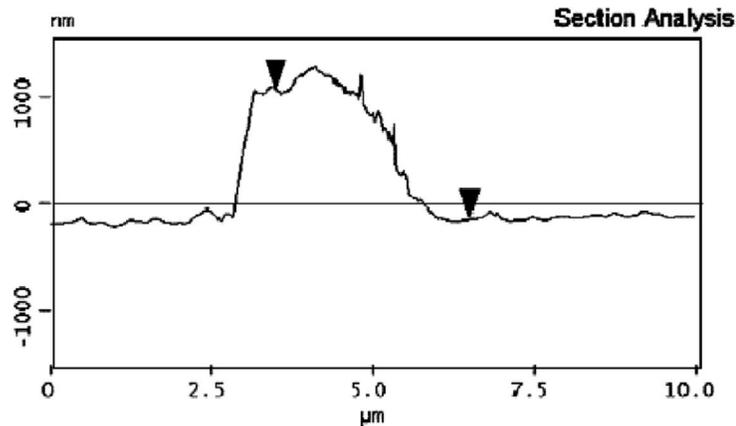


Figura 41: Análise da secção transversal de estrutura apresentada no filme PEI/HA+látex. A estrutura arredondada possui elevação superior a 1.000 nm, formada possivelmente por uma partícula de látex natural.

O filme de PAH/látex (**Figura 42**) com 5bc analisado por AFM apresentou partículas dispersas de forma arredondada com diâmetro maior de 3,5 μ m (aproximadamente) e outras menores com 1 μ m de diâmetro. A rugosidade observada para 5bc foi de 32,5 nm com altura máxima das estruturas de 221 nm. Para 15bc obtivemos Rms de 194,01 nm, com Z=1.510 nm, mas sem que contornos sejam identificados nas estruturas.

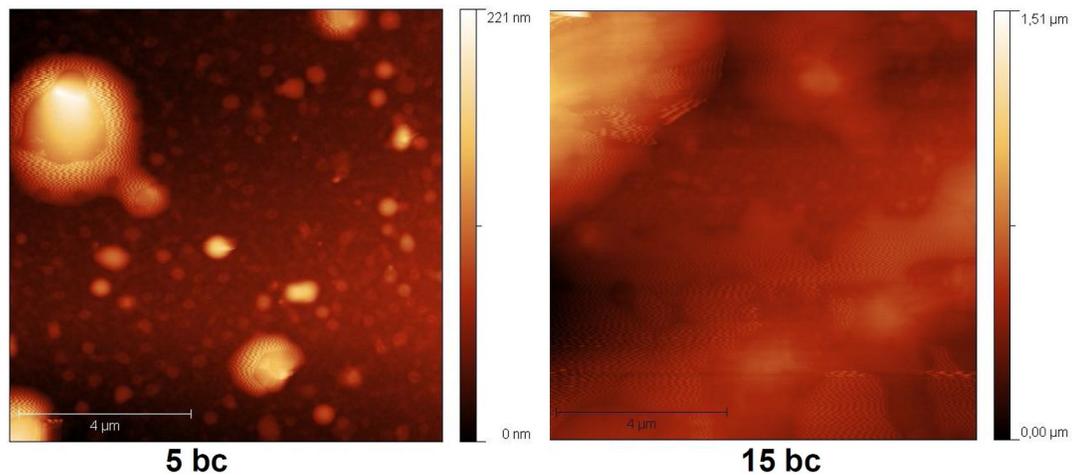


Figura 42: Imagens de AFM de filmes PAH/látex com 5 e 15 bc. Escala 4 μ m.

A **Figura 43**, por sua vez, demonstra que o sistema PAH/HA+látex apresenta estrutura com maior elevação que os filmes apenas com látex. PAH/HA+látex apresentou com 5bc rugosidades de 71,8 nm e valores máximos no eixo Z=520 nm, não apresentando contorno

nítido das estruturas. No filme com 15bc determinou-se Rms de 151,3 nm e valores máximos similares ao filme com 5bc ($Z=840$ nm). Percebe-se que houve elevação nas rugosidades quando comparamos respectivamente os filmes com 5 bc de PAH/látex e PAH/HA+látex. Esta elevação, que foi de 39,3 nm (32,5 nm em PAH/látex para 71,81 nm em PAH/HA+látex); inexistente tanto nos filmes com 15 bc, quanto nos filmes LbL idênticos automontados com PEI.

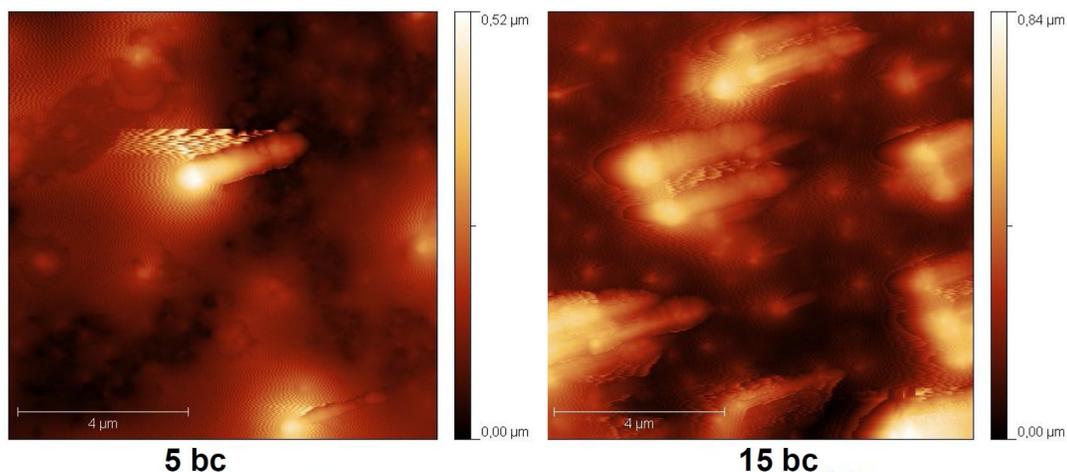


Figura 43: Imagens de AFM de filmes PAH/HA+látex com 5 e 15 bc. Escala 4μm.

7.5.3 Sistema de Heparina

Neste sistema foi analisado apenas o filme PEI/heparina sódica com 5 e 15 bicamadas (**Figura 44**) que apresentou topografia muito homogênea. Com rugosidades de 2,2 e 10,1 nm, para 5 e 15 bc, respectivamente, mantendo uma relação quase inalterada com o aumento do número de bicamadas. No entanto, observa-se que a topografia de ambos os filmes são diferentes, apesar de apresentarem rugosidades menores que o substrato de mica. O filme com 5bc com aumento $2 \mu\text{m}^2$ apresenta poucas estruturas maiores que 5 nm (no eixo Z), e com 15bc uma topografia mais globular é observada com alturas máximas de 19 nm (no eixo Z).

A topografia observada em PEI/heparina pode não se aplicar ao sistema de PEI/heparina+bFGF, que não foi analisado por AFM. Além do AFM, a maioria dos ensaios físicos não foi realizado para o filme PEI/heparina+bFGF devido ao alto valor do fator de crescimento bFGF usado, onde demos preferência para os testes biológicos. Porém Mao et

al., [2005] reportou que filmes de PEI/heparina+aFGF apresentam rugosidade de 4,5 nm em filmes com 5bc, resultado comparável com os dados de PEI/heparina obtidos neste trabalho.

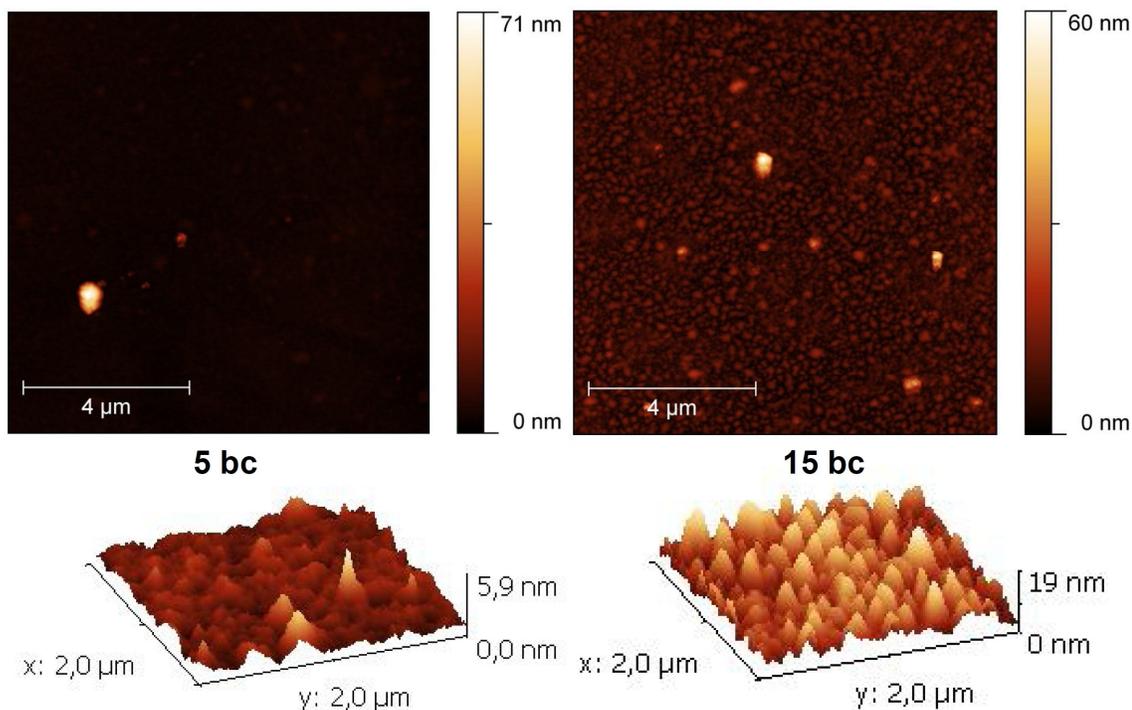


Figura 44: Imagens de AFM de filmes PEI/heparina sódica com 5 e 15 bc. Escala 4μm.

Através destas análises de AFM foi possível agrupar os filmes confeccionados em duas categorias: filmes heterogêneos e filmes homogêneos. Os *filmes heterogêneos* (**Figura 45**) constituídos de látex e HA+látex, apresentaram maior rugosidade e topografia mais irregular que as amostras *homogêneas* (**Figura 46**) dos filmes apenas com HA, proteínas do látex e heparina. Observa-se que tanto as amostras homogêneas quanto às heterogêneas têm suas rugosidades aumentadas em função do número de bicamadas. Com única exceção detectada no sistema PEI/proteína do látex já discutidas. Pelas análises de AFM conclui-se que a associação de HA aos filmes LbL de látex natural em geral reduz a rugosidade do filme confeccionado, embora esse efeito variasse nos filmes confeccionados com PEI e PAH.

Foi possível concluir que diferentes polieletrólitos resultam em topografias diferentes, o que pode influenciar diretamente em outras características. Filmes automontados com PEI apresentaram superfícies mais globulares que os filmes com PAH. Entretanto, este ensaio não

foi capaz de verificar se esta relação (rugosidade x número de bicamadas) é uniforme, para tanto seria necessário analisar mais filmes, não apenas com 5 e 15 bicamadas.

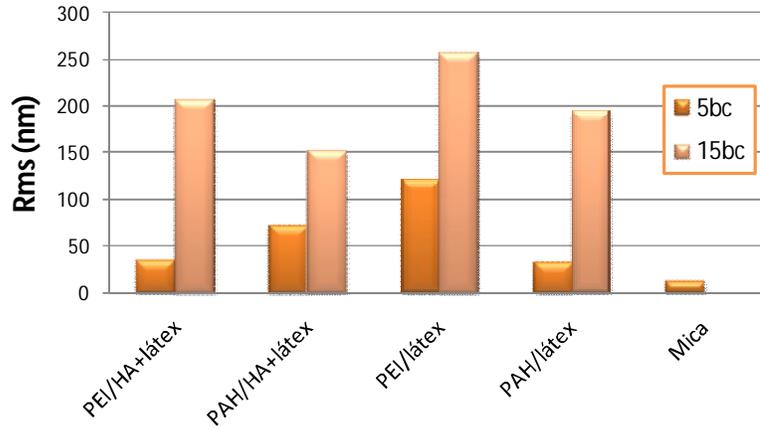


Figura 45: Comparação da rugosidade média (Rms) entre os filmes heterogêneos.

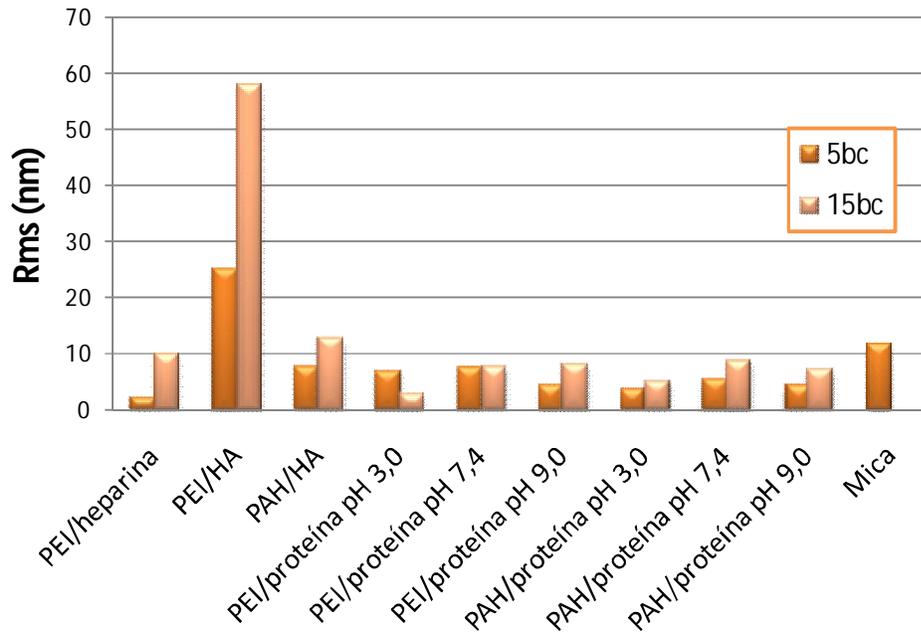


Figura 46: Comparação da rugosidade média (Rms) entre os filmes homogêneos.

7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As imagens de MEV com aumento de 3.000 vezes foram analisadas por programa computacional Image Tool (v3.0). Foram analisados filmes com 5 e 15 bc dos sistemas de proteínas do látex, látex natural e heparina.

7.6.1 Sistema de proteínas do látex

Os filmes com proteína do látex apresentaram-se homogêneos, sem muitas estruturas visíveis por MEV. Apesar do filme PEI/proteína (**Figura 47**) não apresentar nenhuma estrutura em sua topografia com 5bc, aparecem estruturas dispersas no filme com 15bc. No filme PEI/proteína com 15 bc é possível observar estruturas arredondadas com diâmetro médio de $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,10$).

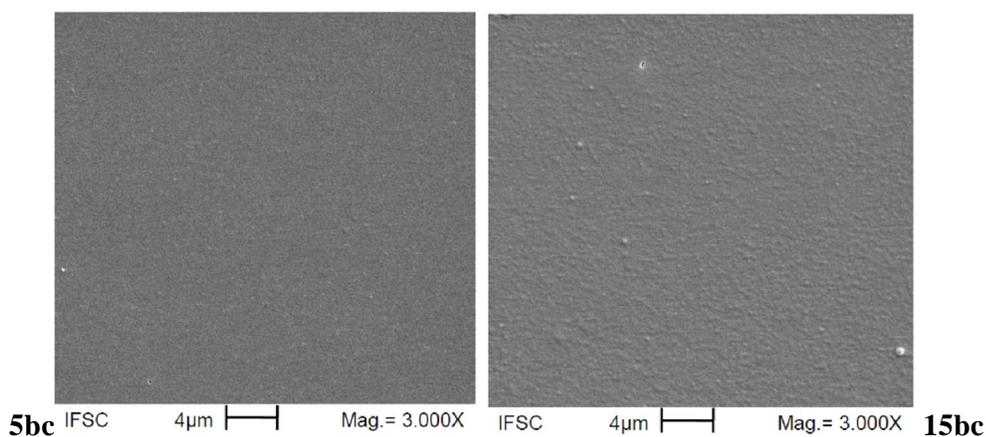


Figura 47: Imagens de PEI/proteína com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 7,5 μm .

O filme PAH/proteína (**Figura 48**) com 5bc apresentou poucas estruturas (44 unidades) arredondadas de coloração mais clara com diâmetro médio de $0,24 \pm 0,11 \mu\text{m}$. No filme com 15bc, foi possível identificar poucas estruturas ovais (31 unidades) com baixo contraste. Essas estruturas poderiam ser divididas em grandes (diâmetro médio $1,73 \pm 0,33 \mu\text{m}$) e pequenas (média $0,58 \pm 0,17 \mu\text{m}$). A constituição dessas estruturas é desconhecida.

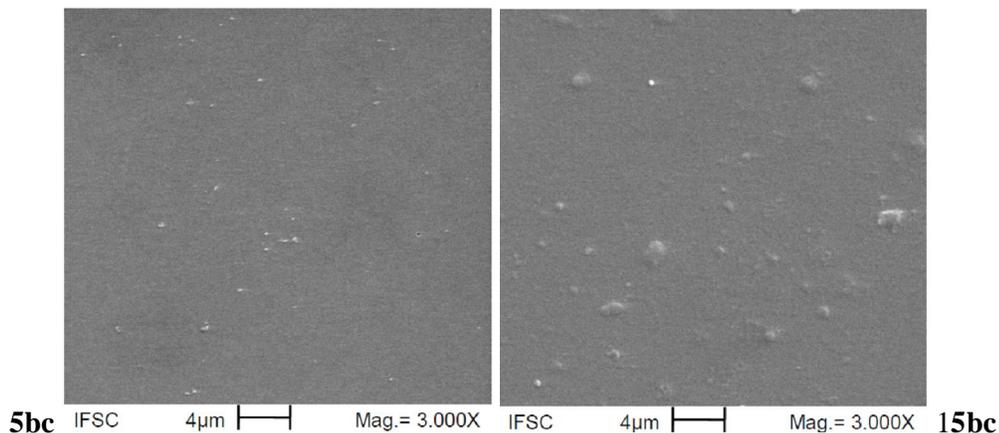


Figura 48: Imagens de PAH/proteína com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 µm.

7.6.2 Sistema de látex natural

O filme PEI/látex (**Figura 49**) com 5bc apresentou topografia heterogênea, com estruturas de tamanhos e formatos variados. Separando as estruturas em grandes e pequenas, observa-se que as estruturas menores (diâmetro médio de $0,94 \pm 0,46 \mu\text{m}$) tende a ter formato redondo ou oval, enquanto que as estruturas maiores (diâmetro médio de $5,41 \pm 2,42 \mu\text{m}$) não possuem forma definida. O filme PEI/látex com 15bc apresenta topografia em um todo rugosa, sem que se identifiquem estruturas com contorno delimitado.

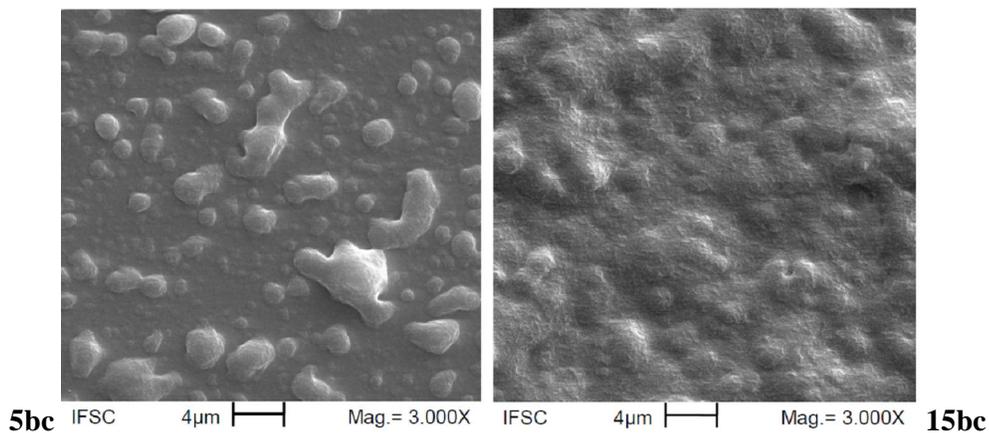


Figura 49: Imagens de PEI/látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 µm.

O filme PEI/HA+látex (**Figura 50**) com 5bc possui superfície similar ao observado no filme de PEI/látex (5bc), porém com menor quantidade de estruturas. Novamente, nesse filme

são observadas estruturas grandes e pequenas com formato mais arredondado que no filme anterior. As estruturas maiores de formas variadas com diâmetro médio de $4,70 \pm 2,21 \mu\text{m}$ e as estruturas menores com formato redondo de diâmetro médio $0,93 \pm 0,32 \mu\text{m}$. No filme PEI/HA+látex (**Figura 50**) com 15bc a topografia é similar ao filme PEI/látex com 5bc, com partículas irregulares de vários tamanhos em maior quantidade. Não foi possível determinar se as estruturas maiores (diâmetro médio de $5,53 \mu\text{m} \pm 2,90$) visíveis são formadas por partículas sobrepostas ou se fazem parte de uma única partícula. Há presença de algumas estruturas redondas menores (diâmetro médio de $0,74 \mu\text{m} \pm 0,26$), isoladas ou com contornos delimitados, situadas sobre estruturas maiores.

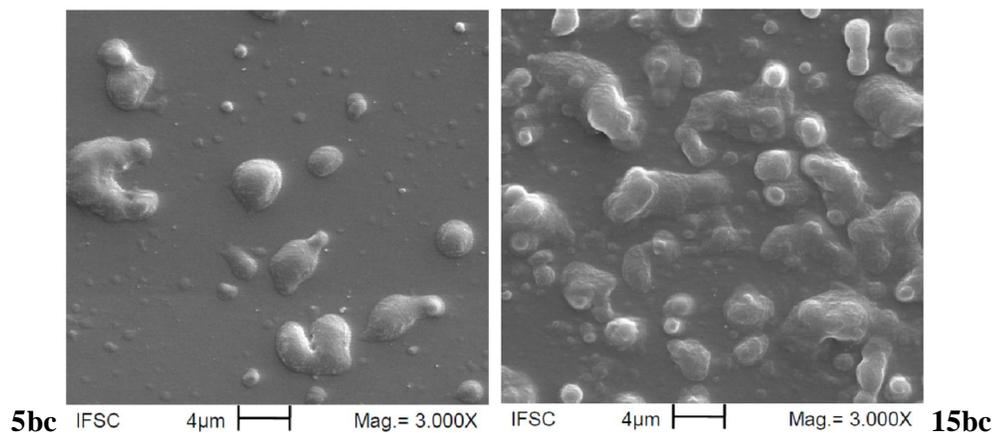


Figura 50: Imagens de PEI/HA+látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de $4 \mu\text{m}$.

As imagens para o filme PAH/látex (**Figura 51**) com 5bc são semelhantes ao filme PEI/látex; ambos possuem estruturas de vários tamanhos. Observa-se que as estruturas menores (diâmetro médio de $1,04 \pm 0,42 \mu\text{m}$) têm formato redondo ou oval, enquanto que as estruturas maiores (diâmetro médio de $5,64 \pm 1,63 \mu\text{m}$) não possuem forma definida embora algumas sejam arredondadas. Com 15bc, o filme PAH/látex apresentou superfície irregular com artefatos similares a cavidades, que estão ausentes no filme PEI/látex. Os contornos destas cavidades ou estruturas em baixo relevo têm diâmetro médio de $2,02 \pm 0,86 \mu\text{m}$.

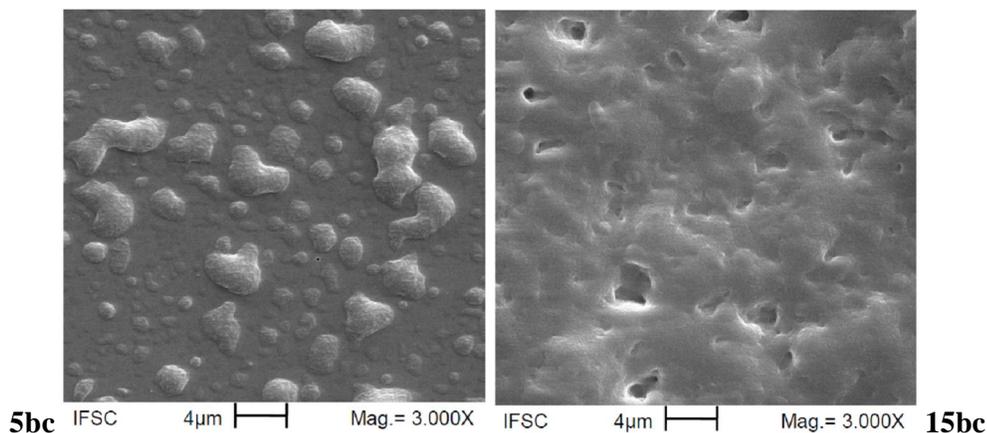


Figura 51: Imagens de PAH/látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μm.

A imagem de PAH/HA+látex (**Figura 52**) com 5bc possui poucas estruturas esféricas (34 unidades) de tamanhos variados. As estruturas maiores com diâmetro médio de $2,78 \pm 0,80$ μm e as estruturas menores com diâmetro médio de $0,72 \pm 0,17$ μm. O sistema PAH/HA+látex com 15bc assemelha-se, em topografia, aos filmes confeccionados apenas com látex, apresentando também estruturas em baixo relevo e outras com contornos identificáveis formando uma superfície irregular. Observa-se que os filmes LbL com 5bc confeccionados com HA+látex possuem estruturas em menor quantidade que os filmes com apenas com látex, cujos formatos tendem a ser mais esféricos.

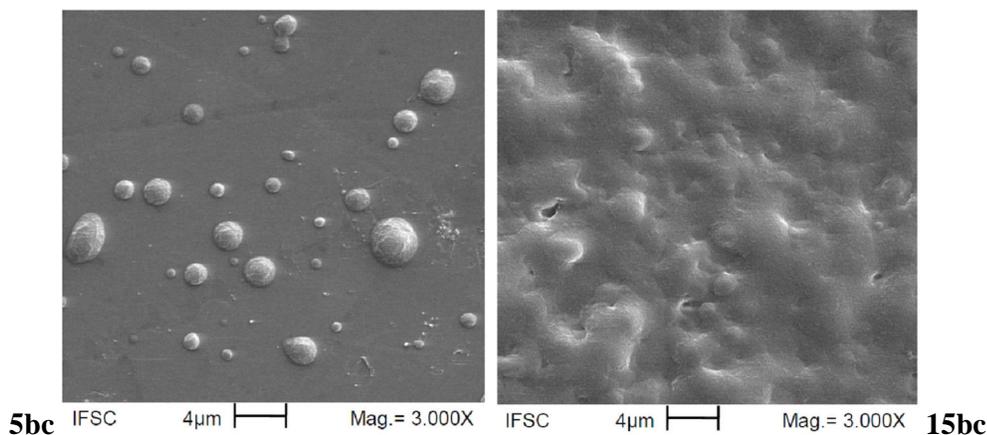


Figura 52: Imagens de PAH/HA+látex com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de 4 μm.

A imagem de PEI/HA (**Figura 53**) 5bc apresenta poucas estruturas esféricas uniformemente dispersas na superfície com diâmetro médio de $0,34\pm 0,26\ \mu\text{m}$. Com 15bc o mesmo filme apresentou poucas estruturas esféricas maiores (diâmetro médio de $0,75\pm 0,24\ \mu\text{m}$); várias estruturas pequenas (diâmetro médio de $0,23\pm 0,10\ \mu\text{m}$), além de outras estruturas de tamanho inferior a $0,1\ \mu\text{m}$.

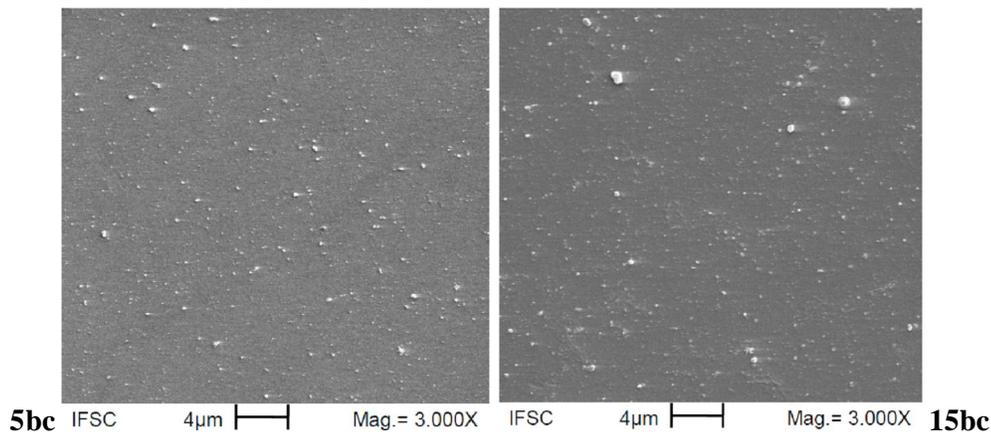


Figura 53: Imagens de PEI/HA com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escala de $4\ \mu\text{m}$.

A imagem de PAH/HA 5bc (**Figura 54**) foi repetida, pois no intuito de obtê-la com alta definição usamos feixe de elétrons muito intenso, o que provocou a destruição do filme. A repetição da análise foi realizada no mesmo aparelho utilizado nas microscopias de MEV para adesão celular (**item 8.4**). Não foi detectado nenhuma estrutura ou irregularidades na topografia deste filme com 5 bc. No entanto, a imagem do filme PAH/HA com 15bc (**Figura 54**) apresentou estruturas ovais uniformemente dispersas com diâmetro médio de $0,53\pm 0,26\ \mu\text{m}$, com quantidade maior de estruturas de diâmetro inferior a $0,1\ \mu\text{m}$.

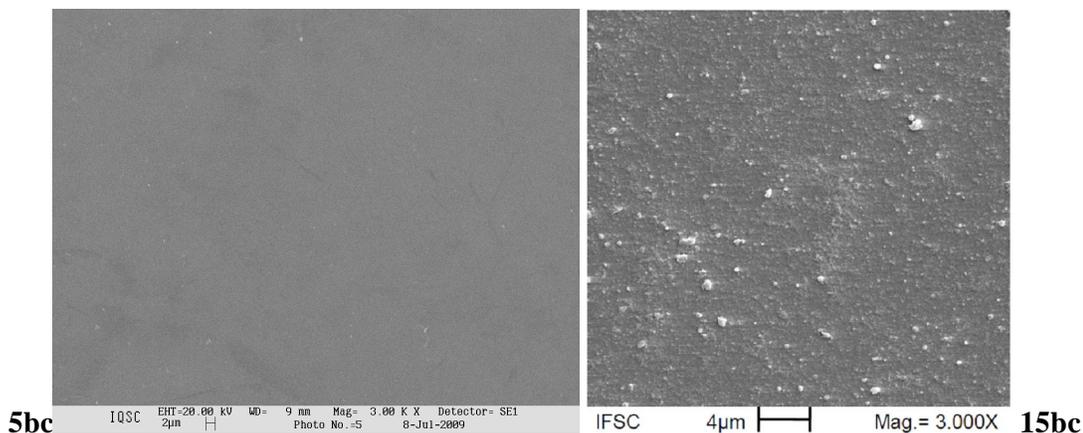


Figura 54: Imagens de PAH/HA com 5 e 15 bicamadas feitas por MEV (3000x) com escalas de 2 e 4 μm .

7.6.3 Sistema de heparina

Filmes PEI/heparina sódica com 5 e 15 bc (**Figura 55**) foram analisados pelo mesmo aparelho utilizado nas microscopias de MEV para verificar a morfologia de adesão celular (**item 8.4**). A topografia apresentada pelo filme PEI/heparina com 5 bc apresenta de poros (pontos escuros circundados por região mais clara). Porém é possível observar que esses poros estão praticamente ausentes na imagem do filme PEI/heparina com 15 bc. Ambos os filmes automontados se assemelham ao substrato de vidro limpo, sugerindo que o filme PEI/heparina não tem espessura suficiente para cobrir totalmente às irregularidades da superfície porosa de vidro com apenas 5bc. As imagens sugerem que há baixa quantidade de material agregado por bicamada de PEI/heparina. A espessura deste filme aparentemente é menor que os outros sistemas estudados, pois apresentou topografia porosa similar ao substrato. Essas observações corroboram com as baixas intensidades de absorbância obtidas no ensaio de crescimento do filme (**Figura 20**).

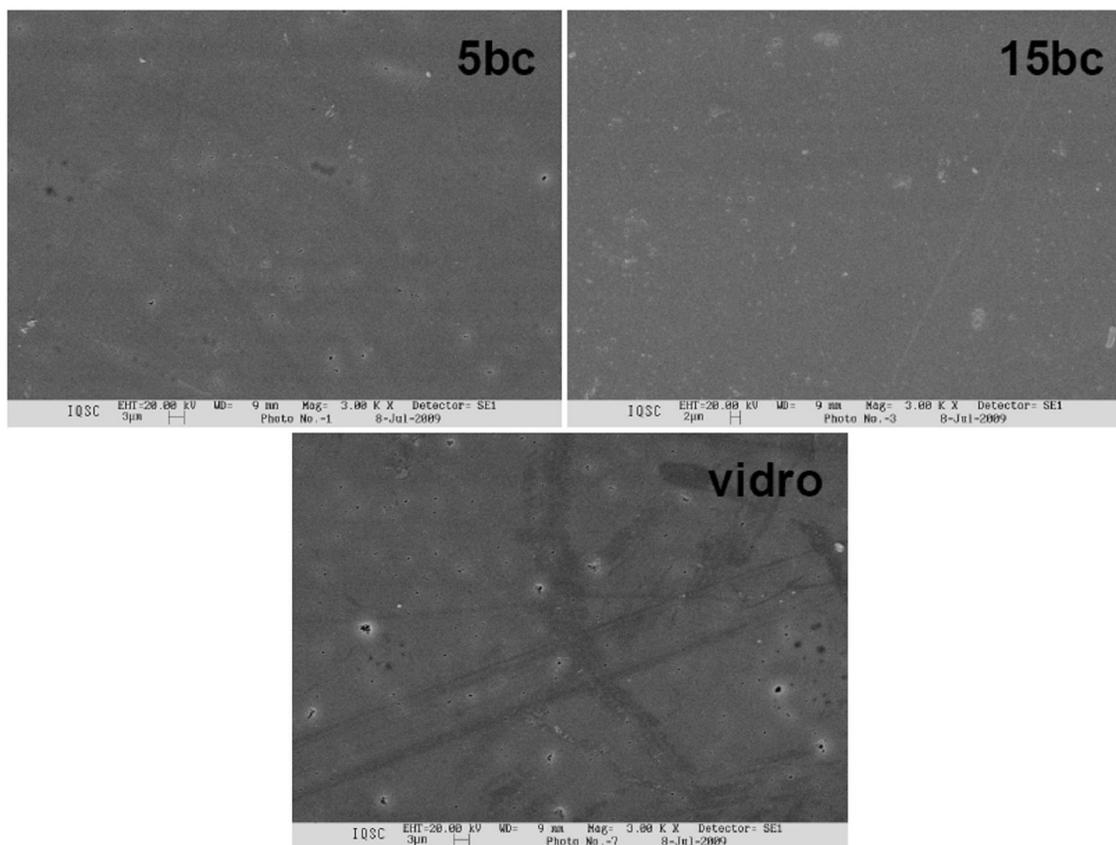


Figura 55: Imagens de PEI/Heparina com 5 e 15 bicamadas e substrato de vidro limpo feitas por MEV (3.000x, escala de 3 e 2µm).

Novamente, a exemplo do observado na análise realizada por AFM, os filmes estudados puderam ser agrupados em duas categorias: *filmes heterogêneos* e *filmes homogêneos*. Os filmes heterogêneos (filmes com látex e HA+látex) apresentaram topografia muito irregular sendo mais bem definidos por MEV do que por AFM devido ao tamanho das estruturas apresentadas. Observou-se que todos os filmes confeccionados com látex natural tornaram-se mais rugosos com o aumento no número de camadas, conforme havia sido evidenciado pelas análises por AFM. A aparência dos filmes confeccionados com PEI e PAH possui diferenças conforme observado na análise de AFM. Porém, apenas por MEV foi possível observar a presença de cavidades nos filmes de PAH/látex (**Figura 51**). A formação de poros é prevista em simulação computacional de filmes LbL com várias camadas de partículas esféricas [Adamczyk et al., 2007; 2008]. Os poros surgiriam com a formação de clusters e/ou distanciamentos das partículas depositadas [Adamczyk et al., 2007; 2008].

Todavia, ao se agregar partículas sólidas em filme LbL, esta provocaria irregularidades na superfície (**Figura 56**) dependendo da relação entre o tamanho da partícula

e a espessura da camada de polieletrólito [Sangrribsub et al., 2005]. Camadas mais finas de polieletrólitos apresentariam menor deformação e, portanto, menor conformação às partículas do que camadas mais espessas. A conformação do filme ocorre tanto nas camadas acima quanto abaixo da partícula [Volodkin et al., 2008], efeito que reduz as irregularidades, sendo muito importante para manter vesículas lipídicas íntegras em filmes LbL [Volodkin et al., 2007; 2008]. Filmes com baixa conformação, ou com partículas muito grandes, gerariam muitas irregularidades na superfície. Este efeito parece ocorrer nos filmes de látex propostos devido à semelhança apresentada entre a análise da secção transversal do filme PEI/HA+látex (**Figura 41**) e o esquema da **Figura 56**.

Especula-se se as estruturas menores observadas nos filmes PEI/látex, PAH/látex, PEI/HA+látex e PAH/HA+látex não seriam partículas de látex incorporadas mais profundamente no filme LbL, ou simplesmente partículas menores. Isso poderia ser avaliado com imagens da secção transversal do filme, análise que não está entre os objetivos deste trabalho, ou ainda comparando a espessura dos filmes com o tamanho das partículas. Tentativas foram feitas para verificar a espessura dos filmes por perfilometria, porém, os resultados se revelaram inconclusivos e foram omitidos desta dissertação.

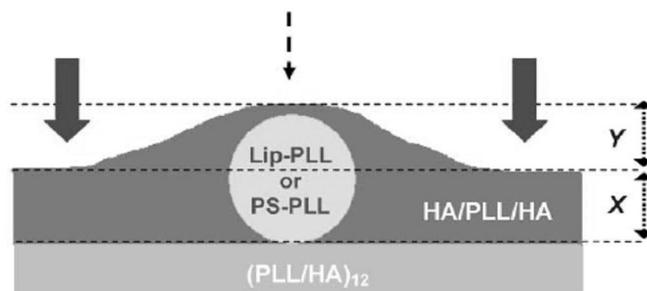


Figura 56: Representação de filme LbL multicamadas com uma partícula (lipídica ou polimérica) incorporada. X representa a espessura do filme e Y representa o aumento local da espessura sobre a partícula. Segundo os dados de Volodkin et al., a conformação ocorre tanto no filme acima quanto abaixo da partícula. Fonte: Volodkin et al., 2008.

7.7 Medidas de ângulo de contato

Os resultados de ângulo de contato estão agrupados de acordo com o sistema estudado. Nas figuras a seguir, as camadas ímpares representam filmes cuja superfície mais externa era formada pelos policátions (PEI e PAH) e, portanto, estavam positivamente carregadas. As camadas pares representam filmes com superfície formada pelos poliânions (látex, HA, HA+látex ou proteína), negativamente carregados. Comparando os ângulos medidos na camada inicial e final, verifica-se que todos os filmes LbL confeccionados elevam seus ângulos de contato, resultando em menor molhabilidade da superfície.

7.7.1 Sistema de proteínas do látex

A **Figura 57** apresenta os ângulos de contato medidos camada a camada nos filmes de PEI/proteína e PAH/proteína. Ângulos de contato de PEI/proteína aumentaram 8° entre o ângulo inicialmente medido de $59,6^\circ$ na primeira camada e o final de $67,8^\circ$ na nona camada. Filmes de PAH/proteína também apresentaram elevação de 15° entre os ângulos iniciais e finais (de $59,4^\circ$ para $74,3^\circ$). Observa-se que os ângulos de contato variaram nas amostras de maneira similar entre a terceira e sétima camadas usado PEI ou PAH. Entretanto as quatro camadas finais do filme PAH/proteína apresentaram aumento contínuo em seus ângulos, algo não observado no filme PEI/proteína. Apesar dessas diferenças os filmes do sistema de proteínas do látex apresentam em 9 camadas molhabilidades próximas, mantendo a superfície hidrofílica durante este ensaio.

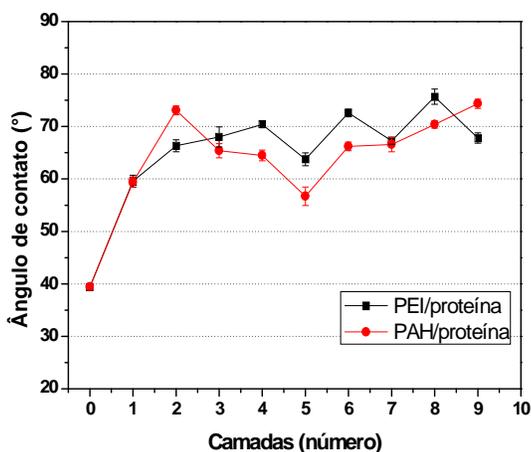


Figura 57: Ângulos de contato medidos camada a camada para os sistemas de PEI/proteína e PAH/proteína.

7.7.2 Sistema do látex natural

A **Figura 58** apresenta os ângulos de contato camada a camada, dos filmes de PEI/HA, PEI/látex, PEI/HA+látex (gráfico da esquerda), PAH/HA, PAH/látex e PAH/HA+látex (gráfico da direita). Em ambos os filmes, confeccionados com PEI e PAH, observa-se o mesmo comportamento: ângulos maiores nos sistemas com látex natural, seguido dos filmes com HA+látex e os menores ângulos com HA apenas.

Nos filmes de PEI/látex a elevação dos ângulos foi mais pronunciada que nos filmes de proteínas já visto com ângulo inicial de $59,6^\circ$ e final de $76,3^\circ$ (elevação de 28°). Os filmes de PAH/látex tiveram elevação de 29° (inicial $59,4^\circ$ e final $88,8^\circ$). Observou-se nos filmes PEI/HA+látex elevação de 18° (inicial $59,6^\circ$ e final $76,3^\circ$) e nos filmes PAH/HA+látex um aumento de 15° (de $59,4^\circ$ para $74,6^\circ$).

Todos esses filmes apresentaram elevação idêntica nos ângulos de contato para os sistemas automontados com PEI e PAH. Entretanto os filmes PEI/HA e PAH/HA apresentaram diferenças maiores. Filmes PEI/HA mostraram elevação de 1° (inicial $59,6^\circ$ e final $60,5^\circ$) no ângulo de contato, enquanto que os filmes PAH/HA elevaram os ângulos em 16° (inicial $59,4^\circ$ e final $75,9^\circ$).

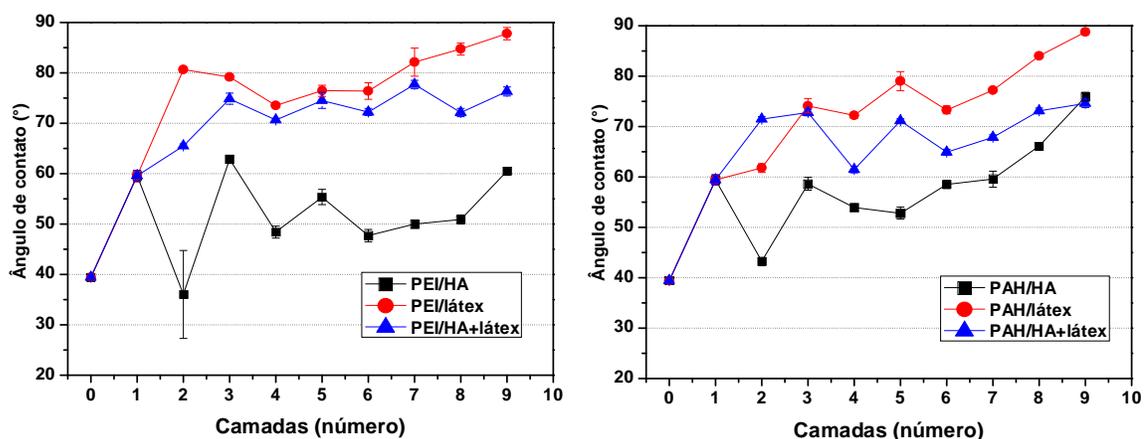


Figura 58: Ângulos de contato medidos camada a camada para os sistemas de PEI/HA, PEI/látex, PEI/HA+látex, PAH/HA, PAH/látex e PAH/HA+látex. Camadas ímpares continham na superfície polieletrólitos positivos (PEI, PAH) e as camadas pares polieletrólitos negativos (látex, HA, HA+látex).

É notória a influência da rugosidade da superfície nos ângulos de contato, pois o ar pode ficar preso nas irregularidades da superfície ocasionando um molhamento heterogêneo [Hikita et al., 2005; Marmur, 2004]. Entretanto, análises de microscopia (AFM) acusam maiores rugosidades no filme PEI/HA (25,11 nm para 5bc e 58,29 nm para 15bc) que o filme

PAH/HA (7,69 nm para 5bc e 12,83 nm para 15bc), sendo contraditórios os resultados de ângulo de contato. Não sabemos o motivo para a diferença de 14° na elevação dos ângulos entre PAH/HA e PEI/HA.

Como uma superfície é considerada hidrofóbica quando formar ângulo de contato superior a 90°, e hidrofílica com ângulos inferiores a 90° [de Gennes et al., 2004], todos os filmes ensaiados são hidrofílicos. Todos os filmes, mesmo os com maiores ângulos como PEI/látex (87,8°) e PAH/látex (89,8°), quanto os filmes de menores ângulos, como PEI/proteína (67,8°) e PAH/proteína (74,3°), possuem superfícies hidrofílicas por definição. A hidroflicidade das superfícies foi detectada até a 9ª camada automontada, mas como todos os sistemas apresentam tendência a elevar os ângulos de acordo com o número de camadas, é plausível supor que os filmes podem tornar-se hidrofóbicos quanto mais camadas forem automontadas.

7.7.3 Sistema de heparina

Ângulos de contato dos filmes de PEI/heparina estão dispostas na **Figura 59A** onde se observa um comportamento mais uniforme que os filmes anteriores. Todas as camadas positivas e ímpares elevam o ângulo de contato, enquanto que todas as camadas negativas e pares reduzem o ângulo de contato. O mesmo comportamento, com ângulos similares foram descritos por Mao [2005] para filmes de PEI/Heparina+aFGF. Isso sugere que a associação de fatores de crescimento ao filme de PEI/heparina não altera de maneira significativa a molhabilidade da superfície.

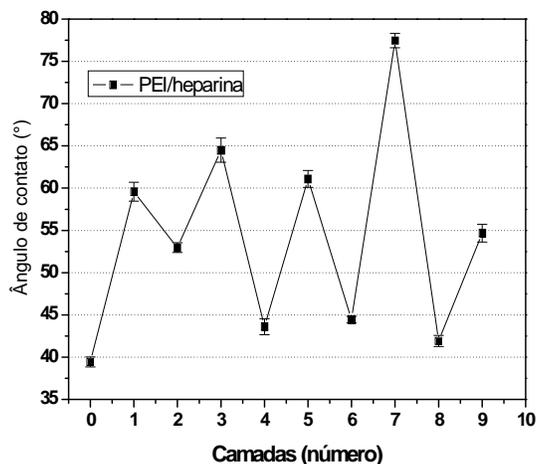


Figura 59: Ângulo de contato medido camada a camada em filmes de PEI/Heparina. Camadas ímpares têm na camada mais externa PEI, e camadas pares Heparina.

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

8.1 Caracterização das proteínas do látex por Eletroforese

Foi realizada eletroforese da fração protéica (ou apenas proteínas) de látex em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em 5 colunas de proteínas e após o processo de descoloração, e secagem do gel, obteve-se a estrutura observada na **Figura 60**. Observa-se na coluna do padrão, as bandas referentes às proteínas com massa de 14,4; 20,0; 30,0; 45,0 e 66,0 kDa (kilodaltons – 1 kDa = 1000 unidade de massa atômica). As colunas A e C apresentam proteína do látex desnaturadas com quantidades iniciais de 100 e 50 µg, respectivamente. As colunas B e D apresentam proteína do látex *in natura* com quantidades iniciais de 100 e 50 µg, respectivamente.

Observou-se a presença das mesmas bandas em todas as amostras analisadas, *in natura* e desnaturadas, porém a visualização das bandas foi melhor nas alíquotas menores de proteína por apresentarem bandas mais separadas e nítidas. Este ensaio comprova que as proteínas extraídas do látex possuem tamanhos moleculares de 14 a 50 kDa, aproximadamente, não sendo constituídas de apenas uma proteína.

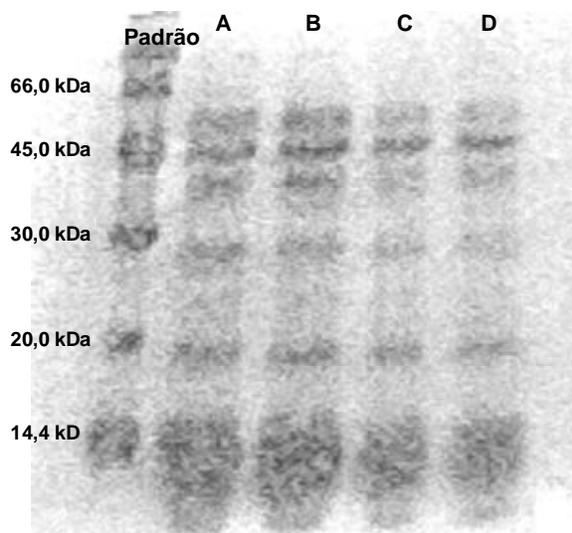


Figura 60: Eletroforese das proteínas do látex em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) indicando a presença de bandas em 14,4 kD, 20kD, 30kD e 45kD.

8.2 Curva de crescimento celular

Os filmes propostos foram automontados até 5 bicamadas sobre placas de cultura de TCPS. Foram semeados fibroblastos humanos normais (FHN) sobre os filmes que foram mantidos em cultura por período de 7, 14 e 21 dias. Depois deste período as células foram submetidas ao tratamento com MTT, que gerou cristais de formazana nas mitocôndrias das FHN viáveis. Após a dissolução dos cristais, sua absorbância foi detectada em Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) a 570 nm. A relação entre a absorbância obtida e o número de FHN viáveis foi dada pela equação da reta obtida na curva de calibração (**Figura 61**). As médias de absorbância obtidas em cada filme LbL, descontando as intensidades de suas respectivas amostras negativas, foram usadas para calcular a quantidade de FHN nas amostras. Para obter as estatísticas dos resultados frente ao controle, foi aplicado o teste T-Student, bicaudal, com significância $p < 0,05$ utilizando programa computacional Prism (v.4.0). O p-valor é a probabilidade de cometer erro assumindo como verdadeiros dados de uma amostra específica. Se o p-valor for menor que o nível de significância escolhido (no caso, $p < 0,05$ ou 95%) aceitamos o dado como verdadeiro, caso contrário o dado é rejeitado. Além do tratamento estatístico dos dados, imagens de microscopia óptica (Microscópio invertido Nikon Eclipse TS100) foram feitas dos FHN antes de cada tratamento de MTT, permitindo inspecionar a morfologia celular.

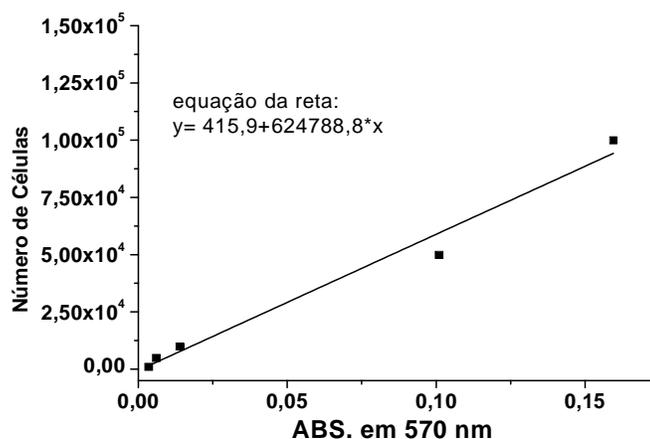


Figura 61: Curva de calibração com a concentração conhecida de FHN. A equação de reta também está representada.

Novamente, para facilitar a apresentação e discussão dos resultados, as amostras serão separadas nos sistemas de proteínas do látex, látex natural, heparina e *castings* das soluções. Entretanto, devido à quantidade de dados, os resultados do sistema de látex natural serão subdivididos em filmes com PEI e PAH.

8.2.1 Sistema de proteínas do látex

Foram confeccionados filmes de proteína do látex no estado *in natura* e desnaturado usando PEI e PAH como polication. As médias das absorvâncias e a significância dos resultados em relação ao controle são ilustradas na **Tabela 6**. A **Figura 62** indica as quantidades de FHN detectados nas amostras em 7, 14 e 21 dias de ensaio, identificando o nível de significância (menor = *; maior = ***) dos resultados frente ao controle. Ambos os filmes PEI/proteína e PAH/proteína do látex não apresentaram quantidades apreciáveis de FHN durante todo o período de ensaio. Observa-se inclusive que os resultados dos filmes com a proteína do látex *in natura* foram inferiores aos filmes desnaturados, tanto no sistema com PEI quanto no PAH, apesar dos filmes com PAH apresentarem maiores quantidades de FHN que os filmes com PEI durante todos os 21 dias de ensaio.

Tabela 6: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de proteínas do látex

Amostras	7 Dias			14 dias			21 dias		
	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.
Controle	0,101	0,003		0,172	0,005		0,101	0,002	
PEI/prot in	0,001	0,005	P<0,05	0,0003	0,004	P<0,05	0,0001	0,003	P<0,05
PEI/prot des	0,009	0,002	P<0,05	0,015	0,003	P<0,05	0,009	0	P<0,05
PAH/prot in	0,003	0,003	P<0,05	0,003	0,003	P<0,05	0,008	0,001	P<0,05
PAH/prot des	0,013	0,003	P<0,05	0,02	0,008	P<0,05	0,022	0,003	P<0,05

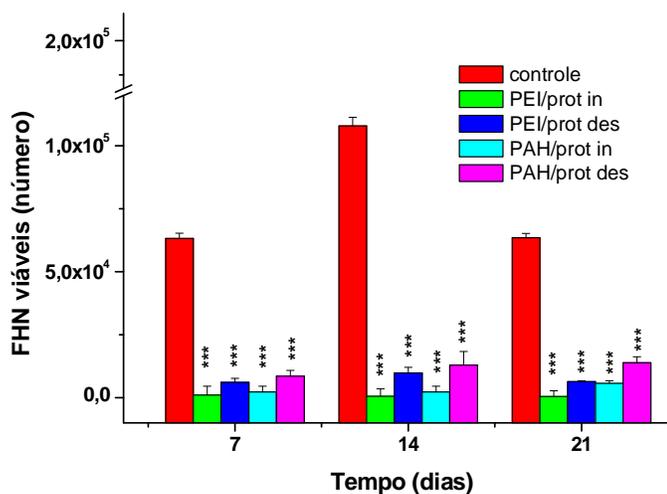


Figura 62: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de proteína do látex *in natura* (in) e desnaturado (des).

A **Figura 63** ilustra as observações descritas acima, onde se percebe que os filmes de proteína do látex *in natura* apresentaram menor quantidade de células que os filmes desnaturados. As imagens de PEI/proteína *in natura* mostraram apenas células mortas, no entanto, nos filmes com proteínas desnaturadas houve células apenas em 14 dias, mesmo assim apresentavam morfologia atípica. Nos filmes PAH/proteína *in natura* observou-se poucas células com morfologia normal em 7 e 14 dias, e anômalas em 21 dias. Nos mesmos filmes com proteínas desnaturadas observou-se maior quantidade de FHN com morfologia anômala em 7 e 21 dias.

Pelas imagens dos FHN no controle (**Figura 63**) constata-se a morfologia normal destas células, pois os fibroblastos necessitam se fixar no substrato para desenvolverem-se. Isso é visualmente identificado pelo alongamento da célula, que tente a se alinhar com os demais fibroblastos, formando uma camada confluenta. Nenhuma amostra apresentou características similares ao controle. Os filmes PEI/proteína e PAH/proteína desnaturada apresentaram uma quantidade de FHN maior no 14º dia, porém, essas células apresentam alongamentos em várias direções sem que realmente houvesse uma ordem. Esse crescimento anômalo foi mais pronunciado nos filmes com PEI que com PAH. O filme de PAH/proteína *in natura* foi o único sistema que apresentou, apesar de pouco, células com morfologia típica.

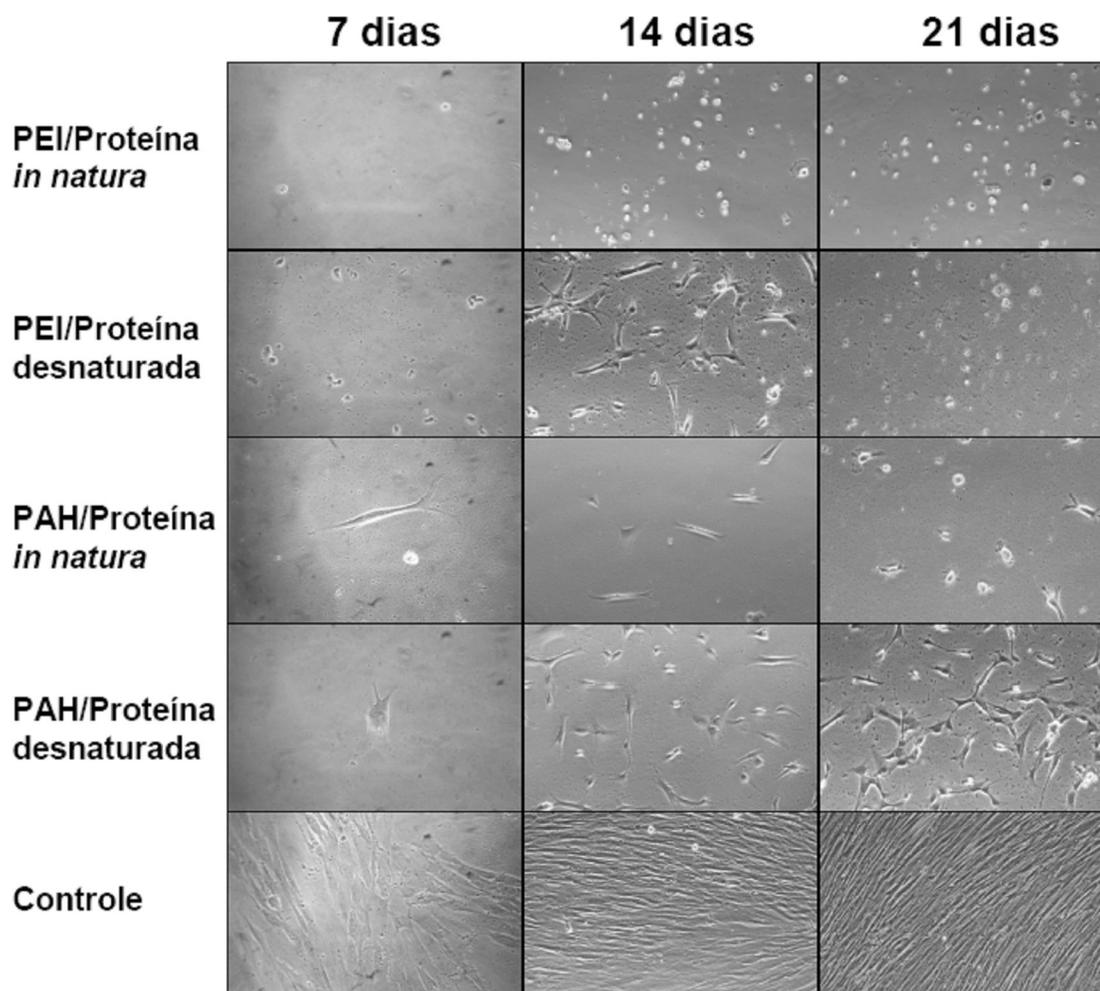


Figura 63: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de proteínas do látex confeccionados com PEI e PAH.

Esses resultados são o oposto do inicialmente esperado, pois acreditava-se que as proteínas do látex natural auxiliariam na proliferação celular. As imagens de microscopia podem ajudar a esclarecer o motivo desta toxicidade inesperada que foi mais profundamente avaliada nas análises de morfologia de adesão celular por MEV (**item 8.4**). Entretanto, pelas imagens das culturas apenas se confirmou a baixa atividade biológica quantitativamente observada. A alta confiabilidade dos resultados de MTT ($p < 0,05$) permite concluir que os filmes estudados de proteína do látex não permitem o desenvolvimento adequado de fibroblastos. Esta suposição foi comprovada em novo ensaio de MTT que avaliou a ação apenas das proteínas do látex em diferentes concentrações, cujos resultados encontram-se dispostos no **item 8.3**.

8.2.2 Sistema de látex natural

Foram confeccionados filmes de PEI/HA, PEI/HA+látex, PEI/látex, PAH/HA, PAH/HA+látex e PAH/látex com 5 bicamadas sobre TCPS. Os resultados serão discutidos em separado para os filmes com (i) PEI e (ii) PAH, para facilitar a discussão.

(i) Filmes do sistema de látex com PEI.

As médias das absorbâncias e a significância dos resultados em relação ao controle são apresentadas na **Tabela 7**. A **Figura 64** ilustra as quantidades de FHN detectados nas amostras em 7, 14 e 21 dias de ensaio, identificando também o nível de significância (menor = *; maior = *** dentre os dados com $p < 0,05$) dos resultados frente ao controle. Observa-se que os filmes do sistema de látex com PEI não elevaram a quantidade de FHN aos 7 dias de teste. Entretanto, nos demais dias do ensaio, com exceção do filme PEI/látex, os filmes promoveram proliferação celular acima do observado no controle.

O filme de PEI/HA apresentou no 7º dia de ensaio quantidade de FHN menor que o controle (redução de 38,8%). Ao 14º e 21º dias de teste o filme PEI/HA demonstrou índices de proliferação celular superiores ao controle, com aumento de 34,0 e 125,4%, respectivamente. Esses resultados sugerem que inicialmente os FHN tiveram dificuldade de proliferar, mas que após um período de adaptação, a cultura desenvolveu-se bem. Observam-se pelas imagens de microscopia óptica (**Figura 65**) que os FHN cultivados sobre filme PEI/HA apresentaram não apenas quantidades equiparáveis ao controle, mas também morfologia normal.

Tabela 7: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de látex, HA e HA+látex com PEI.

Filmes	7 Dias			14 dias			21 dias		
	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.
PEI/HA	0,061	0,005	P<0,05	0,231	0,018	P<0,05	0,229	0,018	P<0,05
PEI/HA+látex	0,055	0,003	P<0,05	0,212	0,007	P<0,05	0,127	0,008	P<0,05
PEI/látex	0,032	0,004	P<0,05	0,033	0,001	P<0,05	0,038	0,004	P<0,05
Controle	0,101	0,003		0,172	0,005		0,101	0,002	

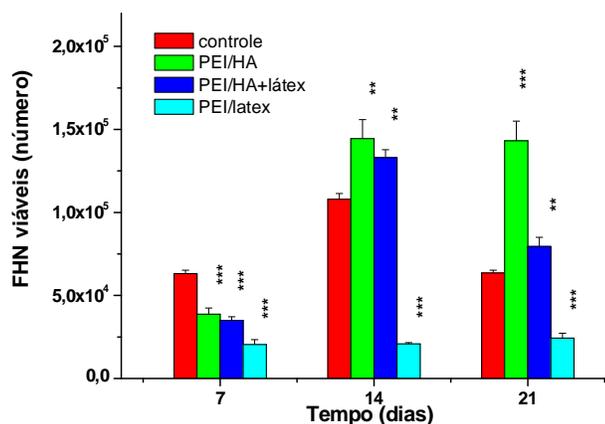


Figura 64: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de PEI/HA, PEI/HA+látex e PEI/látex.

O sistema PEI/HA+látex a exemplo do filme anterior apresentou queda inicial na proliferação celular (-44,7% do controle) verificado ao 7^o dia, e uma elevação de 23,4 e 25,2% no número de FHN, respectivamente para 14 e 21 dias de ensaio. Esses resultados foram inferiores aos filmes com apenas HA na sua constituição. Os fibroblastos cultivados sobre o filme PEI/HA+látex (**Figura 65**) aderiram sobre a superfície, mas o alongamento das células e o seu crescimento não apresentaram características típicas. Não foi identificada na cultura uma ordenação no crescimento das células e as mesmas emitiram prolongamentos em várias direções e não em um sentido preferencial.

Comparando a proliferação celular obtida sobre os filmes de PEI/látex com o controle, observa-se que este filme reduz a quantidade de células em -67,7% no 7^o dia, -80,7% no 14^o dia, permanecendo com valores 61,7% menores que o controle no 21^o dia. Os baixos índices de proliferação celular são facilmente identificados nas imagens de microscopia óptica (**Figura 65**). Os filmes de PEI/látex apresentaram fibroblastos com morfologia normal em 7 dias, mas esse resultado promissor não se manteve, e observa-se apenas células redondas, sem prolongamentos no 14^o dia de cultura. No 21^o dia observa-se uma maior quantidade de células sobre o filme de PEI/látex, mas os fibroblastos apresentam o mesmo comportamento anômalo visto nas células cultivadas sobre o filme de PEI/HA+látex.

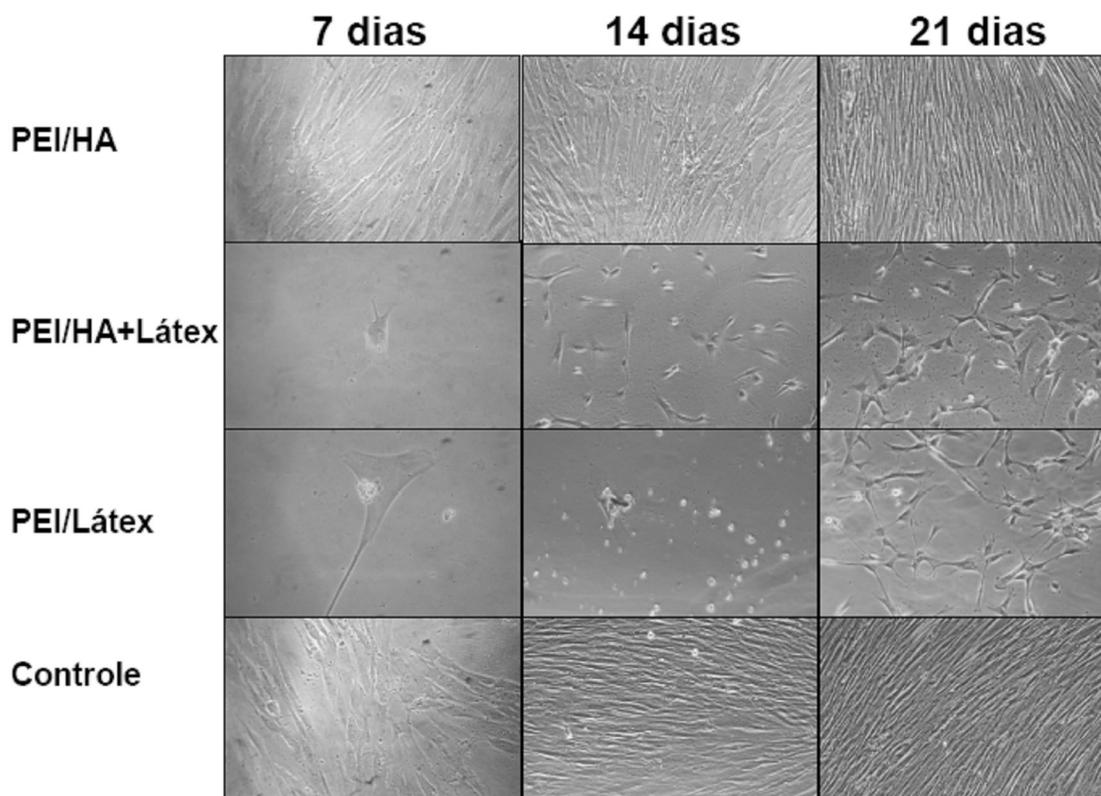


Figura 65: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de látex confeccionados com PEI.

(ii) *Filmes do sistema de látex com PAH.*

As médias das absorvâncias e a significância dos resultados em relação ao controle são apresentadas na **Tabela 8**. A **Figura 66** ilustra mostra as quantidades de FHN detectadas nas amostras em 7, 14 e 21 dias de ensaio, identificando o nível de significância (menor = *; maior = ***) dos resultados frente ao controle. Observa-se que os filmes com PAH apresentaram melhor bioatividade que os filmes com PEI nos 7 primeiros dias, pois promoveram proliferação celular acima do observado no controle. Entretanto, os resultados decaem com o passar dos dias, e apenas um filme manteve proliferação celular superior ao controle em 21 dias de ensaio.

Tabela 8: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes de látex, HA e HA+látex com PAH.

Filmes	7 Dias			14 dias			21 dias		
	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.
PAH/HA	0,154	0,012	P<0,05	0,168	0,016	Não tem	0,052	0,023	P<0,05
PAH/HA+látex	0,207	0,013	P<0,05	0,231	0,028	P<0,05	0,054	0,006	P<0,05
PAH/látex	0,245	0,011	P<0,05	0,297	0,031	P<0,05	0,144	0,017	P<0,05
Controle	0,101	0,003		0,172	0,005		0,101	0,002	

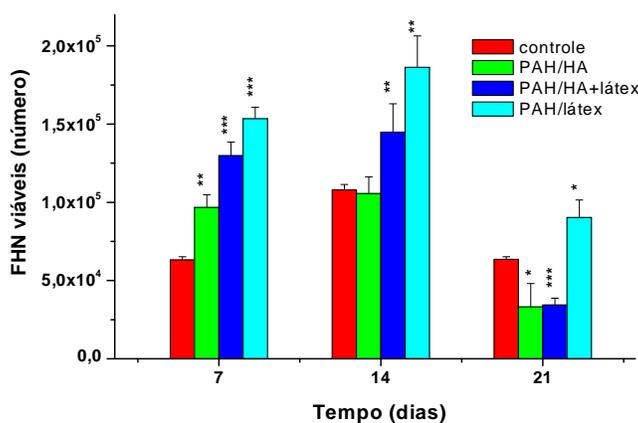


Figura 66: Resultado do ensaio de MTT para os filmes de PAH/HA, PAH/HA+látex e PAH/látex.

Filmes PAH/HA apresentaram no 7º dia de ensaio quantidade de células 53,1% maior que o controle. Nos outros dias observou-se que PAH/HA não contribuiu para a proliferação dos FHN, apresentando dados não significativos em 14 dias e redução de 47,8% na quantidade de células no 21º dia de teste. Por esses dados observa-se que o ácido húmico influencia na proliferação dos FHN por curto período, acelerando a morte celular em 14 dias, sendo a possível causa da toxicidade observada nos filmes PAH/HA+látex. É importante ressaltar que este resultado foi inverso dos filmes com PEI/HA, que apresentaram baixa proliferação inicial com altos índices em 14 e 21 dias.

O sistema de PAH/HA+látex mostra no 7º dia valores 105,4% mais elevados que o controle. Observa-se que o uso da solução de HA+látex (1:1, v/v) resultou em metade da proliferação celular dos filmes com apenas látex. No 14º dia de ensaio este sistema apresentou resultado modesto, com 34,2% mais FHN que o controle, índices idênticos ao PAH/látex no último dia. Ao 21º dia, o filme PAH/HA+látex apresentou uma queda de -46,0% em comparação com o controle, sugerindo uma possível toxicidade em longo prazo.

Verifica-se que os filmes PAH/látex mantiveram maior número de células que os outros sistemas durante todo o período de ensaio. No 7º dia apresentou 142,9% mais células que o controle. Com 14 dias de teste o filme PAH/látex apresentou uma diminuição na quantidade de FHN, permanecendo 72,6% superior ao controle. Ao 21º dia de ensaio esta amostra manteve 42,3% mais FHN que o controle. Este resultado sugere que este filme LbL com látex é promissor como biomaterial, podendo influenciar positivamente na proliferação de FHN por períodos de 3 semanas.

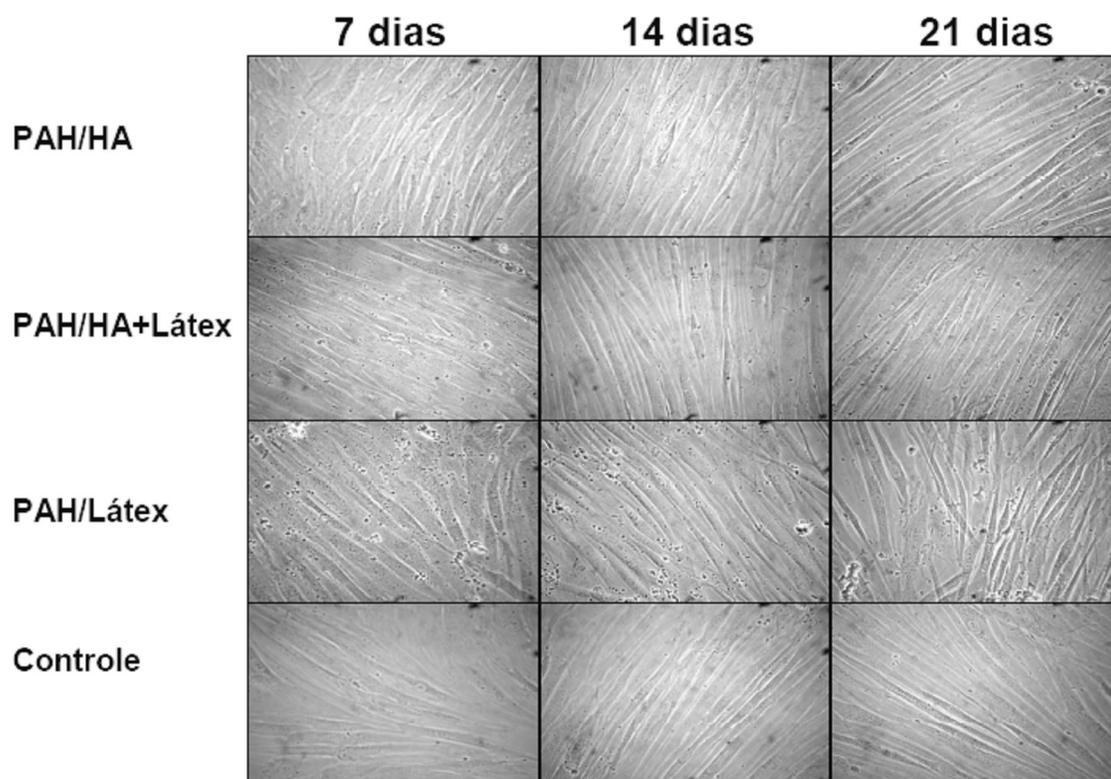


Figura 67: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes do sistema de látex confeccionados com PAH.

As imagens de microscopia óptica dos filmes do sistema de látex natural com PAH (**Figura 67**) apresentam FHN com morfologia típica durante todos os dias de ensaio. Na **Figura 67** se observa fibroblastos alongados em direção única e com crescimento orientado. Entretanto, foi possível observar grumos nas imagens de PAH/látex, aglomerados provavelmente provocados por partículas de látex ou aglomerados destas.

8.2.3 Sistema de heparina

Filmes de PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF foram automontados com 5bc sobre placas de TCPS. Diferentemente dos demais sistemas, os *castings* de heparina e heparina+bFGF foram feitos permitindo que as soluções ficassem 30 minutos em contato com a placa de TCPS. As médias das absorbâncias detectadas nos filmes e *castings* do sistema de heparina, seguido do índice de significância dos resultados em relação ao controle, são apresentadas na **Tabela 9**. A **Figura 68** ilustra as quantidades de FHN detectadas nas amostras em 7, 14 e 21 dias de ensaio com o nível de significância (menor = *; maior = ***) também identificados.

Tabela 9: Absorbâncias de formazana detectadas nos filmes e *castings* do sistema de heparina.

Filmes e Castings	7 Dias			14 Dias			21 Dias		
	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.
PEI/heparina	0,006	0,002	P<0,05	0,013	0,002	P<0,05	0,114	0,009	P<0,05
PEI/hep+bFGF	0,026	0,011	P<0,05	0,023	0,010	P<0,05	0,004	0,002	P<0,05
Cas.Heparina	0,098	0,007	Não tem	0,265	0,028	P<0,05	0,009	0,004	P<0,05
Cas.Hep+bFGF	0,051	0,005	P<0,05	0,484	0,115	P<0,05	0,086	0,012	Não tem
Controle	0,101	0,001		0,172	0,026		0,101	0,023	

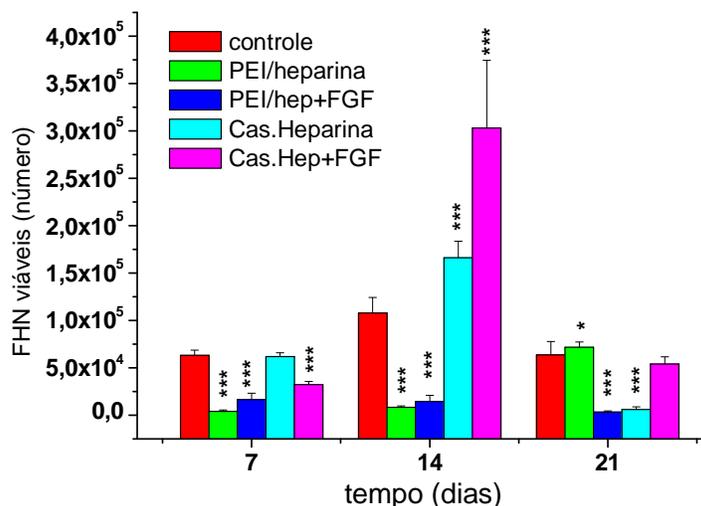


Figura 68: Resultados do ensaio de MTT para os filmes PEI/heparina; PEI/heparina+bFGF e *castings* de heparina e heparina+bFGF em 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Os resultados de MTT para os filmes PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF para 7 dias apresentaram valores proliferativos abaixo do controle. Apesar dos filmes PEI/heparina+bFGF apresentarem o dobro da quantidade de FHN que o filme PEI/heparina, ambos reduziram, com taxas de 74,0 e 93,7%, respectivamente, a proliferação em relação ao controle. Resultado similar foi apresentado no *casting* de heparina+bFGF, cujos índices de proliferação foram 48,7% menores que o controle. O *casting* apenas de heparina apresentou valores equivalentes ao controle, embora sem significância estatística suficiente para atribuí-los a uma possível ação biológica da heparina.

Os resultados proliferativos dos *castings* em 14 dias foram positivos em comparação com o controle, apresentando aumento de 54,0 e 180,8%, respectivamente, para heparina e heparina+bFGF. A alta proliferação era esperada devido a ação biológica do bFGF e da própria heparina. No entanto, observa-se na **Figura 68** que ocorreu uma drástica redução na quantidade de FHN em 21 dias sobre os *castings*. Em 21 dias, a heparina e heparina+bFGF reduziram 90,4 e 15,1% a quantidade de FHN se compararmos com o controle. Novamente, este resultado era esperado após a alta proliferação detectada em 14 dias, isso ocorre devido à falta de espaço e nutrientes na placa de cultivo.

Os filmes LbL PEI/heparina e PEI/heparina+bFGF apresentaram redução na proliferação celular com taxas de 92,3 e 86,6% em relação ao controle em 14 dias. Porém, em 21 dias, o filme PEI/heparina apresentou elevação de 12,9% no número de FHN viáveis, mas o filme PEI/heparina+bFGF permaneceu com baixa proliferação celular (redução de 95,0%). Aparentemente, a associação de bFGF em filmes LbL inibiu a sua atividade biológica, evidenciada pela análise da solução na forma de *casting*.

A **Figura 69** apresenta as imagens de microscopia dos filmes e *castings* do sistema de heparina cultivados. Em 7 dias as imagens apresentam FHN com morfologia normal em todas as amostras com exceção do filme PEI/heparina onde se observa poucas células com o formato alongado típico. Indubitavelmente, os filmes LbL apresentaram resultados inferiores aos *castings* das soluções sozinhas. No período de 14 e 21 dias de cultivo, observou-se células sobre os *castings* de heparina e heparina+bFGF, com morfologia típica e crescimento confluyente, aparentemente em quantidade superior ao controle. Os filmes LbL nesse período apresentaram claramente menor quantidade de células que o controle, e apenas sobre o filme PEI/heparina foi possível identificar fibroblastos com morfologia alongada típica.

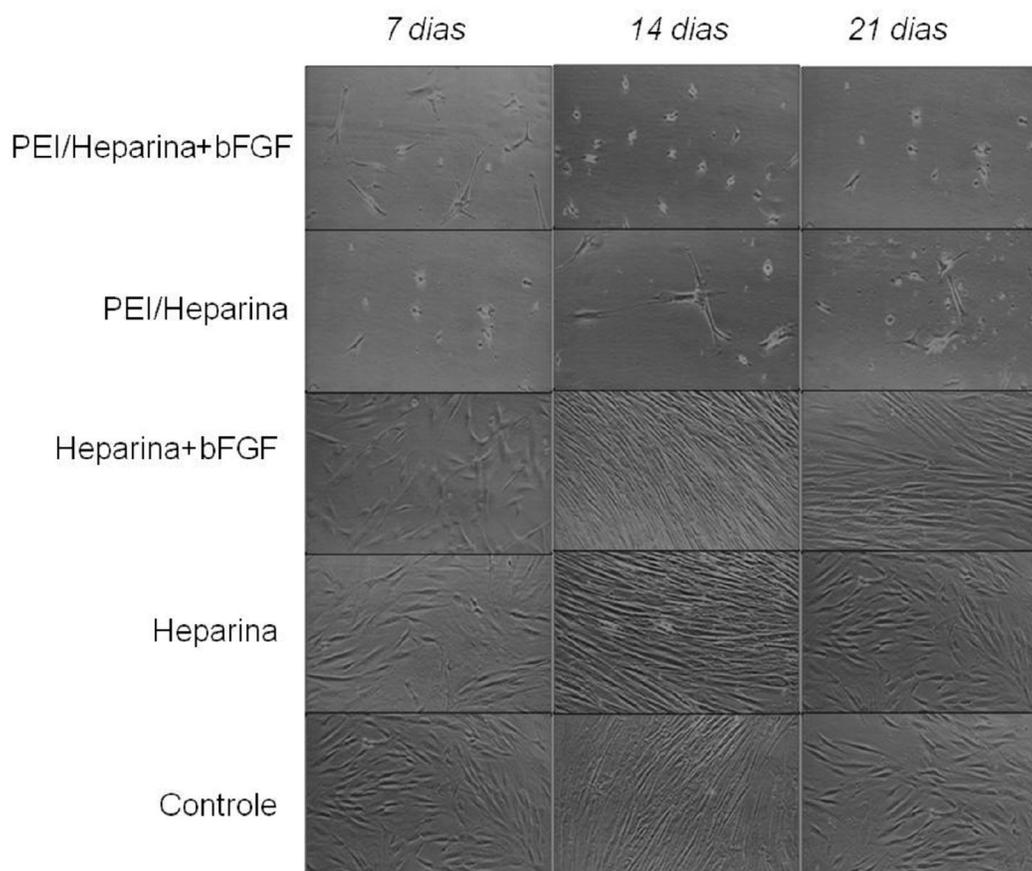


Figura 69: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os filmes e *castings* do sistema de heparina.

O baixo desempenho dos filmes do sistema de heparina foi não apenas inesperado como também contradiz a referência [Mao et al., 2005] e os resultados da avaliação da morfologia celular por MEV (**item 8.4**). Uma possível causa pode ser a degradação do bFGF, pois as placas deste sistema foram fabricadas e mantidas em temperatura ambiente antes do início do ensaio de MTT. Outro agravante deve ter sido o processo de esterilização, pois os filmes foram confeccionados de maneira idêntica aos filmes dos outros sistemas, fora da capela de fluxo laminar, e a esterilização seguiu com álcool 70% e iluminação UV por 15 minutos. Os resultados inferiores de proliferação celular podem ser também atribuídos a baixa concentração de bFGF usada ($0,003\text{g.mL}^{-1}$). Entretanto, percebe-se que o sistema de látex foi superior ao sistema de heparina, sendo confeccionado e mantido em condições simples de estocagem, comprovando superioridade comercial.

8.2.4 Castings

As soluções utilizadas, sem estarem automontadas em filmes LbL também foram avaliadas por ensaio de MTT. *Castings* das soluções foram obtidos permitindo que gotas das soluções de proteína do látex (*in natura* e desnaturada); PEI; PAH; HA; látex e HA+látex secassem sobre os poços da placa de cultura. FHN foram semeados sobre os *castings* e cultivados da mesma forma descrita para os filmes LbL. As médias das absorvâncias e os índices de significância dos resultados em relação ao controle são apresentados na **Tabela 10**. A **Figura 70** ilustra as quantidades de FHN detectadas nas amostras em 7, 14 e 21 dias de ensaio com o nível de significância (menor = *; maior = ***) também identificado.

Observa-se que apenas os *castings* de látex e HA+látex apresentaram número de FHN superior ao controle no período avaliado, porém os resultados de látex natural não foram estatisticamente significantes.

Tabela 10: Absorvâncias de formazana detectadas em *castings* das soluções.

<i>Castings</i>	7 Dias			14 dias			21 dias		
	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.	Abs.	erro	Signif.
Controle	0,101	0,003		0,172	0,005		0,101	0,002	
Proteína <i>in natura</i>	0,001	0,000	P<0,05	0,003	0,000	P<0,05	0,003	0,000	P<0,05
Proteína desnaturada	0,002	0,000	P<0,05	0,032	0,001	P<0,05	0,044	0,001	P<0,05
PEI	0,003	0,000	P<0,05	0,005	0,000	P<0,05	0,001	0,000	P<0,05
PAH	0,079	0,015	não tem	0,038	0,030	P<0,05	0,000	0,000	P<0,05
HA	0,000	0,000	P<0,05	0,000	0,000	P<0,05	0,011	0,008	P<0,05
Látex	0,103	0,007	não tem	0,199	0,023	não tem	0,056	0,039	não tem
HA+látex	0,135	0,142	P<0,05	0,075	0,053	P<0,05	0,006	0,000	P<0,05

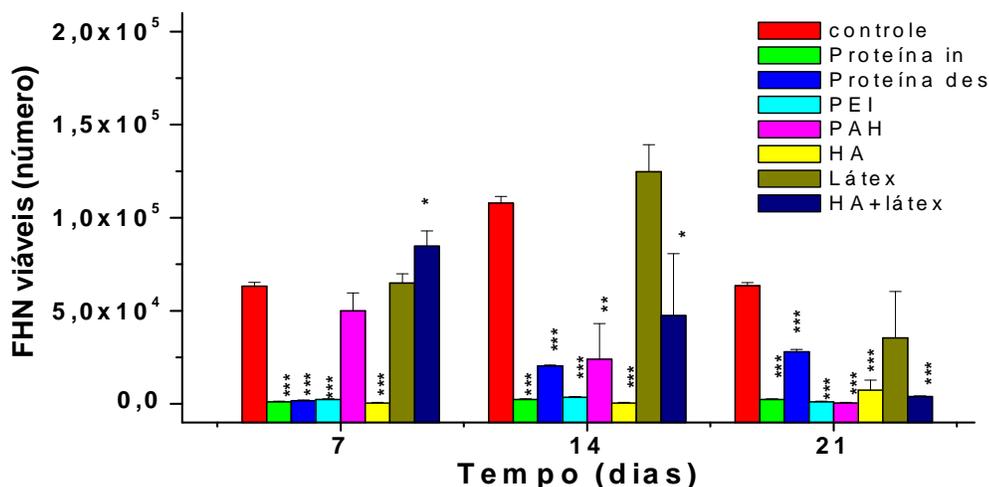


Figura 70: Resultado do ensaio de MTT para 7, 14 e 21 dias para os *castings* das soluções utilizadas.

O *casting* de PEI praticamente não permitiu que os FHN proliferassem sobre a sua superfície, sendo observadas reduções no número de células da ordem de -96,4%, -99,7% e -98,4%, respectivamente para 7, 14 e 21 dias de cultivo. Por microscopia óptica (**Figura 71**) constatou-se que os fibroblastos aderiram sobre o PEI em 7 dias, porém, o estiramento celular parece reduzir em 14 dias e não aparecem células vivas na imagem de 21 dias.

As proteínas do látex em *castings*, por sua vez, mostraram resultados similares aos previamente apresentados pelos filmes LbL deste material. O número de FHN sobre as proteínas no estado *in natura* foi baixo, apresentando redução em relação com o controle de -98,4%, -97,9% e -96,4%, respectivamente para 7, 14 e 21 dias. Esses índices foram menores que os apresentados para as proteínas do látex no estado desnaturado, que novamente como visto nos filmes tiveram resultados melhores que as proteínas *in natura*. O número de FHN sobre as proteínas desnaturadas foram -97,4%, -81,1% e -56,1% menor que o controle, respectivamente, para 7, 14 e 21 dias de cultivo. Pela **Figura 72** observa-se baixo número celular sobre as proteínas desnaturadas, mas (em 7 dias de cultivo) estas células apresentam morfologia típica. Aos 14 dias há algumas células alongadas e outras arredondadas, essas últimas possivelmente em apoptose, e em 21 dias os fibroblastos apresentam morfologia anômala sem formarem tecido. As imagens das células sobre as proteínas *in natura* apresentam apenas estruturas arredondadas, sinônimo de células não aderidas e/ou em processo de apoptose. Apenas no 7º dia visualiza-se uma célula aparentemente normal.

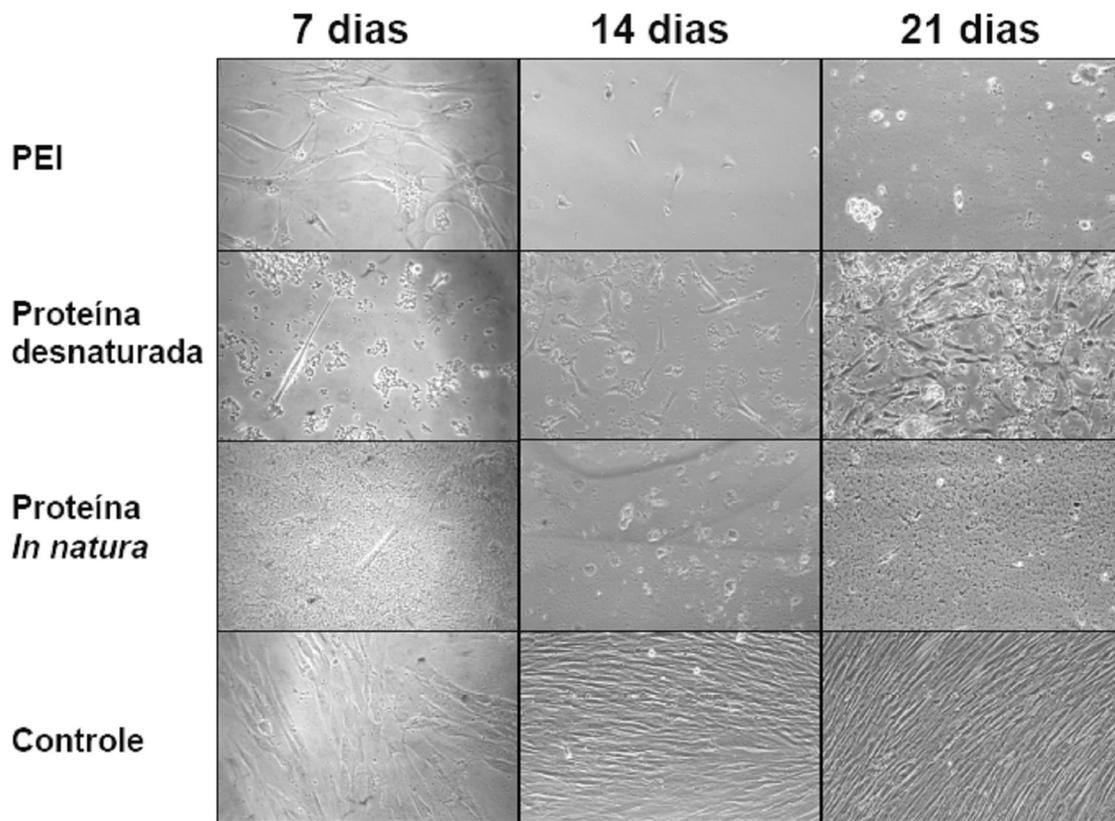


Figura 71: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os castings de PEI e proteína do látex.

Os *castings* de PAH apresentaram resultados de bioatividade relativamente melhores que PEI e proteína. Comparando com o controle o PAH também resultou em redução no número de FHN com índices de -20,9%, -77,8% e -99,3%, respectivamente, para 7, 14 e 21 dias de cultivo. Pelas imagens da **Figura 72** não se observa diferença entre a morfologia das células em 7 e 21 dias. Entretanto, baseando-se nas absorvâncias detectadas pode-se concluir que as células em 21 dias estavam mortas e as em 7 dias não. Vê-se no centro da fotomicroscopia do PAH em 14 dias um fibroblasto alongado e aparentemente normal.

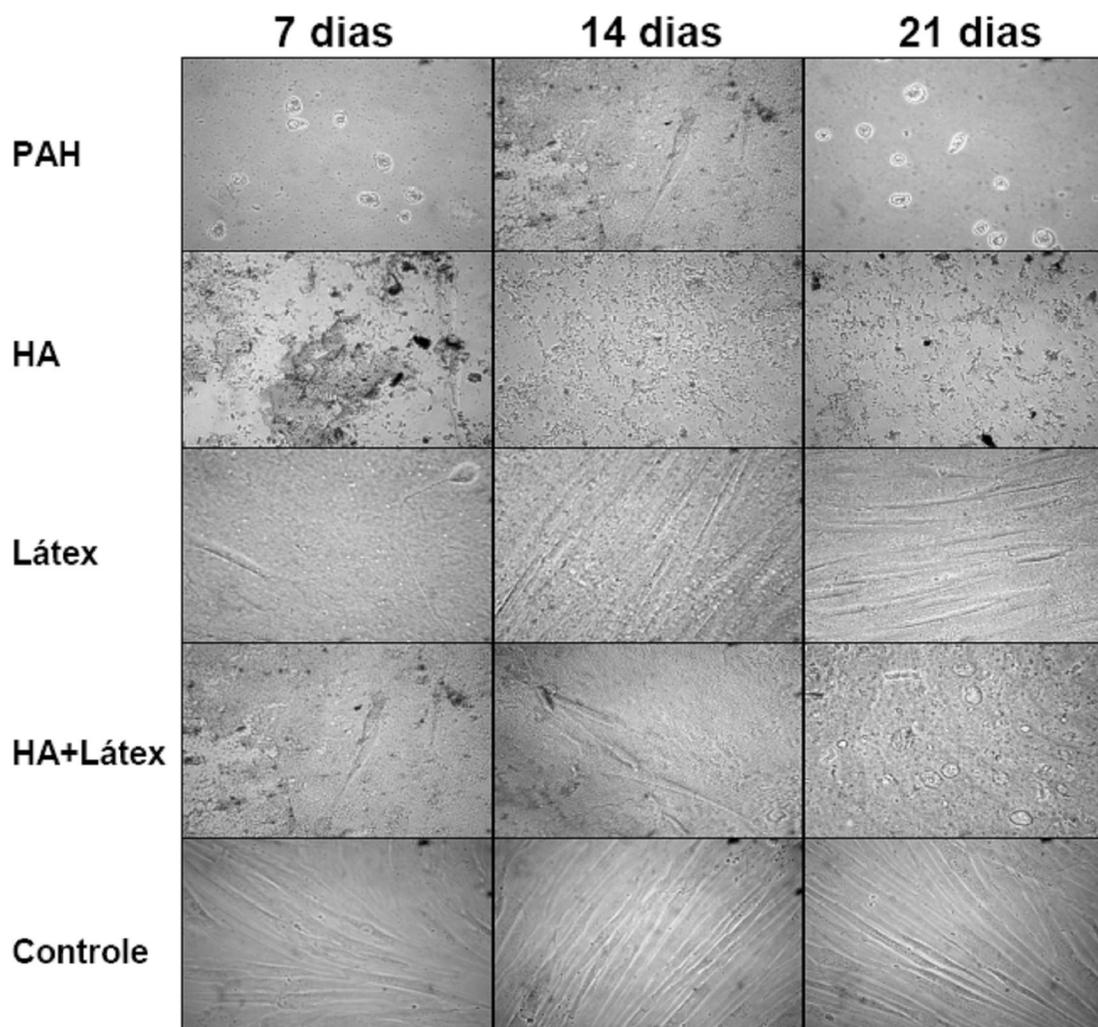


Figura 72: Microscopia óptica (aumento 400X) dos FHN cultivados sobre os castings de PEI e proteína do látex.

A solução de HA, apesar dos bons resultados dos filmes PEI/HA, sozinha não apresentou número apreciável de células, ou seja, na forma de filme LbL os resultados foram melhores. Comparando com o controle o HA reduziu no número de FHN em -99,3%, -99,6% e -88,3%, respectivamente para 7, 14 e 21 dias de cultivo. Essa toxicidade do HA puro foi confirmada pela microscopia cujas imagens (**Figura 72**) não evidenciam a presença de fibroblastos. O látex natural foi o único *casting* no qual os fibroblastos apresentaram índices de proliferação idênticos ao controle no 7^o (aumento de 2,6%) e 14^o (aumento de 15,6%) dia de ensaio. O látex apresentou redução no número celular (-44,2%) no 21^o dia de teste, mas devido à barra de erro, novamente este resultado não foi estatisticamente significativo. Além desses dados, as fotomicroscopias (**Figura 72**) indicam que o látex foi também o único

casting a apresentar fibroblastos com morfologia normal durante todo o ensaio. A solução de HA+látex sozinha na forma de *casting* teve resultado benéfico nos primeiros 7 dias de ensaio. Comparando com o controle, HA+látex elevou no número de FHN em 34,0% no 7º dia, e provou redução de -56,0% e -93,8%, respectivamente para 14 e 21 dias de cultivo. Observando a **Figura 72** verifica-se que apesar dos índices de proliferação celular baixarem em 14 dias, os fibroblastos mantêm morfologia típica, só desaparecendo aos 21 dias.

Comparando os dados de todos os filmes LbL propostos, confeccionamos a **Figura 73** com os resultados em percentual proliferativo, positivo ou negativo, em comparação com o controle durante o ensaio. Em contrapartida a **Figura 74** ilustra da mesma maneira os resultados obtidos nos *casntigs* estudados neste trabalho. Estas duas imagens tornam evidente que há maior quantidade de filmes LbL com proliferação positiva do que há *casntigs*. Isso comprova a superioridade da técnica LbL que permitiu que reagentes apresentassem bioatividade superior as suas soluções sozinhas.

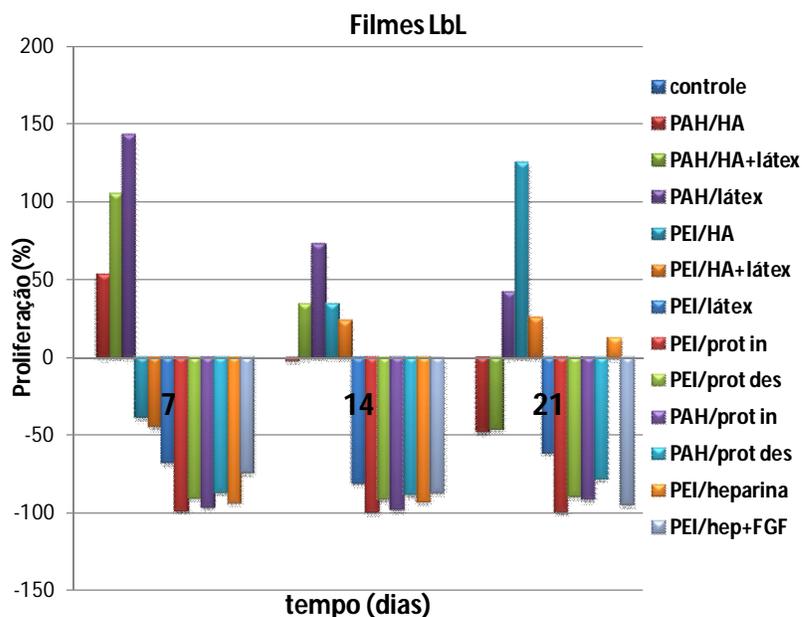


Figura 73: Dados de proliferação dos filmes LbL propostos, em porcentagem (positiva ou negativa), em relação ao controle.

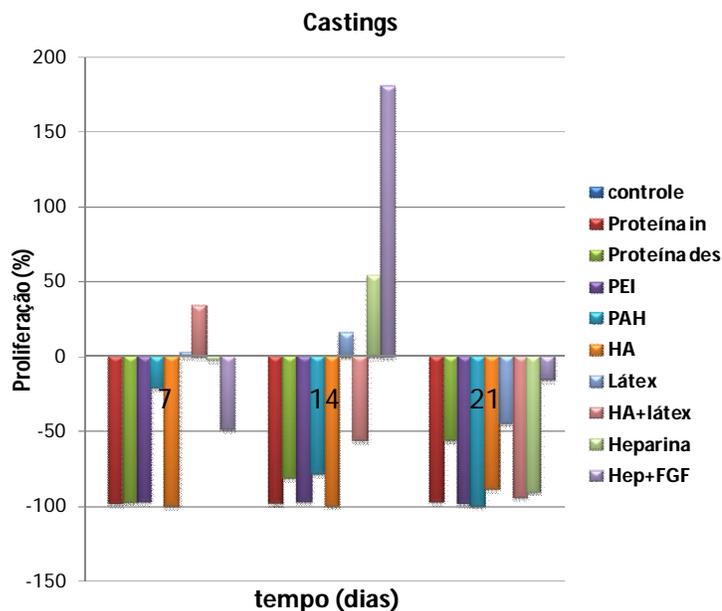


Figura 74: Dados de proliferação dos castings, em porcentagem (positiva ou negativa), em relação ao controle.

Percebe-se pela **Figura 73** que filmes LbL com HA, independente de serem montados com PEI ou PAH apresentaram durante o ensaio proliferação superior a soma dos índices obtidos isoladamente em suas soluções (*castings*). Usando esse raciocínio para avaliar os filmes LbL construímos a **Tabela 11**, onde ▲ indica que o filme LbL apresentou quantidade celular superior ao observado em seus *castings* (ou controle) e ▼ significa que o filme teve menor quantidade celular que a referência adotada. Pela **Tabela 11** percebe-se que os filmes PEI/látex e PAH/látex apresentaram resultados opostos, respectivamente com baixo e alto desempenho proliferativos. Este comportamento contraditório entre os filmes com PEI e PAH aparentemente se mantém nos filmes restantes do sistema de látex natural. Filmes com PAH apresentaram alta proliferação em 7 e baixa em 21 dias, e filmes com PEI apresentaram baixa proliferação em 7 e alta em 21 dias. Porém é inegável a superioridade dos filmes automontados com PAH (com exceção de PEI/HA) frente aos filmes com PEI.

Avaliando o benefício da incorporação de HA para a bioatividade dos filmes de látex natural observa-se: (i) nos filmes com PAH os índices proliferativos para PAH/HA+látex são metade dos índices obtidos em PAH/HA e PAH/látex, sugerindo que o HA e o Látex não possuem ação sinérgica. (ii) nos filmes com PEI os únicos filmes com atividade biológica favorável foram PEI/HA e PEI/HA+látex, sendo que o primeiro apresentou o dobro da proliferação do segundo. Apesar de a primeira vista isso sugerir que a associação de HA e

Látex foi benéfica, como PEI/látex não apresentou atividade biológica, isso implica que a bioatividade dos demais filmes com PEI se deva apenas da ação do HA. Concluindo que não houve ação sinérgica entre látex e HA, e seu uso concomitante poderia ser descontinuado.

Tabela 11: Comparação entre os filmes LbL tomando como referência os castings e o controle.

Referência	7 Dias		14 dias		21 dias	
	Casting	controle	Casting	controle	Casting	controle
PAH/HA	▲	▲	▲	▲	▲	▼
PAH/HA+látex	▼	▲	▲	▲	▲	▼
PAH/látex	▲	▲	▲	▲	▲	▼
PAH/prot in	▼	▼	▼	▼	▲	▼
PAH/prot des	▼	▼	▼	▼	▼	▼
PEI/HA	▲	▼	▲	▲	▲	▲
PEI/HA+látex	▼	▼	▲	▲	▲	▲
PEI/látex	▼	▼	▼	▼	▼	▼
PEI/prot in	▼	▼	▼	▼	▼	▼
PEI/prot des	▲	▼	▼	▼	▼	▼

▲ filme cuja quantidade celular foi superior ao castings ou controle (esses dados se encontram em evidência). ▼ filme cuja quantidade celular foi inferior a referência adotada.

Avaliando apenas os filmes e castings com proliferação positiva, dispostos na **Figura 75**, observa-se a presença dos filmes PEI/HA, PEI/HA+látex, PAH/HA, PAH/látex, PAH/HA+látex e PEI/heparina. Esses filmes aparentemente têm aplicabilidade como biomaterial e pela figura (gráfico de colunas) fica evidente as diferenças no período de ação dos filmes do sistema de látex com PEI e PAH. Apresentando filmes com PEI ação tardia (após 14 dias) e filmes com PAH ação mais imediata (em 7 e 14 dias), permitindo uma possível modulação dependendo da aplicação prática. A **Figura 75** também traz a comparação dos filmes com proliferação positiva, com a atividade máxima (100%) dos índices detectados em heparina+bFGF (em 14 dias). Adotando a proliferação de heparina+bFGF (com 0,003g.mol⁻¹ de bFGF) como padrão, verifica-se que os filmes PAH/látex, PEI/HA, PAH/HA+látex possuem, respectivamente, 79, 69 e 58% da sua bioatividade. Tornando-se indubitavelmente os melhores filmes dentre os propostos neste trabalho, o sistema de látex foi superior aos demais, mesmo sendo confeccionado e mantido em condições simples de estocagem. Observa-se também que os filmes PAH/HA, PEI/HA+látex e PEI/heparina apresentaram, respectivamente, 29, 14 e 7% da atividade da heparina+bFGF.

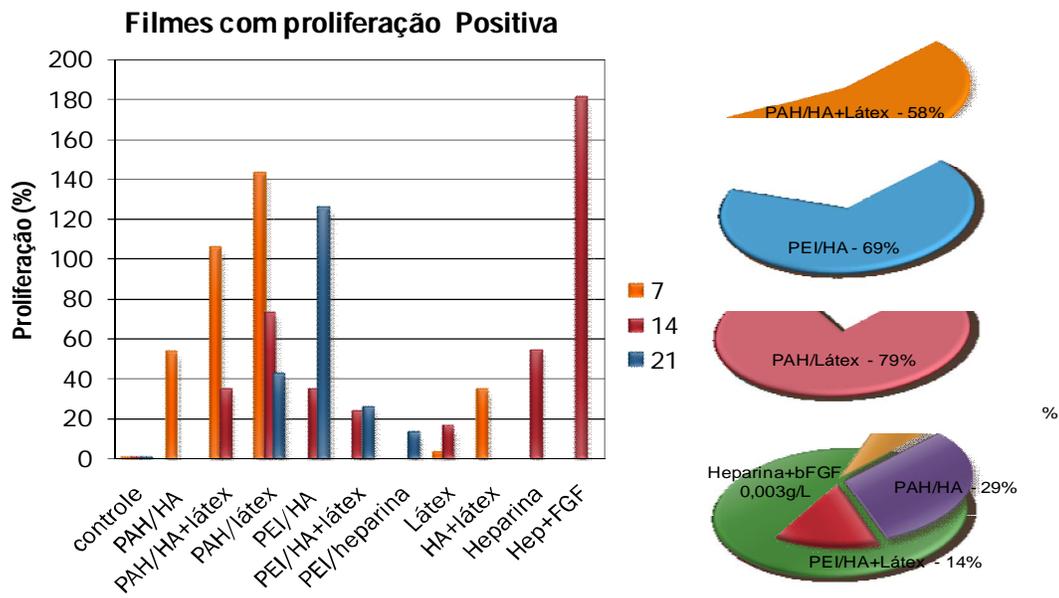


Figura 75: Comparação das bioatividades dos filmes, e sua quantificação frente à ação da heparina ligada a bFGF, adotado como padrão.

8.3 Influência das proteínas do látex no crescimento celular

Foi estudada a ação das proteínas do látex, em concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 g.L⁻¹, sobre o desenvolvimento celular de fibroblastos humanos normais. A influência das proteínas do látex sobre as células foi estudada pelo método direto, no qual FHN foram cultivados sobre substratos de vidro com uma monocamada de proteínas. O impacto das proteínas do látex no meio de cultura sobre a proliferação celular foi estudado pelo método indireto. Esses testes foram realizados com seis réplicas de cada amostra, três amostras positivas e três negativas (sem células). A quantidade de células presentes em cada amostra foi determinada por ensaio de MTT, seguindo a curva de calibração (**Figura 76**) realizada com concentrações conhecidas de FHN.

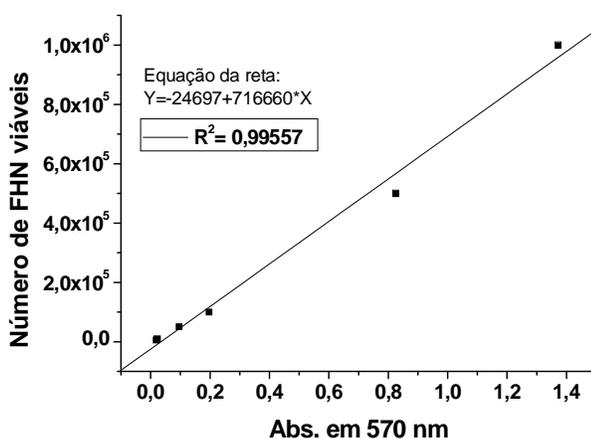


Figura 76: Curva de calibração com a concentração conhecida de FHN. A equação de reta também está representada.

8.3.1 Ensaio Direto

A **Tabela 12** mostra as médias das absorbâncias detectadas e a significância do resultado. A **Figura 77** ilustra as quantidades de FHN detectadas nas amostras em 5 dias de cultivo com o nível de significância (menor = *; maior = ***) também identificados. Observa-se que as células não se aderiram sobre monocamadas de proteína do látex em concentração de 1,0 g.L⁻¹, e que a quantidade de células aumente conforme as concentrações diminuem. Por este ensaio conclui-se que a proteína do látex dificulta o desenvolvimento do fibroblasto.

Tabela 12: Absorbâncias detectadas no ensaio direto de bioatividade da proteína de látex natural.

Concentração (g.mL ⁻¹)	Abs.	erro	Signif.
controle	0,214	0,019	
0,1	0,168	0,008	P<0,05
0,5	0,131	0,021	P<0,05
1,0	0,018	0,005	P<0,05

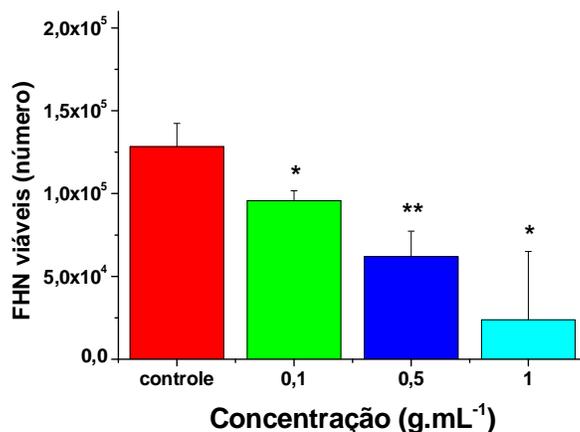


Figura 77: Quantidade de FHN viáveis sobre monocamadas de proteína do látex em diferentes concentrações.

Esse resultado não era esperado, pois este trabalho partiu do pressuposto que as proteínas presentes no látex contribuíssem positivamente para o desenvolvimento celular. É possível que a bioatividade do látex possa ainda estar contida em fração protéica, porém, constituída de proteínas com massa molar diferente desta (14 a 15 kDa) fração estudada.

8.3.2 Ensaio Indireto

A **Tabela 13** apresenta as médias das absorbâncias e a significância do resultado frente ao controle, no caso nenhum resultado foi estatisticamente viável. A **Figura 78** ilustra a quantidade de células detectadas em cada amostra com células mantidas com proteínas do látex no meio de cultura por 3 dias. Vê-se que a concentração da solução de proteínas do látex presente no meio de cultura não afeta de maneira significativa a proliferação celular. Porém, caso os dados fossem significativos observaríamos uma tendência em aumentar a quantidade células de acordo com o aumento da concentração de proteína.

Tabela 13: Absorbâncias detectadas no ensaio indireto de bioatividade da proteína de látex natural.

Concentração (g/mL ⁻¹)	Abs.	erro	Signif.
controle	0,104	0,011	
0,1	0,086	0,003	não tem
0,5	0,096	0,008	não tem
1,0	0,108	0,008	não tem

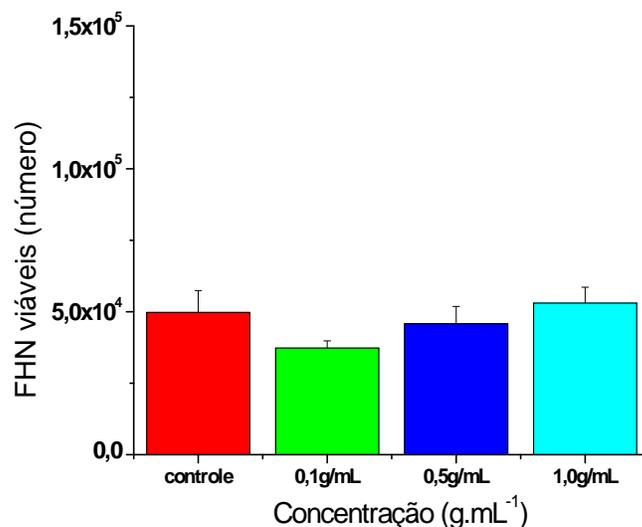


Figura 78: Quantidade de FHN cultivados com proteína do látex em diferentes concentrações no meio de cultura.

Caso as proteínas estudadas possuíssem atividade mitogênica, ausentes apenas quando depositada em superfícies, por esconder os sítios funcionais ou alteração na conformação da molécula proteínica, isso seria evidenciado neste ensaio indireto. Pelos resultados de ambos os ensaios, *direto e indireto*, conclui-se que a proteína do látex influencia negativamente no desenvolvimento celular, mas não provoca reações caso esteja presente no meio celular.

8.4 Morfologia celular por Mev

Imagens de fibroblastos humanos normais cultivados sobre as amostras foram realizadas por MEV para verificar como ocorre a padrão morfológico de adesão e espalhamento em cada sistema. Dados sobre as células foram obtidos analisando as imagens em programa computacional Image J, e estas foram separadas em sistemas para facilitar a discussão. O crescimento normal dos fibroblastos leva de 12 a 20 horas para aderir e propagar pelo substrato [Mao et al, 2005]. Neste trabalho as células foram cultivadas por 74 horas e, portanto era esperado que as células se apresentassem em estágio avançado de espalhamento e proliferação, neste trabalho foi adotado o padrão sobre o substrato de vidro como controle.

A **Figura 79** ilustra duas formas de FHN visualizados sobre o branco (substrato limpo de vidro) após período de 3 dias. Na **Figura 79A** observa-se célula aderida sobre o substrato com propagação em todas as direções, sem emissão direcionada de prolongamentos, algo pouco comum para fibroblastos. Observa-se o núcleo central com diâmetro aproximado de 18 μm e citoplasma se fundido ao substrato com diâmetro de 50 μm , no geral a célula ocupa uma área aproximada de 1.900 μm^2 . Na **Figura 79B** vê-se um FHN alongado típico com dimensões de 200 x 5 μm e região do núcleo com diâmetro de 10 μm , ocupando uma área aproximada de 1.700 μm^2 do substrato. Adotaremos as morfologias observadas nessas imagens como referência para o crescimento dos fibroblastos humanos normais sobre substratos de vidro.

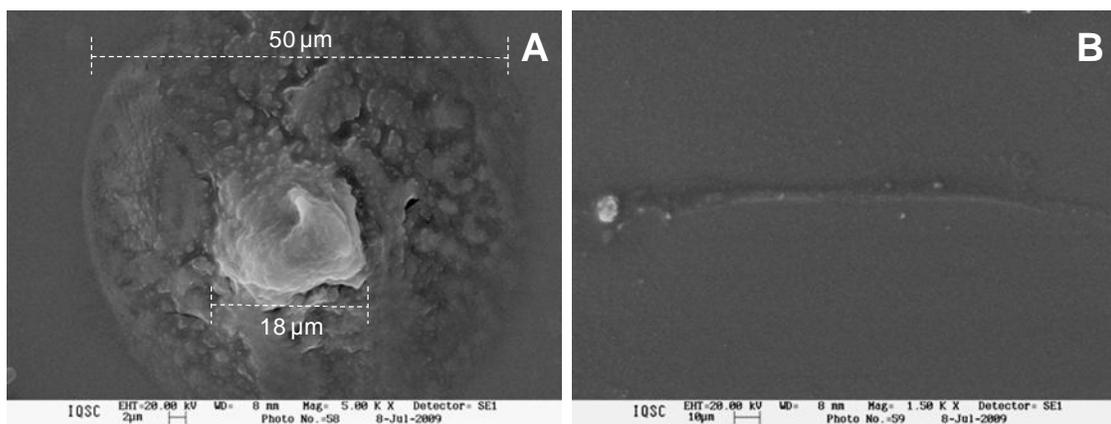


Figura 79: Imagens de FHN aderidos sobre substratos de vidro. A) aumento de 5.000x (escala 2 μm). B) aumento de 1.500X (escala 10 μm).

8.4.1 Sistema de proteínas do látex

Sobre o filme PEI/proteína do látex *in natura* foi observada célula não aderida (**Figura 80A**); célula em fase inicial de espalhamento celular com propagação discreta (**Figura 80B**) e FHN não aderidos apresentando morte celular (**Figura 80C**). As células dessas imagens possuem dimensões similares com áreas de 260, 340 e 290 μm^2 , respectivamente, para as figuras A, B e C. Por este estudo fica evidente a inferioridade das superfícies de PEI/proteína do látex (em concentração de 1,0 g.mL^{-1}) como suporte celular para fibroblastos humanos normais. A causa da morte celular observada na **Figura 80C** pode ser atribuída não a um efeito tóxico da proteína do látex, mas sim a ausência de adesão do FHN a superfície, ação *sine qua non* a célula não se desenvolve. Esse resultado esta de acordo com os resultados obtidos no ensaio de MTT. Por este ensaio foi possível calcular o tamanho aproximado do FHN não aderido, com forma esférica cujo diâmetro varia de 10 a 20 μm .

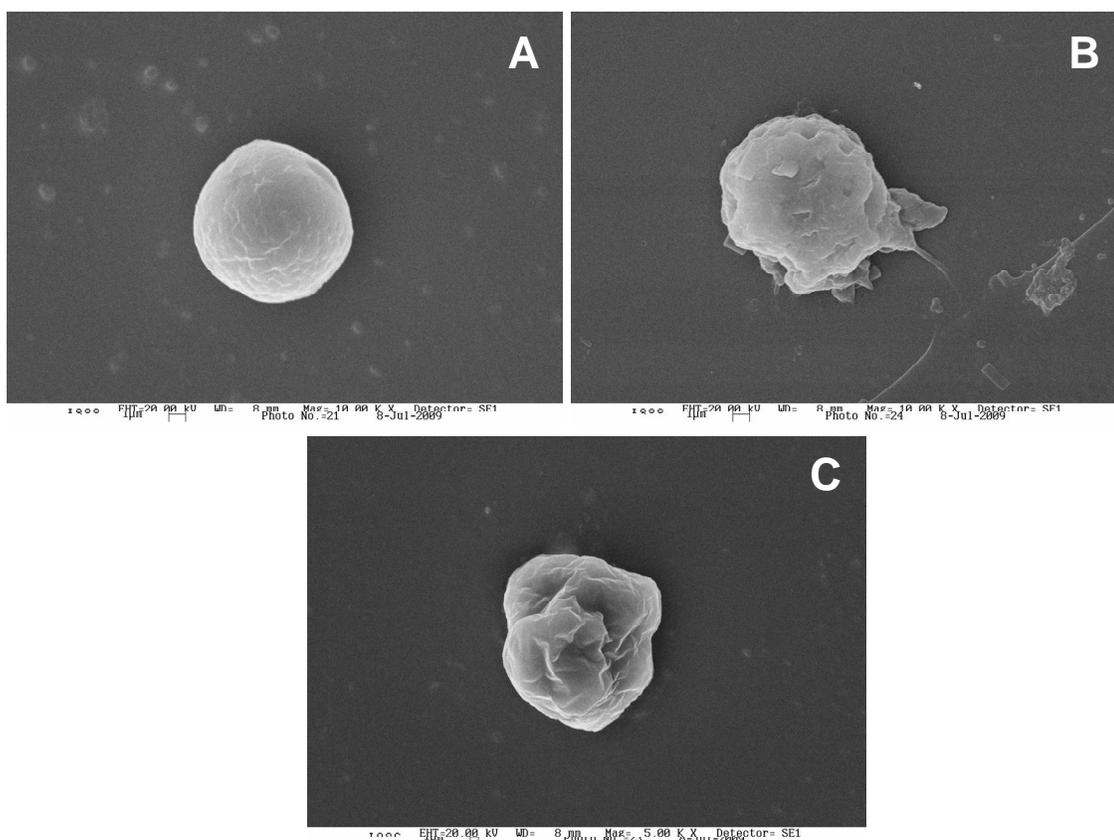


Figura 80: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/proteína do látex. A) e B) Imagens com aumento de 10.000X (escala 1 μm). C) Imagens com aumento de 5.000X (escala 1 μm).

Em filmes PAH/proteína do látex foi possível observar FHN aderido e alongado, com crescimento preferencial em sentido único, ou seja, com morfologia típica. Na **Figura 81A** vê-se duas células próximas (1 e 2), ambas aderidas sobre o filme. Como não foi possível separá-las visualmente, e por apresentarem prolongamentos que se estendem para fora da imagem, à área não foi calculada. A **Figura 81B** ilustra ampliação da célula 1 onde se visualiza a região do núcleo um pouco alongado (diâmetro de 15 μm), circundado por região de menor relevo que se funde com o substrato. Opostamente ao observado no filme com PEI, o filme PAH/proteína permitiu que FHN aderissem e se propagassem sobre a superfície. O bom espalhamento explica os melhores resultados de MTT para os filmes PAH/proteína que para PEI/proteína.

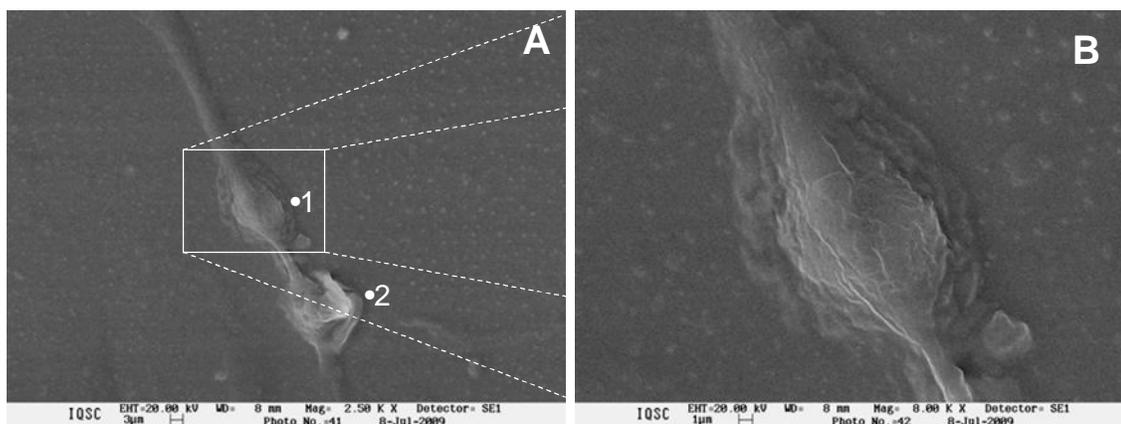


Figura 81: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/proteína do látex. A) aumento de 2.500x (escala 3 μm). B) aumento de 8.000X (escala 1 μm).

8.4.2 Sistema de látex natural

Os fibroblastos sobre o filme PEI/látex apresentados na **Figura 82B** possuem morfologia atípica. A célula 2 apresenta formato estranho, sem orientação, com contornos não totalmente distinguíveis do substrato, ocupando área de 2.400 μm^2 . A célula 3 apresenta forma alongada (150 x 8 μm), sem núcleo perceptível e contornos de difícil distinção nas extremidades, ocupa aproximadamente área de 3.800 μm^2 . A célula 1 foi ampliada na **Figura 82A** onde se visualiza sua forma achatada sobre o substrato com propagação da membrana em várias direções. A célula 1 ocupa área de 330 μm^2 , similar a da **Figura 80B**, porém com relevo visivelmente menor.

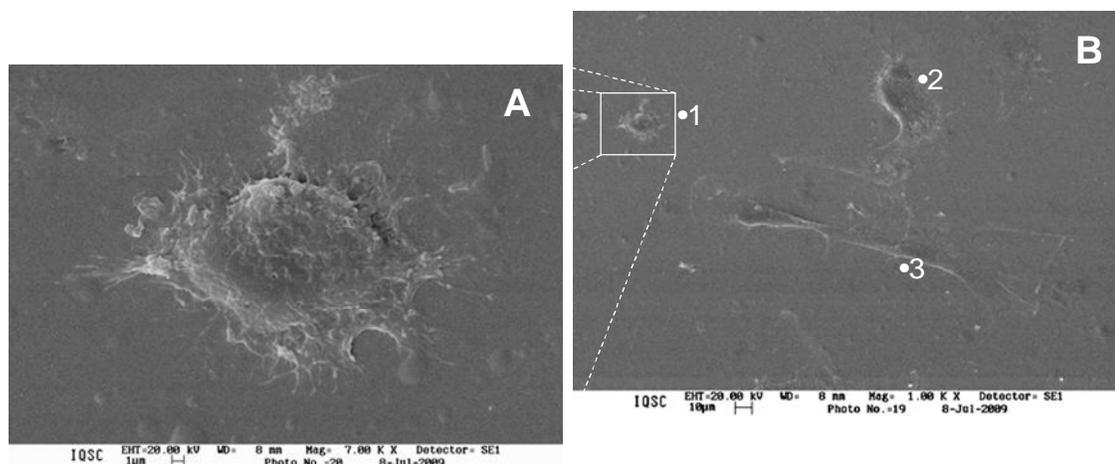


Figura 82: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/látex. A) aumento de 7.000x (escala 1µm). B) aumento de 1.000X (escala 10µm).

Se compararmos os FHN com gotas de água, poderíamos dizer que o ângulo de contato entre célula/superfície é baixo sobre PEI/látex e alto sobre PEI/proteína, se observarmos a **Figura 83**. O baixo ângulo de contato possivelmente apresenta alta força de atração, enquanto que alto ângulo de contato denota baixa atração ente célula/superfície. Altas forças atrativas poderiam provocar tensões excessivas que romperiam a membrana celular, ou mais provavelmente estas tensões influenciariam nas sinalizações transmitidas pelo citoesqueleto, enquanto que baixas forças atrativas não permitiriam a fixação adequada da célula, sendo que ambos os efeitos influenciam negativamente o desenvolvimento celular. Portanto, o desenvolvimento celular dificultado nos filmes PEI/látex e PEI/proteína, parece ter origem em problemas opostos, mas ainda assim relacionados às forças de interação, com forças excessivamente altas ou baixas demais para o desenvolvimento do FHN.

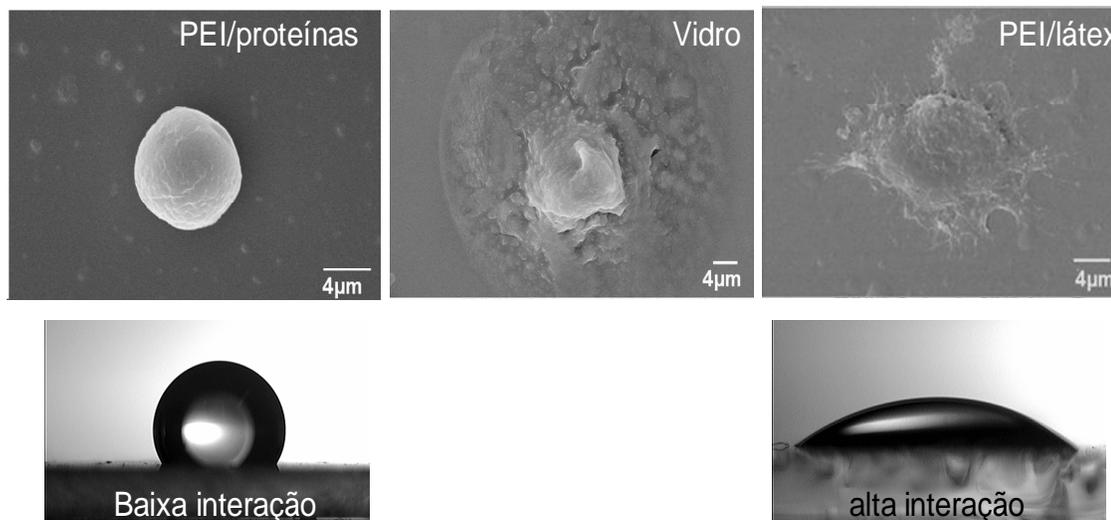


Figura 83: Comparação de células com gotas d'água para extrapolar quais são as forças de interação entre célula-filme LbL.

Sobre o filme PAH/látex se observou fibroblastos em diferentes graus de desenvolvimento e espalhamento. A **Figura 84A** ilustra uma célula não aderida de 19 µm de diâmetro, ocupando uma área de 280 µm². Na **Figura 84B** aparece uma célula em processo inicial de espalhamento celular (área de 250 µm² e dimensões de 18 x 14 µm). Note que a imagem desta célula, poderia ser descrita como contendo força de interação intermediária se observar a **Figura 83**. A **Figura 84C** apresenta dois FHN com morfologia típica (célula 1 = 1.400 µm² e célula 2 = 3.600 µm², aproximadamente) cujos contornos fundem-se com o substrato dificultando a visualização. Na **Figura 84D** vê-se FHN alongado com prolongamentos em mais de um sentido. O desenvolvimento celular sobre o filme PAH/látex apesar de não ser uniforme, induziu propagação celular além da observada no branco, colaborando com os dados anteriores de MTT que apontou boa bioatividade para este filme.

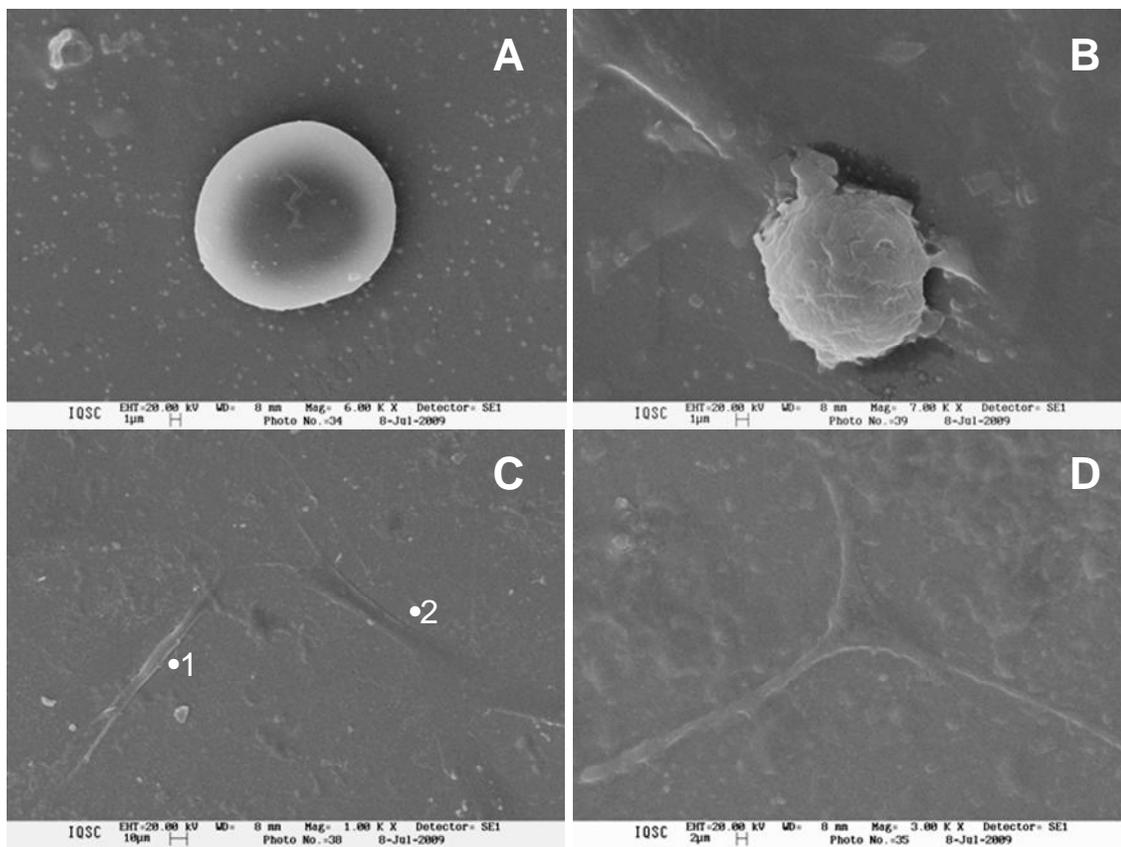


Figura 84: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/látex. A) aumento de 6.000x (escala 1µm). B) aumento de 7.000X (escala 1µm). C) aumento de 1.000x (escala 10µm). D) aumento de 3.000x (escala 2µm).

No sistema PEI/HA+látex várias células são observadas na **Figura 85A**, os FHN 1-3 são alongados apresentando morfologia típica, ocupando áreas de 240, 430 e 720 µm², respectivamente para as células 1, 2 e 3. As estruturas identificadas como 4 e 5, apresentam formato esférico e tamanhos de 80 e 85 µm², respectivamente. A **Figura 85C** mostra a ampliação da estrutura 5, por sua forma diferente de uma célula e pelo tamanho diminuto essas estruturas foram identificadas como partículas de látex e não células. Esta estrutura tem tamanho (9 x 10 µm) e a forma confere com o observado na análise de MEV para o filme PEI/HA+látex (**Figura 50**). A **Figura 85B** mostra uma célula também típica, com núcleo bem definido e prolongamento em sentido único (290 µm²). Esse resultado difere da morfologia anteriormente observada no ensaio de MTT em 7 dias de cultivo, mas concorda com o alto índice de proliferação obtida depois com 14 e 21 dias.

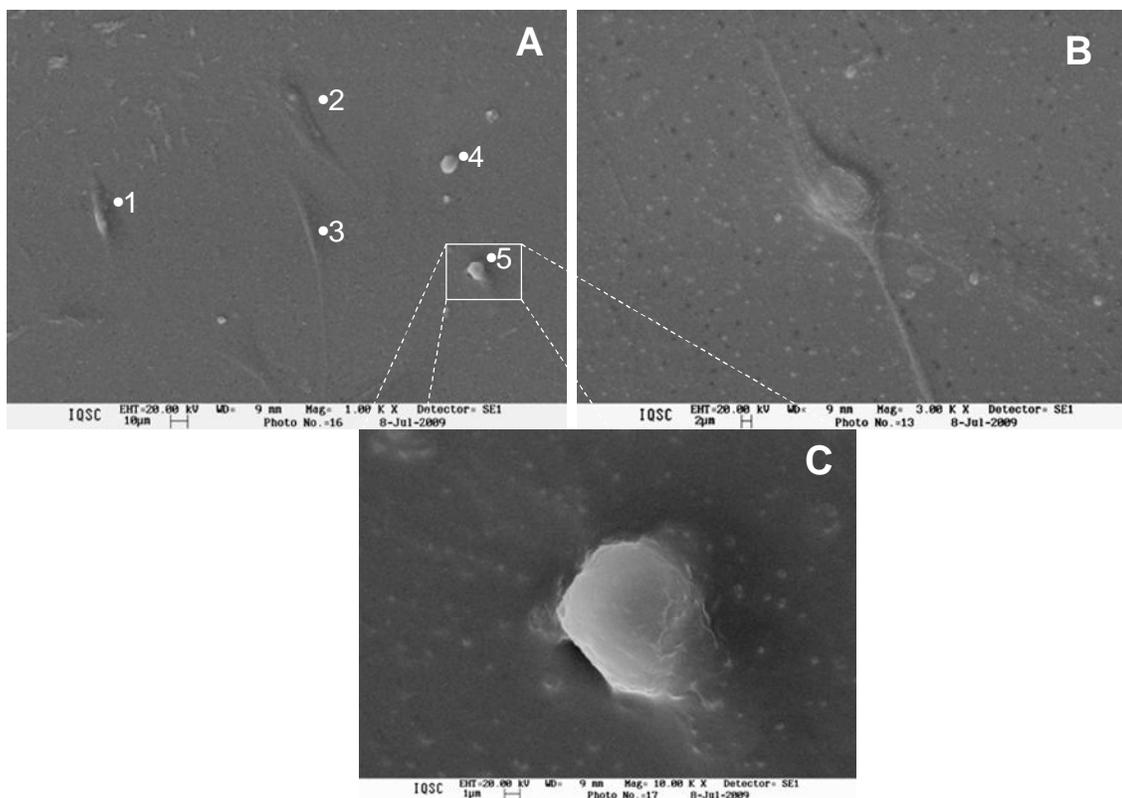


Figura 85: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/HA+látex. A) aumento de 1.000x (escala 10 μ m). B) aumento de 3.000X (escala 2 μ m). C) aumento de 10.000x (escala 1 μ m).

No filme PAH/HA+látex foi encontrado FHN (**Figura 86A**) com morfologia típica, ocupando área de 1.100 μ m². A **Figura 86B** ilustra estrutura com forma diferente das células observadas, porém as dimensões (18 x 14 μ m) e a área ocupada (210 μ m²) nos levam a crer que se trata de um fibroblasto com espalhamento anômalo. As imagens anteriores obtidas no ensaio de MTT mostravam morfologia normal (**Figura 67**) em períodos mais longos de cultivo. Isso sugere que esta superfície permitiu o desenvolvimento normal da célula, ou que a célula visualizada não representa o padrão morfológico de adesão da maioria dos FHN sobre o filme PAH/HA+látex.

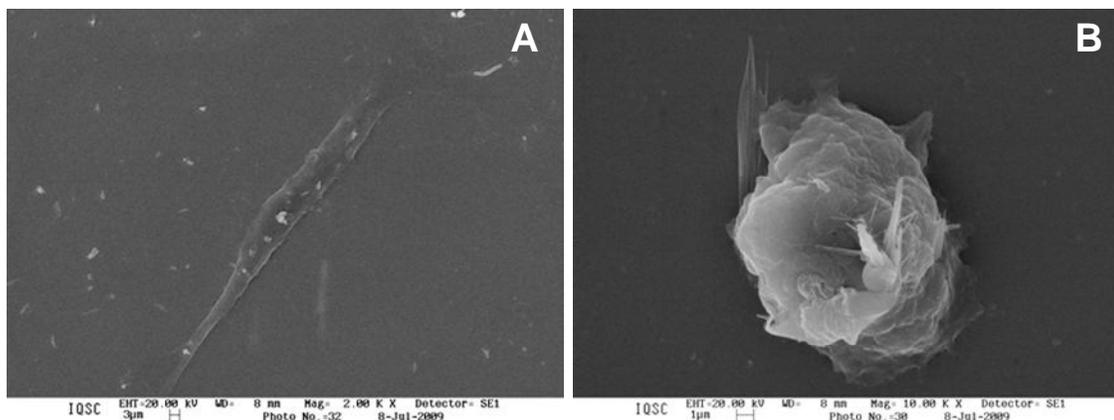


Figura 86: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/HA+látex. A) aumento de 2.000x (escala 3µm). B) aumento de 10.000X (escala 1µm).

A amostra PEI/HA, que teve os maiores índices proliferativos em 21 dias de cultivo, apresentou FHN alongados (**Figura 87B**). Nesta figura a célula 1 apresenta dimensões de 100 x 19 µm (1.200 µm²) e a célula 2 apresenta dimensões de 60 x 8 µm (350 µm). Na célula 1, ampliada na **Figura 87A**, verifica-se o início da propagação deste FHN para uma orientação não típica. Novamente, retornando aos ensaios anteriores, verifica-se que o cultivo de FHN sobre PEI/HA induziu morfologias típicas (**Figura 65**) nos períodos de até 21 dias de cultivo.

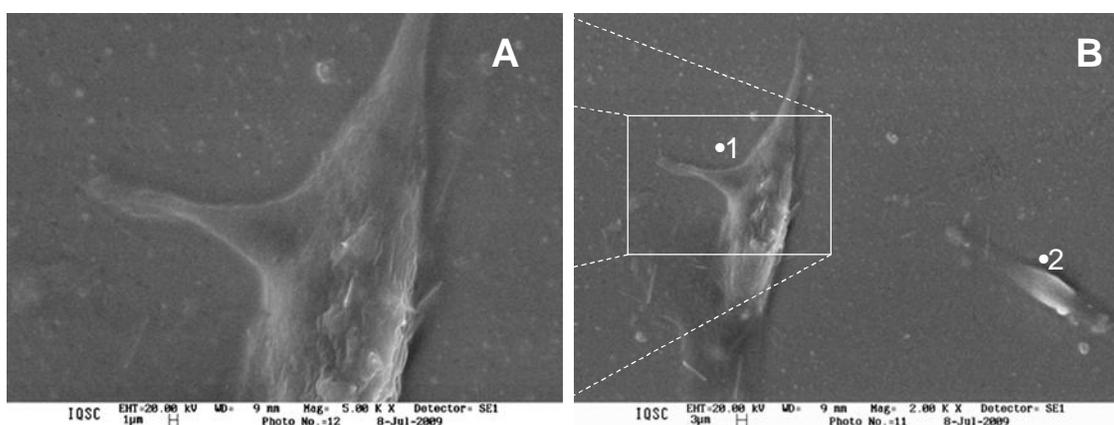


Figura 87: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/HA. A) aumento de 5.000x (escala 1µm). B) aumento de 2.000X (escala 3µm).

A **Figura 88** indica, além de fibroblasto com aparência e crescimento normal (área superior a 1.000 µm²), vários pontos dispersos pela superfície do filme PAH/HA. A

morfologia de adesão observada concorda com os altos índices proliferativos observados no ensaio de MTT para 7 e 14 dias. Todavia, as estruturas menores, que não foram vistas nas análises anteriores de MEV (**Figura 54**), devem ser oriundas da degradação do filme.

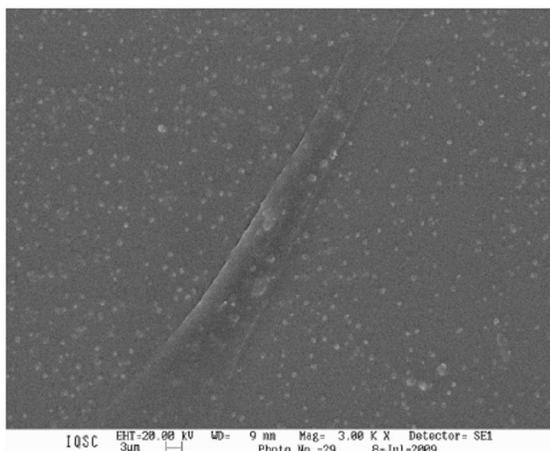


Figura 88: Imagens de FHN aderidos sobre filme PAH/HA. Aumento de 3.000x (escala 3 μ m).

8.4.3 *Sistema de heparina*

O filme PEI/heparina adotado neste trabalho como modelo para bioatividade apresentou na **Figura 89A** célula com núcleo central com 7 μ m de diâmetro e citoplasma bem distribuído ao seu redor atingindo área total superior a 500 μ m². A propagação foi inferior a observada no branco, porém a forma e crescimento demonstram boa morfologia de adesão celular. A **Figura 89B** ilustra um fibroblasto alongado típico com dimensões de 90 x 6 μ m (900 μ m²) aproximadamente. Apesar da boa morfologia de adesão celular, os fibroblastos proliferaram com taxas inferiores ao controle sobre os filmes do sistema de heparina em MTT. Provavelmente outros fatores, posteriores a fixação, dificultaram o desenvolvimento celular.

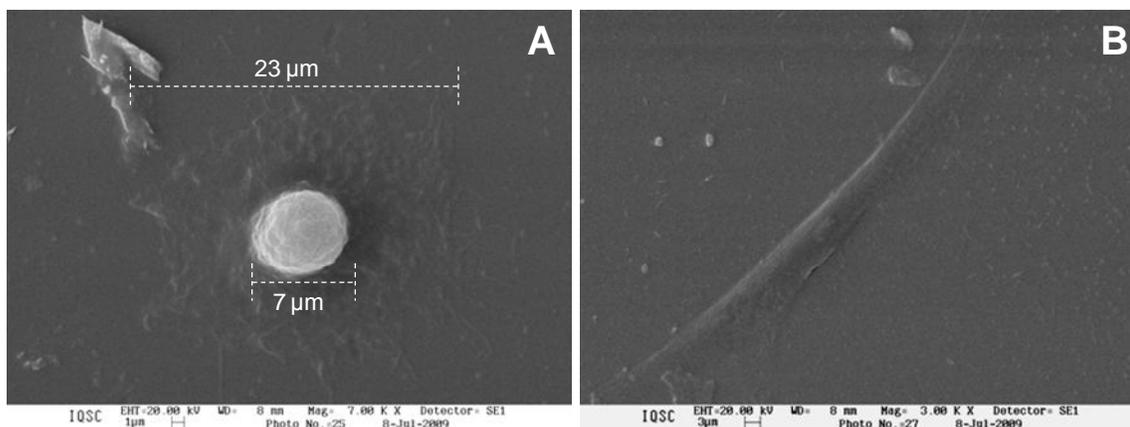


Figura 89: Imagens de FHN aderidos sobre filme PEI/heparina. A) aumento de 7.000x (escala 1μm). B) aumento de 3.000X (escala 3μm).

Conclui-se que o padrão morfológico dos FHN não foi satisfatório nos filmes de PEI/proteína e PEI/látex, sendo verificada morfologia de adesão aparentemente típica nos filmes PAH/proteína; PAH/látex; PEI/HA+látex; PAH/HA+látex; PEI/HA, PAH/HA e PEI/heparina. Todos os filmes que permitiram bom espalhamento celular apresentaram também bom desenvolvimento identificado pela curva de crescimento descrita no item anterior (**item 8.2**). A única exceção é verificada no filme PAH/proteína que apesar de permitir espalhamento celular satisfatório, os índices de proliferação foram baixos. Isso provavelmente se deva a falta de atividade biológica das proteínas de látex, evidenciado no **item 8.3**.

No geral, este ensaio para observar a morfologia celular, não apresentou muitas células após o processo de fixação e metalização, apesar da quantidade inicial de células semeadas (10^3 células). Portanto, estes resultados devem ser tratados com ressalvas, relacionado seus dados com os ensaios anteriores de MTT para validá-los. Usando este critério, os únicos resultados que não colaboram com os dados de MTT são os filmes PAH/proteína e PEI/HA+látex. Sobre PAH/proteína as células não se desenvolveram; e sobre PEI/HA+látex os índices de proliferação foram positivo apenas após 14 dias, resultados não justificados pela morfologia de adesão. Possivelmente, fatores aquém da morfologia são determinantes para a proliferação sobre estes filmes, tais fatores permanecem inexplicáveis.

Apesar de este item tratar da observação do padrão morfológico de adesão celular, o filme ao redor das células pode ser estudado. Analisando o fundo das imagens das células e comparando-as com as imagens anteriores de MEV e AFM, assim como o próprio estudo de degradação por UV-vis observou-se:

- (i) Os filmes PAH/proteína; PEI/proteína; PAH/látex; PEI/HA e PEI/heparina não apresentaram alteração topográfica cuja causa provável reside no ensaio de degradação. Esses filmes, com exceção de PAH/látex (**Figura 23**) e PEI/heparina (**Figura 24**), apresentaram pouca elevação na absorbância em 3 dias durante o teste de degradação.
- (ii) Filmes de PAH/HA apresentaram pequenas estruturas não observadas na imagem anterior de AFM (**Figura 38**) e MEV (**Figura 54**) com 5 bc, que apresentavam superfície homogênea. É provável que essas estruturas sejam resultantes da degradação do filme, o período de cultivo coincide com o momento do aumento na absorbância no ensaio de degradação (**Figura 23**).
- (iii) Os filmes PEI/látex e PAH/HA+látex apresentam-se mais homogêneos, sem as partículas apresentadas nas microscopias anteriores.
- (iv) O filme PEI/HA+látex mantém a topografia similar, apenas com menor quantidade de partículas que anteriormente observado.

Atribuiu-se a maior alteração topográfica dos filmes com látex a desestruturação causada provavelmente pelos solventes orgânicos utilizados para desidratar e fixar as células para a microscopia.

9 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

Através dos ensaios realizados, foi possível perceber algumas relações entre as características físicas e biológicas dos filmes propostos. A rugosidade, por exemplo, é ao que tudo indica, diretamente proporcional à quantidade de material adsorvido, ou seja, a absorvância detectada. Isso pode ser constatado na **Figura 90** que ilustra as absorvâncias detectadas nos filmes propostos, confeccionados com 10 bc. Olhando separadamente os filmes com PEI e PAH, observa-se que estes apresentaram alta quantidade de material e também alta rugosidade (Rms), o mesmo ocorrendo com os baixos índices. A mesma relação direta parece ocorrer entre o ângulo de contato e a rugosidade da superfície. Superfícies com altos ângulos têm alta rugosidade e baixos ângulos apresentaram superfícies homogêneas. Fazendo estas duas relações, Rms/abs e Rms/ângulo de contato, verifica-se que há relação direta também entre a quantidade de material e o ângulo de contato, algo mais perceptível nos filmes com PEI (**Figura 90**).

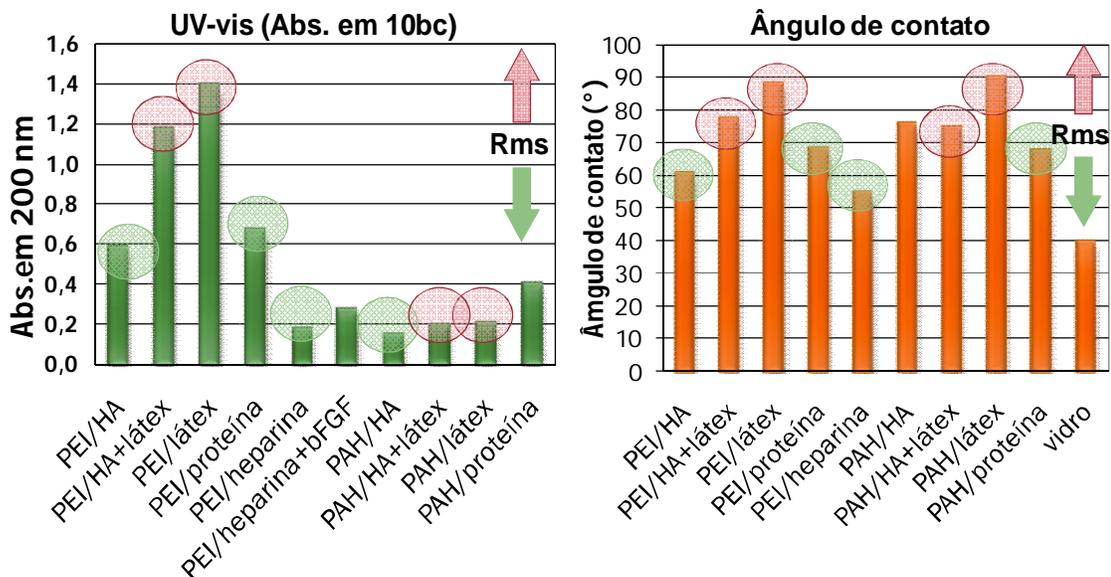


Figura 90: Relação entre rugosidade (Rms), quantidade de material (abs.) e ângulo de contato nos filmes estudados.

Entretanto, filmes como PAH/proteína parecem fugir desta lógica em relação à absorvância, e PAH/HA em relação ao ângulo de contato. O filme PEI/heparina+bFGF não

foi analisado por AFM e nem ângulo de contato, portanto, não possuímos dados para comparação. O motivo da exceção do filme PAH/proteína pode ser explicado pela maneira de como filmes LbL de proteínas se formam, pois cada camada depositada equivale a duas camadas de material [Landam et al., 2001]. Isso permite que o filme PAH/proteína apresente alta absorvência, mas mantenha a superfície do filme homogênea. A segunda exceção observada (os altos ângulos no filme PAH/HA) permanece sem entendimento.

A rugosidade, porém, parece não influenciar no desenvolvimento dos fibroblastos. Os ângulos de contato também não, apesar de sabermos que ângulos fora de 60-80° possam reduzir o desempenho biológico de células, mas podemos considerar o fibroblasto como exceção [Lanza et al, 2007].

A proliferação celular propriamente dita parecer estar mais relacionada com as cargas envolvidas e degradação do filme do que outras características físicas. Baseando-se para tanto, nas diferenças entre os resultados de proliferação/espalhamento e degradação dos filmes com PAH e PEI. Os tipos de policações parecem influenciar no desenvolvimento celular, sendo que o emprego de PAH permitiu a obtenção de resultados melhores em curtos períodos. No entanto, os índices proliferativos dos filmes com PEI foram superiores em períodos longos. Acreditamos que a diferença destes resultados esteja relacionada com a degradação dos filmes, cujo decaimento de material foi mais pronunciado nos filmes com PAH do que PEI. Possivelmente seja necessária que leve degradação nos filmes com PEI, ou adsorção de meio de cultura, ocorra para que haja proliferação celular nessas amostras.

Para facilitar a visualização (de parte) das correlações descritas acima, os dados quantizáveis deste trabalho foram resumidamente dispostos na **Tabela 14**. Na tabela constam os tempos usados na obtenção dos filmes com a respectiva linearidade e absorvência máxima detectada na confecção, assim como os dados de rugosidade e ângulo de contato. A atividade biológica do filme foi traduzida em percentual positivo ou negativo em relação ao apresentado no controle.

Tabela 14: Resumo dos Resultados Quantificáveis

Filmes LbL	Tempos deposição ¹ (min.)	Abs. ² (u.a.)	Linearidade (R ²)	Rugosidade ³ (nm)	Ângulo de contato ⁴ (°)	Bioatividade ⁵ (%)		
						7d	14d	21d
PAH/HA	3 e 5	0,147	0,972	7,7	75,6	53,1	-2,1	-48,8
PAH/HA+látex	3 e 5	0,192	0,990	71,8	74,4	105,4	34,2	-46,0
PAH/látex	3 e 5	0,204	0,839	32,5	89,8	142,9	72,6	42,3
PAH/proteína pH 3,0	3 e 5	0,215	0,948	3,7	-	-	-	-
PAH/proteína pH 7,4 (desnat.)	3 e 3	0,483	0,968	-	-	-86,5	-88,0	-78,1
PAH/proteína pH 7,4 (<i>in natura</i>)	3 e 3	0,401	0,959	5,3	67,5	-96,4	-97,9	-91,0
PAH/proteína pH 9,0	3 e 3	0,351	0,871	4,3	-	-	-	-
PEI/HA	3 e 5	0,584	0,999	25,1	60,5	-38,8	34,0	125,4
PEI/HA+látex	3 e 5	1,173	0,996	34,2	77,4	-44,7	23,4	25,2
PEI/látex	3 e 5	1,391	0,991	120,3	87,8	-67,7	-80,7	-61,7
PEI/proteína pH 3,0	3 e 5	0,149	0,911	6,8	-	-	-	-
PEI/proteína pH 7,4 (desnaturada)	3 e 3	1,760	0,990	-	-	-90,4	-90,9	-90,0
PEI/proteína pH 7,4 (<i>in natura</i>)	3 e 3	0,667	0,995	7,6	67,8	-98,4	-99,4	-99,2
PEI/proteína pH 9,0	3 e 3	1,088	0,993	4,4	-	-	-	-
PEI/heparina	3 e 3	0,176	0,981*	2,2	54,7	-93,7	-92,3	12,9
PEI/heparina+bFGF	3 e 3	0,274	0,995*	-	-	-48,7	-86,6	-95,0

1) Tempos respectivos para policatión e poliânion. 2) Absorbância em 10bc. 3) Nos filmes com 5bc. 4) Resultados dos filmes com 9 camada. 5) Resultados em % do controle. * filmes com crescimento exponencial.

10 CONCLUSÕES

Os parâmetros usados na confecção dos filmes LbL propostos foram adequados, permitindo a obtenção de filmes com crescimento linear, com exceção dos filmes do sistema de heparina que apresentaram crescimento exponencial. O ensaio de degradação comprovou que os filmes não degradaram completamente no período avaliado de 21 dias. Pelas análises de microscopias verificamos que os filmes LbL propostos recobriram satisfatoriamente a superfície, e os filmes de látex apresentaram partículas dispersa e aglomeradamente depositadas como previsto na literatura. Os ensaios biológicos revelaram que os filmes PAH/Látex, PEI/HA, PAH/HA+látex, PEI/HA+látex, PAH/HA e PEI/heparina apresentaram proliferação celular positiva, em ordem decrescente, mantendo-se por até 21 dias. Com exceção dos filmes de heparina, todos os sistemas LbL apresentaram desempenho biológico superior as soluções testadas separadamente. Os melhores filmes, considerando os índices proliferativos e a morfologia celular foram PAH/Látex, PEI/HA, PAH/HA+látex, PAH/HA. Os filmes como PAH/látex apresentaram bioatividade até 79% do detectado no bFGF, e permitiram que fibroblastos humanos normais proliferassem até 143% mais do que sobre poliestireno. Através desses resultados concluímos que esses filmes LbL são candidatos para uso como biomaterial. Entretanto, ao contrario do inicialmente esperado, as proteínas do látex natural não apresentaram atividade biológica, quer estivessem na forma de filmes LbL, monocadas de proteínas ou mesmo dispersas no meio de cultura, independente da concentração usada. Isso implica que a ação biológica detectada nos filmes de látex natural não foi definida pelas proteínas estudadas. Em suma, os filmes propostos foram “automontados” sobre diferentes superfícies: poliméricas, cerâmicas e metálicas; com bons parâmetros para possível comercialização. O tempo de fabricação foi viável, assim como as condições para a manufatura em escala industrial: temperatura ambiente; soluções muito diluídas; e esterilização rápida e barata.

11 PRÓXIMAS ETAPAS

Os objetivos foram alcançados e os melhores sistemas foram identificados, entretanto, algumas caracterizações como FTIR permanecem não realizadas para todos os sistemas. Todavia, devido a seus baixos desempenhos biológicos não seja interessante permanecer no estudo destes filmes. Entretanto, ensaios biológicos mais aprofundados como ensaio em membrana corioalantóica (CAM) para avaliar a angiogênese, PCR para identificar expressão gênica ou mesmo análises histológicas da matriz extracelular serão necessários. Sem estes estudos não há como permitir a aplicação dos filmes PAH/látex; PAH/HA+látex; PAH/HA; PEI/HA e PEI/HA+látex como biomateriais. Os resultados deste trabalho sugerem que futuras avaliações com concentrações mais baixas de PEI e/ou seu uso em outro pH (com menor densidade de cargas), deve elevar a ação proliferativa dos filmes. Terminar os filmes LbL com uma camada de PEI ao invés de poliânions talvez tenha o mesmo efeito.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, S. A. Growth-factor and cancer. *Science* [S.I.], v. 254, n. 5035, p. 1146-1153, 1991.
- ADAMCZYK, Z. *et al.* Formation of multilayered structures in the layer by layer deposition of colloid particles. *Journal of Colloid and Interface Science* [S.I.], v. 317, n. 1, p. 1-10, 2008.
- _____. Modelling self-assembling of colloid particles in multilayered structures. *Applied Surface Science* [S.I.], v. 253, n. 13, p. 5776-5780, 2007.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular biology of the cell*. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.
- ATCC. MTT Cell Proliferation Assay. v. 2008. n. fev. Manassas USA: American Type Culture Collection - ATCC, []. p. <http://www.atcc.org/common/documents/pdf/30-1010k.pdf>.
- BAI, S. L. *et al.* Hydrogen-bonding-directed layer-by-layer polymer films: Substrate effect on the microporous morphology variation. *European Polymer Journal* [S.I.], v. 42, n. 4, p. 900-907, 2006.
- BARBANTI, S. H. *et al.* Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros* [S.I.], v. 15, n. 1, 2005.
- _____. Degradação acelerada de suportes de poli(épsilon-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. *Polímeros* [S.I.], v. 16, n. 2, 2006.
- BOAL, D. H. *Mechanics of the cell*. New York: Cambridge University Press, 2002.
- BOKMA, E. *et al.* Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *European Journal of Biochemistry* [S.I.], v. 269, n. 3, p. 893-901, 2002.
- BUCK, C. B. *et al.* Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *Plos Pathogens* [S.I.], v. 2, p. 671-680, 2006.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Bioquímica*. Thomson Learning, 2007.
- CAO, G. *Nanostructures & Nanomaterials - Synthesis, properties & applications*. London: Imperial College Press, 2004. Cap.8.2.3. p. 336-337.
- CARNEVAROLO JR, S. *Técnicas de caracterização de polímeros*. Sao Paulo: Artliber Editora, 2003.
- CASTALDI, P. *et al.* Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management* [S.I.], v. 25, n. 2, p. 209-213, 2005.
- CHEUNG, J. H. *et al.* Molecular-level processing of conjugated polymers .3. Layer-by-layer manipulation of polyaniline via electrostatic interactions. *Macromolecules* [S.I.], v. 30, n. 9, p. 2712-2716, 1997.
- COUTINHO, J.; MRUE, F. *Microporous latex membrane useful in clinical applications such as wound healing, is obtained by applying latex suspension to surface to produce latex coated surface, and subjecting latex coated surface to various temperatures*. n. WO2005008932-A2; US2005049331-A1, 2005.
- CRESPILHO, F. N. *et al.* Immobilization of humic acid in nanostructured layer-by-layer films for sensing applications. *Environmental Science & Technology* [S.I.], v. 39, n. 14, p. 5385-5389, 2005.
- D'AUZAC, J. *et al.* *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton: CRC press, Inc., 1989.
- DE GENNES, P-G. *et al.* *Capillarity and Wetting Phenomena: drops, bubbles, pearls, waves*. Springer, 2004.

- DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* [S.I.], v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- DUPUY, N.; DOUAY, F. Infrared and chemometrics study of the interaction between heavy metals and organic matter in soils. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 1037-1047, 2001.
- ELZIECIAK, A. *et al.* Influence of pH on the Structure of Multilayer Films Composed of Strong and Weak Polyelectrolytes. *Langmuir* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 3255-3259, 2009.
- EROL, M. *et al.* Control of specific attachment of proteins by adsorption of polymer layers. *Langmuir* [S.I.], v. 22, n. 26, p. 11329-11336, 2006.
- FERREIRA, M. *et al.* Study of Bioactive Films using natural Macromolecules. *Nanotech 2006*. v. c2. Boston, USA2006. p. 129-132.
- FISHER, J. *et al.* *Tissue Engineering*. London: Ccpress, 2007.
- FUKUDA, J. *et al.* Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* [S.I.], v. 27, n. 8, p. 1479-1486, 2006.
- GALIANI, P. *et al.* Composites of natural rubber with polyaniline. *POLIMEROS* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 93-97, 2007.
- GIORDANI, R. *et al.* Antifungal action of Hevea brasiliensis latex. Its effect in combination with fluconazole on Candida albicans growth. *Mycoses* [S.I.], v. 42, n. 7-8, p. 465-474, 1999.
- _____. Antifungal effect of Hevea brasiliensis latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against Candida albicans. *Mycoses* [S.I.], v. 45, n. 11-12, p. 476-481, 2002.
- GOUVEIA, R. F. *et al.* Electrostatic patterning of a silica surface: A new model for charge build-up on a dielectric solid. *Journal of Physical Chemistry B* [S.I.], v. 109, n. 10, p. 4631-4637, 2005.
- GUYTON; ARTHUR. *Fisiologia Humana*. 6°. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.
- HARTGERINK, J. D. *et al.* Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 99, n. 8, p. 5133-5138, 2002.
- HAYASHI, Y. Production of natural rubber from Para rubber tree. *Plant Biotechnology*. v. 26, p. 67-70, 2009.
- HEALEY, A. M. *et al.* A Fourier-transform Raman study of the strain-induced crystallization and cold crystallization of natural rubber. *Polymer* [S.I.], v. 37, n. 18, p. 4009-4024, 1996.
- HIKITA, M. *et al.* Super-liquid-repellent surfaces prepared by colloidal silica nanoparticles covered with fluoroalkyl groups. *Langmuir* [S.I.], v. 21, n. 16, p. 7299-7302, 2005.
- HOSSEINKHANI, H. *et al.* Enhanced angiogenesis through controlled release of basic fibroblast growth factor from peptide amphiphile for tissue regeneration. *Biomaterials* [S.I.], v. 27, n. 34, p. 5836-5844, 2006.
- HUBSCH, E. *et al.* Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: Changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. *Langmuir* [S.I.], v. 20, n. 5, p. 1980-1985, 2004.
- IZQUIERDO, A. *et al.* Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir* [S.I.], v. 21, n. 16, p. 7558-7567, 2005.
- ISRAELACHVILI; J. *Intermolecular & surface forces*. 2°. ed. EUA: Academic Press, 1991.

JONHSTON, E.; RATNER, B. Surface characterization of plasma deposited organic thin films. *J.ELET.SPECT.REL.PHENOM.* [S.I.], v. 81, p. 303-317, 1995.

KANG, I. K. *et al.* Co-culture of hepatocytes and fibroblasts by micropatterned immobilization of beta-galactose derivatives. *Biomaterials* [S.I.], v. 25, n. 18, p. 4225-4232, 2004.

KOWALSKI, E. L. *Estudo da borracha natural por meio de técnicas de caracterização de dielétricos.* (2006). (Doutor) - Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2006.

KIZILEL, S. *et al.* Sequential formation of covalently bonded hydrogel multilayers through surface initiated photopolymerization. *BIOMATERIALS* [S.I.], v. 27, n. 8, p. 1209-1215, MAR 2006 2006.

LADAM, G. *et al.* Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: Interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules* [S.I.], v. 1, n. 4, p. 674-687, 2000.

_____. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Langmuir* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 878-882, 2001.

LANZA, R. *et al.* *Principles of tissue engineering.* 3. ed.: Elsevier Academic Press, 2007.

LAVALLE, P. *et al.* Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* [S.I.], v. 35, n. 11, p. 4458-4465, 2002.

LEE, K. W. *et al.* Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan. *Transplantation Proceedings* [S.I.], v. 36, n. 8, p. 2464-2465, 2004.

LEGUEN, E. *et al.* Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomolecular Engineering* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 33-41, 2007.

LI, L. *et al.* Chemical and molecular heterogeneity of humic acids repetitively extracted from a peat. *Soil Science Society of America Journal* [S.I.], v. 67, n. 3, p. 740-746, 2003.

LOBO, A. D. O. *Biocompatibilidade de superfícies recobertas por nanotubos de carbono.* (2008). 178 f. (Tese de Mestrado) - Curso de Engenharia Aeronáutica e Mecânica - Área de Física e Química de Materiais, Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2008.

LVOV, Y. *et al.* Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen. *THIN SOLID FILMS* [S.I.], v. 285, p. 797-801, SEP 15 1996 1996.

_____. Non-linear optical effects in layer-by-layer alternate films of polycations and an azobenzene-containing polyanion. *THIN SOLID FILMS* [S.I.], v. 300, n. 1-2, p. 107-112, MAY 28 1997 1997.

MAO, Z. W. *et al.* Bioactive thin film of acidic fibroblast growth factor fabricated by layer-by-layer assembly. *Bioconjugate Chemistry* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 1316-1322, 2005.

MARMUR, A. The lotus effect: Superhydrophobicity and metastability. *Langmuir* [S.I.], v. 20, n. 9, p. 3517-3519, 2004.

MENDELSON, J. D. *et al.* Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 96-106, 2003.

MENDONÇA, R. J. D. *Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no látex natural da seringueira *Havea brasiliensis*.* (2008). 136 p. + anexos f. (Tese Doutorado) - FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2008.

- MORTON, M. *RUBBER TECHNOLOGY*. 3°. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987.
- NELSON, D.; COX, M. *Lehninger - Princípios de bioquímica*. 4°. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2006.
- OLIVEIRA, J. *et al.* Myringoplasty using a new biomaterial allograft. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* [S.I.], v. 69, n. 5, p. 649-655, 2003.
- PARDELLAS, J. M., Un campus sólo para el Sur. In *El País*, 30/06/2008; http://www.elpais.com/articulo/sociedad/campus/solo/Sur/elpepisoc/20080630elpepisoc_4/Tes/: 2008.
- PARK, Y. S.; ITO, Y. Micropattern-immobilization of heparin to regulate cell growth with fibroblast growth factor. *Cytotechnology* [S.I.], v. 33, n. 1-3, p. 117-122, 2000.
- PATERNO, L. *et al.* Filmes ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: Preparação, propriedades e aplicações. *QUIMICA NOVA*. [S.I.], v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
- PELE NOVA S/A. *Biocure*®. Disponível em: <<http://www.pelenova.com.br>>. Acessado em: <10 jan. 2008.>.
- PENG, Z. *et al.* Self-assembled natural rubber/silica nanocomposites: Its preparation and characterization. *Composites Science and Technology* [S.I.], v. 67, p. 3130-3139, 2007.
- PEREZ, M. *et al.* Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *GEODERMA* [S.I.], v. 118, p. 181-190, 2004.
- PICART, C. *et al.* Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* [S.I.], v. 17, n. 23, p. 7414-7424, 2001.
- _____. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 99, n. 20, p. 12531-12535, 2002.
- PINHO, E. *et al.* Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *ARQ. BRAS. OFTALMOL.* [S.I.], v. 67, p. 27-32, 2004.
- POON, W. C. K.; ANDELMAN, D. *Soft condensed matter physics in molecular and cell biology*. Boca Raton - FL: CRC Press LLC, 2006.
- PORCEL, C. *et al.* From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* [S.I.], v. 22, n. 9, p. 4376-4383, 2006.
- _____. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. *Langmuir* [S.I.], v. 23, n. 4, p. 1898-1904, 2007.
- PUNIREDD, S. R.; SRINIVASAN, M. P. Covalent molecular assembly of multilayer dendrimer ultrathin films in supercritical medium. *Journal of Colloid and Interface Science* [S.I.], v. 306, n. 1, p. 118-127, 2007.
- PREDEEP, P. *et al.* Role of starch as a steric stabilizer for doping natural rubber: Effect on optical, electrical, mechanical, and morphological properties. *Journal of Elastomers and Plastics* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 333-348, 2006.
- RABELO, R. *et al.* Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. *ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE* [S.I.], v. 33, n. 2, p. 169-175, 2005.
- RAJANGAM, K. *et al.* Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels. *Nano Letters* [S.I.], v. 6, n. 9, p. 2086-2090, 2006.
- RAJ, S. *et al.* Relationship between latex yield of *Hevea brasiliensis* and antecedent environmental parameters. *International Journal of Biometeorology* [S.I.], v. 49, n. 3, p. 189-196, 2005.

- RAPOSO, M.; OLIVEIRA, O. N. Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. *Brazilian Journal of Physics* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 392-404, 1998.
- REN, K. F. *et al.* Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-L-lysine/DNA films. *Biomaterials* [S.I.], v. 27, n. 7, p. 1152-1159, 2006.
- RIPPEL, M. M. *et al.* Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. *Journal of Colloid and Interface Science* [S.I.], v. 268, n. 2, p. 330-340, 2003.
- _____. Direct imaging and elemental mapping of microgels in natural rubber particles. *Colloid and Polymer Science* [S.I.], v. 283, n. 5, p. 570-574, 2005.
- SALOMAKI, M. *et al.* Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* [S.I.], v. 21, n. 24, p. 11232-11240, 2005.
- _____. Counteranion-controlled properties of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules* [S.I.], v. 37, n. 25, p. 9585-9590, 2004.
- SANGRIBSUB, S. *et al.* Adsorption of polystyrene-poly(4-vinylpyridine) diblock copolymer on the assembled latex film. *European Polymer Journal* [S.I.], v. 41, n. 7, p. 1531-1538, Jul 2005.
- SCHEIN, L. B. Applied physics - Recent progress and continuing puzzles in electrostatics. *Science* [S.I.], v. 316, n. 5831, p. 1572-1573, 2007.
- SCHULTZ, P. *et al.* Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* [S.I.], v. 26, n. 15, p. 2621-2630, May 2005.
- SILVERSTEIN, R. *et al.* *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2007.
- SKOOG, D. A. *et al.* *Principles of Instrumental Analysis*. 6. ed.: Cengage Learning, 2006.
- SRUANGANURAK, A. *et al.* Layer-by-layer assembled nanoparticles: A novel method for surface modification of natural rubber latex film. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* [S.I.], v. 289, n. 1-3, p. 110-117, 2006.
- STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Molecular-level processing of conjugated polymers .4. Layer-by-layer manipulation of polyaniline via hydrogen-bonding interactions. *Macromolecules* [S.I.], v. 30, n. 9, p. 2717-2725, 1997.
- TAMMELA, T. *et al.* Distinct architecture of lymphatic vessels induced by chimeric vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor heparin- binding domain fusion proteins. *Circulation Research* [S.I.], v. 100, n. 10, p. 1468-1475, 2007.
- TAN, W.; DESAI, T. A. Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures. *Biomaterials* [S.I.], v. 25, n. 7-8, p. 1355-1364, 2004.
- THOMAS, K. A.; GIMENEZGALLEGO, G. FIBROBLAST GROWTH-FACTORS - BROAD-SPECTRUM MITOGENS WITH POTENT ANGIOGENIC ACTIVITY. *Trends in Biochemical Sciences* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 81-84, 1986.
- ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews* [S.I.], v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- VALADARES, L. F. *et al.* Electrostatic adhesion of nanosized particles: The cohesive role of water. *Journal of Physical Chemistry C* [S.I.], v. 112, n. 23, p. 8534-8544, 2008.
- VENANCIO, E. C. *et al.* Influence of the pH and substrate immersion time on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) in self-assembled films. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [S.I.], v. 16, n. 3B, p. 558-564,

2005.

VOLODKIN, D. *et al.* Composite multilayered biocompatible polyelectrolyte films with intact liposomes: stability and temperature triggered dye release. *Soft Matter* [S.I.], v. 4, p. 122-130, 2008.

_____. Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. *Journal of Controlled Release* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 111-120, 2007.

WEN, J. *et al.* Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical Biochemistry* [S.I.], v. 240, n. 2, p. 155-166, 1996.

WOOD, K. C. *et al.* Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. *Langmuir* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 1603-1609, 2005.

YANG, T. *et al.* Positively charged polyethylenimines enhance nasal absorption of the negatively charged drug, low molecular weight heparin. *Journal of Controlled Release* [S.I.], v. 115, n. 3, p. 289-297, 2006.

YAO, N.; WANG, Z. *Electron Scanning Microscopy Handbook of microscopy for nanotechnology*. USA: Klüwer Academic Publishers, 2005. Cap.11. p. 325-358.

ZIMMERBERG, J.; KOZLOV, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 9-19, 2006.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Biocompatibility and resistance test of latex membranes in dogs. *Ciência Rural* [S.I.], v. 37, n. 6, p. 1719-1723, 2007.

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](#)