



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

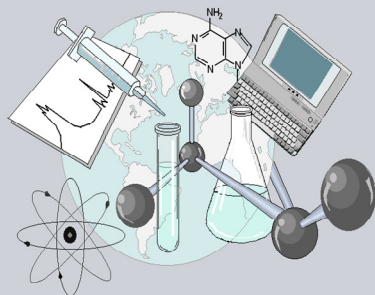
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos
tipo LbL a base de N,N,N-trimetilquitosana e Heparina”**

Tese apresentada por *Heveline Dal Magro Follmann* ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, Abril de 2014

Heveline Dal Magro Follmann

**Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos
tipo LbL a base de N,N,N-trimetilquitosana e
Heparina.**

**Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a Obtenção do**

Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz

MARINGÁ

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

F668p Follmann, Heveline Dal Magro
Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos tipo LbL a base de N,N,N-trimetilquitosana e Heparina / Heveline Dal Magro Follmann. -- Maringá, 2014.
166 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Quitosana. 2. Derivados N-quaternários. 3. Layer-by-Layer. 4. Heparina. 5. Propriedades bactericida e antiadesiva. 6. Fibroblastos NIH/3T3. I. Muniz, Edvani Curti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 541.33

AHS



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Heveline Dal Magro Follmann**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 04 de abril de 2014.

COMISSÃO JULGADORA:



.....
Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
PRESIDENTE - DQ/UEM



.....
Prof. Dr. Adley Forti Rubira
MEMBRO - DQ/UEM



.....
Prof. Dr. Eduardo Radovanovic
MEMBRO - DQ/UEM



.....
Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri
MEMBRO - IQ/USP



.....
Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva
MEMBRO - DQ/UFSCAR

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor e carinho,
por estarem sempre ao meu lado.

"Nós não somos apenas resultado ou soma das nossas decisões e escolhas. Também somos resultado de uma série infindável de acasos bons e ruins. Eles ora entortam a nossa régua, ora põem asas na ponta do compasso."

Fernanda Pompeu

Agradecimentos

À Deus, pela vida e presença constante em todos os momentos. Por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Dary e Mari, e às minhas irmãs Helem e Hioná, por serem meu apoio de vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edvani C. Muniz, pela orientação, discussões enriquecedoras, dedicação, paciência e a amizade construída durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Gero Decher por me acolher e proporcionar a incrível experiência de trabalhar no seu grupo, por ter me dado uma das maiores oportunidades científicas e culturais.

Aos Profs. Drs. Adley F. Rubira, Wilker Caetano, Eduardo Radovanovic, Denise Freitas Siqueira Petri e Caio Marcio Paranhos da Silva, pelas preciosas sugestões e contribuições como membros componentes da Banca Examinadora.

Ao Dr. Olivier Félix por ter me ajudado com a burocracia e a vida na França. Pela ajuda no laboratório e nas discussões científicas.

Ao meu amigo Dr. Alessandro F. Martins pela ajuda na parte experimental e redação do capítulo III.

As minhas amigas Alliny Naves e Maria Alice Witt por terem me auxiliado quando cheguei à França, pela ajuda no laboratório, pelos momentos de descontração, por terem sido a minha família durante minha estadia em Estrasburgo.

À toda a família do Laboratório 18, aos que passaram e aos que continuam presentes em todos os momentos: Cátia, Guilherme, Letícia B, André, Fernanda, Pedro, Marília, Letícia, Paulo, Maroane, Bárbara, Juliana, Adonilson, Hélder, Lila e Ismael, agradeço a amizade e a colaboração ao longo desses quatro anos de trabalho.

Aos amigos e colegas do ICS: Souvik, Michel, Rémi, Rebecca, Paul, Marek, Yulia, Marvin, David, Andru, Franck, Christiane, Seydina, Hebing, XiaoFeng, Teru, Mathias, Rahul, Ying, TongTong, Akkiz, Andréas, pela amizade, pelos momentos de alegria e por me auxiliarem sempre que precisei durante o estágio no ICS.

Aos amigos Thais, Pedro, Yasmine, Helena, Alexandra (Nossa Portuguesa), Juliano, Bruno, Juliana, Omar, Patrick, pela amizade, companheirismo, por tornarem minha estadia na França mais feliz, pelos momentos que jamais esquecerei.

Aos amigos da Pós-graduação: Adriana, Cris, Bianca, Manu, Bruno, Diogo, Ernandes, Michele, Dani, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Ao professor Celso V. Nakamura e ao seu grupo de pesquisa pela valiosa colaboração científica.

Aos colegas e Professores do grupo GMPC.

À minha amiga Dra. Adriana Passarella pelos ensaios biológicos.

Ao Dr. Thiago Burgo pelas análises de Microscopia de Força de Kelvin.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e ao Departamento de Química, da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade.

À Capes pela bolsa no Brasil e pela bolsa sanduíche.

Ao Instituto Charles Sadron (ICS - Estrasburgo/França) por todo o amparo, infraestrutura e oportunidade.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho, MUITO OBRIGADA!

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Figuras e Esquemas	v
Lista de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
Capítulo 1	1
Considerações Iniciais	1
Capítulo 2	5
Revisão Bibliográfica	5
2.1. Filmes automontados.....	5
2.2. Quitosana (QT)	13
2.3. N,N,N-Trimetilquitosana (TMC)	18
2.4. Heparina (HEP)	23
Capítulo 3	27
Síntese e caracterização estrutural da TMC O-metilada e da TMC livre de grupos O-metílicos	27
Resumo	27
Abstract.....	28
3.1. Introdução	29
3.2. Parte Experimental	31
3.2.1. Materiais	31
3.2.2. Métodos	32
3.2.2.1. Síntese da N,N,N-trimetilquitosana O-metilada (TMC-OM).....	32
3.2.2.2. Síntese da N,N,N-trimetilquitosana livre de grupos O-metílicos (TMC-F)	33
I) Síntese da N,N-dimetilquitosana (DMC).....	33
II) Síntese da N,N,N-trimetilquitosana (TMC) a partir da DMC	34
3.3. Caracterização	34
3.3.1. Caracterização dos derivados da quitosana por meio de ^1H NMR.....	34
3.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	36
3.3.3. Difração de Raios-X (XRD)	36
3.3.4. Análise Termogravimétrica (TGA)	36
3.4. Resultados e Discussão.....	36
3.4.1. Caracterização da N,N,N-trimetilquitosana por meio de ^1H NMR	36

3.4.1.1. N,N,N-trimetilquitosana com grupos O-metílicos (TMC-OM)	36
3.4.1.2. N,N,N-trimetilquitosana livre de grupos O-metílicos (TMC-F)	39
3.4.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	41
3.4.3. Difração de Raios-X (XRD)	43
3.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)	45
3.5. Conclusões.....	46
Capítulo 4.....	48
Filmes de multicamadas antiadesivos e antibacterianos formados por complexos de TMC/Heparina por meio da técnica de automontagem Layer-by-Layer	48
Resumo	48
Abstract.....	49
4.1. Introdução	50
4.2. Parte Experimental	52
4.2.1. Materiais	52
4.2.2. Métodos	53
4.2.2.1. Modificação da superfície do poliestireno por oxidação.....	53
4.2.2.2. Preparação dos Filmes Finos de Multicamadas.....	53
4.2.3. Análise da superfície	54
4.2.3.1. Medições do ângulo de contato	54
4.2.3.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) .	54
4.2.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)	55
4.2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	55
4.2.3.5. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	55
4.2.3.6. Microscopia de Força de Kelvin (KFM)	55
4.2.4. Adesão inicial da Escherichia coli (E.coli) sobre substratos de PS-mod com filmes finos de multicamadas de TMC/Heparina.....	56
4.2.5. Teste antibacteriano <i>in vitro</i>	57
4.2.6. Liberação <i>in vitro</i> da Heparina	57
4.3. Resultados e Discussão.....	58
4.3.1. Modificação química da superfície do poliestireno (PS) para obter o PS-mod....	58
4.3.1.1. Medidas de ângulo de contato	58
4.3.1.2. Análise de AFM e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	59
4.3.2. Caracterização das multicamadas adsorvidas sobre a superfície do PS-mod.....	61
4.3.2.1. Espectroscopia de FTIR-ATR	61

4.3.2.2. Análise de AFM	64
4.3.2.3. Análise por meio de SEM.....	70
4.3.2.4. Análise de KFM	72
4.3.3. Adesão inicial da E.coli sobre superfícies de PS-mod e filmes de multicamadas de TMC/Heparina.....	75
4.3.4. Teste antibacteriano in vitro	78
4.3.5. Liberação in vitro da heparina	83
4.4. Conclusões.....	85
Capítulo 5.....	87
Obtenção e caracterização de filmes finos de derivados da Quitosana livres de O-metilação: aplicações em estudos celulares.....	87
Resumo	87
Abstract.....	88
5.1. Introdução.....	89
5.2. Parte Experimental	91
5.2.1. Materiais	91
5.2.2. Métodos	91
5.2.2.1. Medidas de Potencial Zeta.....	91
5.2.2.2. Preparação dos filmes finos tipo LbL.....	92
5.2.3. Análise da superfície	94
5.2.3.1. Elipsometria.....	94
5.2.3.2. Ângulo de contato.....	95
5.2.3.3. AFM	95
5.2.3.4. QCM-D.....	95
5.2.4. Ensaio de proliferação celular	96
5.2.4.1. Medida da viabilidade celular usando Azul de Tripiano	96
5.2.4.2. Medida da viabilidade celular usando o Teste de MTT	97
5.2.5. Estabilidade dos filmes em DMEM.....	97
5.2.6. Ensaio de Citotoxicidade	98
5.3. Resultados e Discussão.....	98
5.3.1. Medidas de Potencial Zeta.....	98
5.3.2. Caracterização físico-química dos filmes finos de multicamadas.....	100
5.3.2.1. Elipsometria.....	101
5.3.2.2. Ângulo de contato.....	105

5.3.2.3. AFM	108
5.3.2.4. QCM-D	111
5.3.3. Ensaio de viabilidade celular	117
5.3.4. Efeito da concentração de NaCl na proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 sobre filmes LbL obtidos por imersão	124
5.3.4.1. Caracterização dos filmes finos de multicamadas	124
5.3.4.2. Ensaio de MTT	127
5.3.5. Estabilidade dos filmes multicamadas em DMEM	131
5.3.6. Ensaio de citotoxicidade	138
5.4. Conclusões	140
Capítulo 6	141
Considerações Finais	141
Capítulo 7	143
Referências	143

Lista de Abreviaturas e Siglas

¹H NMR - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

AFM - Microscopia de força atômica

AM - Azul de metileno

CHI - Quitosana

DMC - N,N-dimetilquitosana

DMEM - Soro humano em Dulbecco's modified Eagle's medium

DQ - Grau de quaternização

E.Coli - Escherichia Coli

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva

EIS - Espectroscopia de impedância eletroquímica

ePTFE - Politetrafluoretileno expandido

FGF - Fator de crescimento de fibroblasto

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho

GD - Grau de dimetilação

GQ - Grau de quaternização

HA - Ácido Hialurônico

HEP - Heparina

HUVECs - Células endoteliais da veia umbilical humana

KFM - Microscopia de Força de Kelvin

LB - Langmuir - Blodgett

LbL - Layer-by-layer

LEDs - Dispositivos de emissores de luz

LMWHEP - Heparina de baixa massa molar

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

M_v - Massa molar viscosimétrica

NCS - Soro de vitelo recém-nascidos

ND - Grupos N-dimetilados

NM - Grupos N-monometilados

NMP - N-metil-2-pirrolidona

⁺NT - Grupos N-trimetilados

PAA - Poli(ácido acrílico)

PAH - Poli(cloridrato de alilamina)

PBS - Solução salina tamponada

PEC - Complexos polieletrólitos

PEG - Polietilenoglicol

PEI - Poli(etileno imina)

PET - Poli(etileno tereftalato)

PSS - Poli (estireno sulfonato)

PS-mod - Poliestireno oxidado (Poliestireno modificado)

PVC - Poli (cloreto de vinila)

PZ - Potencial Zeta

QCM-D - Microbalança de cristal de quartzo

QT - Quitosana

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

SGF - Fluido gástrico simulado

SIF - Fluido intestinal simulado

SSCIS - Técnica de "*Simultaneous spray coating of interacting species*"

TEER - Resistência elétrica transepitelial

TGA - Análise termogravimétrica

TMC - N,N,N-trimetilquitosana

TMCMC - N,N,N-trimetil-O-carboximetil quitosana

TMC-F - N,N,N-trimetilquitosana livre O-metilação (N,N,N-trimetilquitosana obtida após diálise)

TMC-OM - N,N,N-trimetilquitosana O-metilada (N,N,N-trimetilquitosana O-metilada blindada pelo íon cloreto)

TMC20 - N,N,N-trimetilquitosana O-metilada com grau de quaternização de 20%

TMC80 - N,N,N-trimetilquitosana O-metilada com grau de quaternização de 80%

TMI - Iodeto de N,N,N-trimetilquitosana

TSA - Agar Trípico de Soja

UFC - Unidades formadoras de colônias

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

XRD - Difração de Raios - X

Nota: Para efeito de padronização as técnicas de caracterização foram abreviadas conforme os seus nomes em inglês.

Lista de Figuras e Esquemas

Capítulo 2

Figura 2.1. Esquema do processo de deposição por imersão. Etapas 1 e 3 representam a deposição de Poliânion e Policátion, respectivamente; Etapas 2 e 4 representam o processo de lavagem. FONTE: Adaptado de Decher (1997). (pg. 6)

Figura 2.2. Modelo de Zona para as multicamadas de polieletrólitos. A seta mostra o desenvolvimento das zonas durante a deposição do filme. O primeiro par de camadas é mostrado no lado esquerdo e, um filme que consiste em várias camadas é mostrado à direita. Nota-se que, uma vez que todas as três zonas são estabelecidas, somente a Zona II cresce com o aumento do número de camadas. FONTE: Adaptado de Decher e Schlenoff (2002). (pg. 8)

Figura 2.3. Esquema do processo de deposição por *spray*. Etapas 1 e 3 representam a deposição de Poliânion e Policátion, respectivamente; Etapas 2 e 4 representam o processo de lavagem. FONTE: Benkirane-Jessel et al. (2007). (pg. 10)

Figura 2.4. Representação esquemática do preparo de filmes finos e homogêneos por revestimento rotacional (*spin-coating*) sobre lâminas de silício. FONTE: Adaptado de Kosaka (2007). (pg. 12)

Figura 2.5. Unidades monossacarídicas repetitivas da Quitosana (QT). (pg. 14)

Figura 2.6. Estrutura da N,N,N-trimetilquitosana (TMC). (pg. 19)

Figura 2.7. Unidades monossacarídicas repetitivas da Heparina (HEP). (pg. 23)

Capítulo 3

Figura 3.1. Rota sintética da TMC com grupos O-metílicos (TMC-OM). (pg. 37)

Figura 3.2. Espectros de ^1H NMR da QT (a), TMC20 (b) e TMC80 (c). (pg. 38)

Figura 3.3. Rota sintética da DMC e TMC livre de grupos O-metílicos (TMC). (pg. 40)

Figura 3.4. Espectros de ^1H NMR da QT (a), DMC (b) e TMC-F (c). (pg. 41)

Figura 3.5. Espectros de FTIR da QT (a), DMC (b), TMC-F (c), TMC20 (d) e TMC80 (e). (pg. 42)

Figura 3.6. Difrátogramas de raio-X da QT, DMC, TMC-F, TMC20 e TMC80. (pg. 44)

Figura 3.7. Curvas de TGA (a) e DTG (b) da QT e seus derivados. (pg. 45)

Capítulo 4

Figura 4.1. Imagens de AFM do PS: (a) virgem, (b) oxidado e (c) oxidado com uma camada de TMC80 adsorvida em pH 7,4. (pg. 59)

Figura 4.2. Espectro de EDS do PS-mod. (pg. 60)

Figura 4.3A. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP preparados em pH 3,0. (pg. 61)

Figura 4.3B. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 3,0. (pg. 62)

Figura 4.3C. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 7,4. (pg. 63)

Figura 4.4A. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP obtidos em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas. (pg. 65)

Figura 4.4B. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP obtidos em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas. (pg. 66)

Figura 4.4C. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP obtidos em pH 7,4 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas. (pg. 68)

Figura 4.5. Estruturas predominantes da TMC80, TMC20 e HEP. (pg. 69)

Figura 4.6A. Imagens de SEM dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP preparados em pH 3,0 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas. (pg. 71)

Figura 4.6B. Imagens de SEM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 3,0 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas. (pg. 71)

Figura 4.6C. Imagens de SEM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 7,4 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas. (pg. 71)

Figura 4.7A. Imagens de KFM do PS-mod (a) e filmes finos de 18 bicamadas de: (b) TMC20/HEP (pH 3,0), (c) TMC80/HEP (pH 3,0) e (d) TMC80/HEP (pH 7,4). (pg. 73)

Figura 4.7B. Imagens de KFM dos filmes finos de TMC20/HEP preparados em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b) e 12 (c) bicamadas e dos filmes finos de TMC80/HEP preparados em pH 7,4 com: 3 (d), 9 (e) e 12 (f) bicamadas. (pg. 74)

Figura 4.8. Micrografia eletrônica de varredura do (a) PS-mod, (b) filmes de multicamadas de (TMC20/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (c) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (d) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 7,4) após a exposição de 5×10^7 células·mL⁻¹ de *E. coli* por 4h. (pg. 76)

Figura 4.9. Microscopia de contraste de interferência de Normaski (400x) do: (a) PS-mod, (b) filmes de multicamadas de (TMC20/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (c) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (d) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 7,4) após a exposição de 5×10^7 células·mL⁻¹ de *E. coli* por 4h. (pg. 77)

Figura 4.10. Alteração da viabilidade das células *E.coli* com tempo de exposição (6 h) para os filmes de TMC20/HP (pH 3,0), TMC80/HEP (pH 7,4) e TMC80/HEP (pH 3,0), terminados em heparina. (pg. 78)

Figura 4.11. Alteração da viabilidade das células *E.coli* com tempo de exposição (6 h) para os filmes de TMC20/HP (pH 3,0), TMC80/HEP (pH 7,4) e TMC80/HEP (pH 3,0), terminados em TMC. (pg. 82)

Figura 4.12. Curva de liberação da HEP dos filmes de TMC/HEP em SIF (a) e em SGF (b). (pg. 84)

Capítulo 5

Figura 5.1. Representação esquemática dos filmes de multicamadas. (pg. 94)

Figura 5.2. Espessura média obtida por elipsometria dos filmes preparados em solução tampão pelo método de imersão (a), *spray* (b), *spin-coating* (c) e dos filmes preparados em 0,15 M NaCl pelo método de imersão (d), *spray* (e), *spin-coating* (f). Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. (pg. 102)

Figura 5.3. Ângulo de contato para os filmes preparados em solução tampão pelo método de imersão (a), *spray* (b), *spin-coating* (c) e para os filmes preparados em 0,15 M NaCl pelo método de imersão (d), *spray* (e); *spin-coating* (f). Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. A 1ª camada é PEI. Número pares se referem a deposição da HEP. (pg. 106)

Figura 5.4A. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por imersão: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em

0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. (pg. 108)

Figura 5.4B. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por *spray*: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em 0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. (pg. 109)

Figura 5.4C. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por *spin-coating*: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em 0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. (pg. 110)

Figura 5.5. Variação dos valores de frequência e dissipação durante a etapa de deposição das camadas de TMC e HEP, preparadas em 0,15 M NaCl. As setas indicam o início do processo de deposição do polieletrólito (TMC ou HEP) e de lavagem. (pg. 112)

Figura 5.6. Variação dos valores de frequência e dissipação, em função do número de camadas, durante a deposição das camadas do filme PEI(HEP/TMC)₅ em 0,15 M NaCl. Cada ponto no gráfico corresponde a deposição de uma camada de polieletrólito (TMC ou HEP). (pg. 114)

Figura 5.7. Proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 analisada no período de 7 dias para os filmes preparados pelo método de imersão (a), *spray* (b) e *spin-coating* (c). (pg. 118)

Figura 5.8A. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por imersão em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 121)

Figura 5.8B. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por *spray* em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 122)

Figura 5.8C. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por *spin-coating* em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 123)

Figura 5.9. Proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 analisada nos períodos de 1 (a) e 7 (b) dias para os sistemas em estudo. (pg. 128)

Figura 5.10A. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,0 M NaCl, após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 130)

Figura 5.10B. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,15 M NaCl, após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 130)

Figura 5.10C. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,5 M NaCl, após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 131)

Figura 5.11. Estudo da estabilidade *in vitro* dos filmes multicamadas frente ao DMEM para os filmes preparados pelo método de imersão nas concentrações de: 0,0 M (a);

0,15 M (b) e 0,5 M (c) de NaCl. As espessuras dos filmes foram obtidas em elipsômetro. (pg. 132)

Figura 5.12. Representação esquemática do primeiro processo de construção de camadas de albumina sobre filmes terminando com PAH. (a) Para baixas concentrações de albumina: não ocorre estruturação; (b) para altas concentrações de albumina: as moléculas de albumina adsorvem imediatamente e principalmente na configuração 'end-on' nos filmes de polieletrólito. Fonte: Ladam e colaboradores (2002). (pg. 133)

Figura 5.13A. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,0 M NaCl frente ao DMEM. (pg. 135)

Figura 5.13B. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,15 M NaCl frente ao DMEM. (pg. 136)

Figura 5.13C. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,5 M NaCl frente ao DMEM. (pg. 137)

Figura 5.14. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 em 0,0 M NaCl (a, b, c, d), 0,15 M NaCl (e, f, g, h) e 0,5 M NaCl (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul. (pg. 138)

Figura 5.15. Ensaio de citotoxicidade dos materiais em estudo preparados em diferentes concentrações de NaCl. (pg. 139)

Lista de Tabelas

Capítulo 4

Tabela 4.1. Valores de ângulo de contato das superfícies do PS virgem e PS-mod.
(pg. 59)

Capítulo 5

Tabela 5.1. Valores de Potencial Zeta (PZ) para as soluções de polieletrólitos utilizadas para a fabricação dos filmes multicamadas. (pg. 100)

Tabela 5.2. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para os sistemas preparados com 0,15 M NaCl. (pg. 115)

Tabela 5.3. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para os sistemas preparados em solução tampão. (pg. 116)

Tabela 5.4. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para a obtenção dos filmes finos. (pg. 125)

Tabela 5.5. Espessura média obtida por elipsometria dos filmes preparados em diferentes concentrações salinas. (pg. 126)

Tabela 5.6. Valores médios obtidos de ângulo de contato da superfície dos filmes preparados em diferentes concentrações salinas. (pg. 127)

Resumo

Derivados N-quaternizados da QT (DMC e TMCs) foram sintetizados por meio de diferentes metodologias e as suas estruturas químicas foram caracterizadas. As duas TMCs sintetizadas com grupos O-metílicos apresentaram graus de quaternização (GQ) iguais a 20 e 80%. A TMC livre de grupos O-metílicos, obtida a partir da N,N-dimetilquitosana (DMC), apresentou GQ = 25%. Todos os derivados foram utilizados na obtenção de filmes finos tipo LbL, juntamente com a Heparina (HEP). Os filmes foram caracterizados e submetidos a algumas aplicações para avaliar a eficiência dos sistemas. Filmes finos de TMC20/HEP e TMC80/HEP preparados em diferentes pHs foram submetidos a ensaios biológicos. Testes de adesão contra *E. coli* mostraram que houve redução da adesão da bactéria na superfície dos filmes. Testes antibacterianos mostraram que o sistema de TMC80/HEP (pH 7,4) apresentou atividade bactericida efetiva. Estudos *in vitro* da liberação controlada da HEP, realizados em fluido intestinal simulado (SIF) e em fluido gástrico simulado (SGF), mostraram que a liberação da HEP é fortemente pronunciada em meio SIF devido à ionização dos grupos $-NH_2$, $-NHCH_3$ e $-N(CH_3)_2$. Em uma segunda etapa deste trabalho, a DMC e TMC livre de grupos O-metílicos foram utilizadas na obtenção de filmes finos preparados por diferentes técnicas de deposição LbL (imersão, *spray* e *spin-coating*). Os filmes devidamente caracterizados foram submetidos a ensaios celulares utilizando fibroblastos NIH/3T3. Os resultados mostraram que a N-trimetilação tem efeito positivo na proliferação celular. Os filmes preparados pelo método de imersão apresentaram melhores resultados de viabilidade celular.

Palavras chave: Quitosana, derivados N-quaternários, Layer-by-Layer, heparina, propriedades bactericida e antiadesiva, Fibroblastos NIH/3T3.

Abstract

N-quaternized derivatives of chitosan (DMC and TMCs) were synthesized using different methods and their chemical structures were characterized. Two N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) with O-methylated groups were prepared and showed degree of quaternization (DQ) equal to 20 and 80%. O-methyl free TMC was obtained from N,N-dimethyl chitosan (DMC) and presented DQ = 25%. All the derivatives were used to obtain LbL thin films with heparin (HEP). The films were characterized and submitted to some applications and the efficiencies of the systems were evaluated. TMC20/HEP and TMC80/HEP thin films prepared at different pHs were submitted to biological assays. Assays against *E. coli* showed that the bacterial adhesion on the films surface was reduced. Antibacterial assays showed that the TMC80/HEP system prepared at pH 7.4 had effective bactericidal activity. *In vitro* controlled release of HEP, evaluated in simulated intestinal fluid (SIF) and simulated gastric fluid (SGF), showed that the release of HEP is strongly pronounced in SIF medium due to ionization of $-NH_2$, $-NHCH_3$ and $-N(CH_3)_2$ groups. In a second step of this work, the DMC and O-methyl free TMC were used to obtain thin films prepared by different LbL deposition methods (immersion, *spray* and *spin-coating*). After appropriated characterization, the films were submitted to cellular assays using NIH/3T3 fibroblasts. The results showed that N-trimethylation has a positive effect on cell proliferation. The films prepared by immersion method showed better results regarding cell viability.

Keywords: Chitosan, N-quaternary derivatives, Layer-by-Layer, heparin, bactericidal and antiadhesive properties, NIH/3T3 Fibroblasts.

Capítulo 1

Considerações Iniciais

Nos últimos anos, inúmeras publicações vêm descrevendo o grande interesse no estudo e na aplicação dos chamados biomateriais, principalmente no campo da biotecnologia. Isso se deve às diversas vantagens que os biomateriais possuem em relação aos materiais convencionais, tais como, baixa toxicidade, biocompatibilidade e custo aceitável, além de apresentarem um vasto campo de aplicações [1, 2]. Tais aplicações podem ser em implantes [3, 4], em dispositivos de diagnóstico e terapêuticos, na engenharia de tecidos [5, 6], e mesmo na fabricação de órgãos artificiais completos.

Biopolímeros de polissacarídeos, incluindo a quitosana, tem sido o foco de inúmeros estudos reportando o seu uso efetivo (ou em potencial) como biomateriais em aplicações biomédicas [7]. O desempenho desses biomateriais depende muito das suas propriedades de superfície, uma vez que é a superfície dos materiais que primeiro entra em contato com o ambiente biológico. Diversas abordagens tem sido aplicadas para a modificação de superfície de materiais de acordo com aplicações biomédicas específicas. A técnica de automontagem (em inglês, *Layer-by-Layer* (LbL)) de adsorção de polieletrólitos de carga oposta é um método eficiente na fabricação de filmes multicamadas de complexos de polieletrólíticos biocompatíveis sobre substratos [8]. Este método tem sido desenvolvido ao longo dos últimos anos como uma estratégia simples e poderosa para obter superfícies com propriedades específicas. O processo, impulsionado por interações eletrostáticas, envolve sequencialmente a imersão de um substrato carregado em soluções diluídas de polieletrólitos de carga oposta, permitindo ao polímero adsorver e reverter a carga superficial do substrato. Esta técnica oferece o

benefício de processamento livre de solvente, bem como a habilidade para revestir todas as superfícies disponíveis de materiais, independentemente da forma ou tamanho, com filmes ultrafinos uniformes e com espessura precisamente controlada, além de ser capaz de variar a composição dos filmes proporcionando enorme versatilidade e flexibilidade [9].

Existem na literatura diversos polieletrólitos que podem ser utilizados na construção de filmes automontados. Além dos polímeros sintéticos, polieletrólitos naturais também podem ser utilizados no método, entre eles destacam-se os ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos tal como a quitosana (QT) [10]. A QT tem sido frequentemente selecionada como a escolha primária para a construção de filmes multicamadas de aplicações biomédicas devido, principalmente, às suas excelentes propriedades biológicas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade de se aderir a superfícies mucosas e a possibilidade de se ligar a proteínas, genes e ácidos nucleicos [7, 9]. No entanto, a utilização da QT é limitada devido à sua baixa solubilidade em meios com pH próximo do fisiológico. Para superar essa limitação, pesquisadores têm sintetizado derivados quaternizados da QT, tal como a N,N,N-trimetilquitosana (TMC), a fim de aumentar a solubilidade aquosa e melhorar a sua atividade biológica [11].

Outro biopolímero que vem atraindo grande atenção nos últimos anos e sendo foco de inúmeros estudos científicos, é a heparina (HEP). Esta, por sua vez, é um polissacarídeo com característica aniônica amplamente utilizada na medicina, em dispositivos médicos e engenharia de tecidos, devido a sua potente ação antitrombótica. É um biopolímero bioativo, biodegradável, biocompatível e atóxico [12-14]. A combinação deste polissacarídeo com outros, como a QT e seus derivados, pode gerar novos materiais com maior potencial de aplicação que os materiais convencionais.

Nesta direção, Badr et al. [15] investigaram o uso da HEP modificada com QT para melhorar a biocompatibilidade de eletrodos de íons seletivos à base de polímeros altamente trombogênicos (por exemplo, PVC). Sun et al. [16] estudaram a deposição eletroforética de multicamadas de HA-quitosana e HEP. Eles investigaram os diferentes fatores que controlam a microestrutura de revestimento, cinética de adsorção e mecanismo de deposição dos filmes LbL. Ruan et al. [17] obtiveram multicamadas de filmes finos de QT/HEP e exploraram a morfologia dos filmes LbL formados por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, bem como investigaram as propriedades eletroquímicas relacionadas com o mecanismo de adsorção utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica. Meng et al. [18] construíram multicamadas de filmes finos de QT/HEP sobre *stents* coronários, projetados para a aceleração do processo de reendotelização e cicatrização após o implante do *stent*. Os resultados da cultura *in vitro* reafirmaram a lógica de que a combinação de QT e HEP pode levar a compatibilidade de células endoteliais e a hemocompatibilidade da superfície do *stent*. Fu et al. [13] estudaram as propriedades antiadesiva e antibacteriana dos filmes de HEP/QT sobre substratos de poli(etileno tereftalato) (PET) modificado. Eles verificaram a redução e mesmo morte dos microorganismos que estavam aderidos na superfície do PET quando comparado ao controle. Novello et al. [12] compararam métodos qualitativos e quantitativos de caracterização de revestimentos a base de HEP e lipídios sobre superfícies internas de tubos de poli(cloreto de vinila) (PVC) usados em procedimentos de circulação corpórea.

Mediante o relato e associando os temas mencionados, pode-se verificar que revestimentos de superfícies são importantes em ciência e tecnologia com aplicações que abrangem domínios tão diversos como os biomateriais. O uso da QT e seus

derivados em formulações com a HEP podem produzir sistemas que possuam aplicações como dispositivos biomédicos e assim produzir novos e inovadoras formas de materiais. Dessa maneira, na presente Tese foram estudados sistemas constituídos de TMC e heparina com o intuito de aplicá-los como biomateriais. A Tese está organizada da seguinte forma: No Capítulo 2 é descrita uma revisão bibliográfica dos materiais e métodos empregados na presente pesquisa. Os Capítulos 3, 4 e 5 estão apresentados na forma de artigos. No Capítulo 3 são descritas a síntese e a caracterização dos derivados N-quaternizados da QT (TMC O-metilada e TMC livre de grupos O-metílicos) que foram empregados nos capítulos subsequentes. Os Capítulos 4 e 5 tratam da fabricação, caracterização e aplicações de filmes finos preparados pelo método de deposição LbL. No Capítulo 4 são apresentados resultados relativos a TMC O-metilada; no Capítulo 5 são apresentados resultados referentes a TMC livre de grupos O-metílicos. Todos os dados/resultados apresentados no Capítulo 5 foram desenvolvidos no Instituto Charles Sadron, ICS (Estrasburgo-França), em colaboração com o professor Gero Decher. As considerações finais são apresentadas no Capítulo 6, e o Capítulo 7 fecha a Tese com as referências.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Filmes automontados

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para revestir substratos sólidos por meio de deposição de filmes finos orgânicos preparados a partir de soluções líquidas ou dispersões. O método mais antigo e mais estudado é a chamada deposição pelo método de Langmuir-Blodgett (LB), que produz filmes com elevado grau de orientação e organização estrutural. Nas últimas duas décadas, entretanto, pesquisadores vem buscando o desenvolvimento de técnicas mais versáteis, que apresentem maior facilidade de manuseio e de preparo de filmes finos. Dentre elas, destaca-se a técnica de automontagem camada-por-camada ou *Layer-by-Layer* (LbL), a qual vem se tornando uma das mais utilizadas [19].

A técnica LbL, de adsorção de polieletrólitos de cargas opostas, é um método eficiente de fabricação de filmes de multicamadas de macromoléculas biocompatíveis [8, 20]. Os filmes são normalmente formados pela adsorção consecutiva de polieletrólitos de cargas opostas em substratos específicos, por meio de interações tipo ligações de hidrogênio, eletrostáticas, etc. [20, 21]. Essa técnica foi proposta inicialmente por Sagiv [22] e, anos mais tarde, reformulada por Decher e Hong [21]. O método (Fig. 2.1) envolve sequencialmente a imersão de um substrato eletricamente carregado em soluções aquosas diluídas de polieletrólitos de cargas opostas, permitindo que o polímero ao ser adsorvido reverta a carga superficial predominante antes de sua adsorção. O processo pode ser repetido várias vezes, com a espessura da camada LbL determinada pelo número de imersões. Este método possui vantagens que incluem a

simplicidade, a universalidade, baixo custo operacional e o controle da espessura do filme LbL a qual pode variar da escala nano até vários *micra* [10, 21].

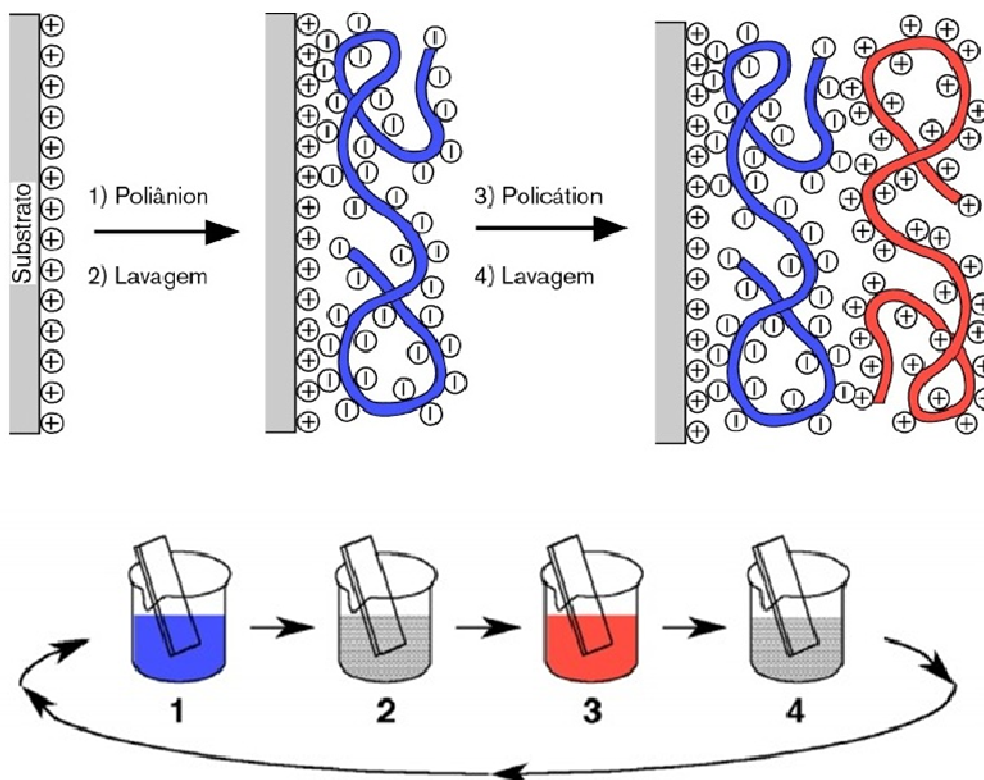


Figura 2.1. Esquema do processo de deposição por imersão. Etapas 1 e 3 representam a deposição de Poliânion e Policátion, respectivamente; Etapas 2 e 4 representam o processo de lavagem. FONTE: Adaptado de Decher (1997) [8].

Numerosos estudos são dedicados para entender o processo de construção dos filmes LbL. Dois regimes de construção, crescimento linear e crescimento exponencial, são reportados na literatura [23]. O regime linear é caracterizado pela formação de ilhas que crescem por adição de novos polieletrólitos no seu topo e por coalescência mútua. O regime exponencial ocorre quando um dos polieletrólitos pode difundir "dentro" e "fora" do filme todo [24]. A mudança entre o crescimento exponencial e o crescimento linear envolve a reestruturação do filme que progressivamente impede a difusão de um

dos polieletrólitos [25]. Acredita-se que a difusão dos polieletrólitos desempenha um papel importante no processo de construção dos filmes LbL [26]. Um modelo de mecanismo (Fig. 2.2) de construção constituído de três zonas (um precursor Zona I, um núcleo Zona II, e um exterior Zona III) tem sido proposto para explicar este fenómeno [27, 28]. A Zona I é adjacente ao substrato, a Zona II forma o "*bulk*" da multicamada e a Zona III é adjacente ao filme/solução ou filme/interface ar. A deposição dos primeiros pares de camada forma a Zona I, e a subsequente deposição de novas camadas forma a Zona III. A difusão e reestruturação nas camadas de fundo da Zona III leva a formação de uma região reestruturada denotada como Zona II. Esta é suposta ser a causa de impedir o progresso de difusão. As bordas entre essas zonas não são agudas, mas graduais. Zonas I, II e III são normalmente diferentes tanto em composições químicas quanto estruturais. Na Figura 2.2, a Zona II é neutra e as Zonas I e III são carregadas. Este modelo ainda vem sendo estudado para explicar a transição entre os dois regimes de crescimento; contudo, mais evidências experimentais são esperadas para melhor entender o caminho da mudança entre o crescimento linear e o crescimento exponencial. Além disso, a configuração dos polieletrólitos durante o processo de construção dos filmes ainda é bastante confusa [17]. Sabe-se que o processo de automontagem é afetado pelas características dos componentes (densidade de carga, rigidez da cadeia polimérica e posição dos sítios iônicos) e pelo ambiente químico (pH, força iônica, temperatura, concentração) [8, 10].

Os filmes de multicamadas ultrafinas tem atraído bastante interesse devido as suas amplas aplicações como sensores, óptica integrada, revestimentos de redução de atrito, superfícies biológicas, dispositivos de emissores de luz (LEDs), ou camadas de orientação de superfície [29-32]. A maioria dessas aplicações requer preparação de filmes estáveis, bem organizados e com processos de fabricação rápidos. A técnica LbL

é baseada principalmente no processo de auto-difusão em que cadeias de polieletrólitos carregadas são absorvidas sobre superfícies de cargas opostas devido a atração eletrostática.

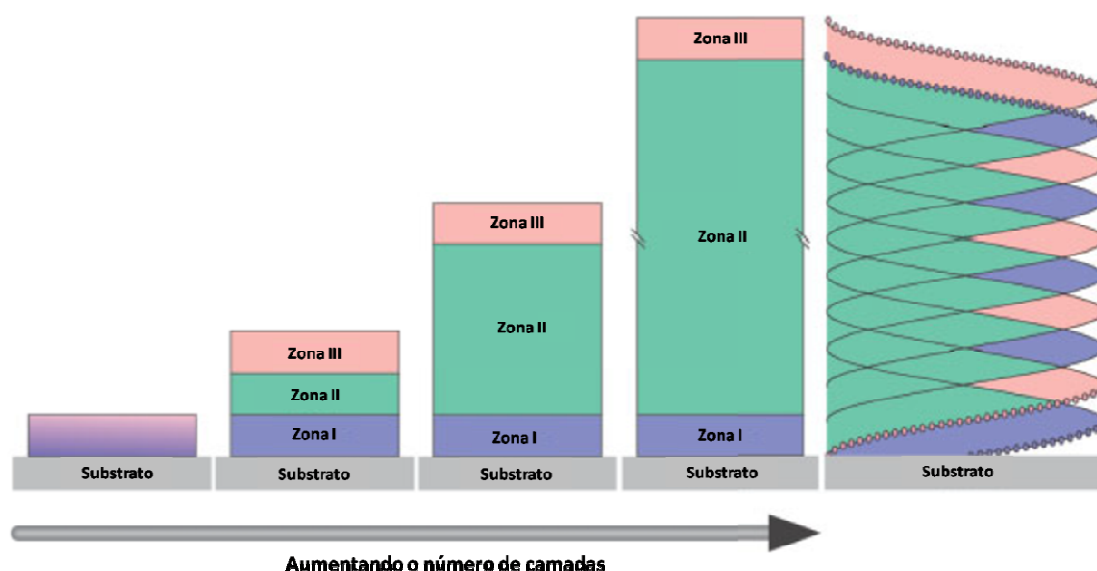


Figura 2.2. Modelo de Zona para as multicamadas de polieletrólitos. A seta mostra o desenvolvimento das zonas durante a deposição do filme. O primeiro par de camadas é mostrado no lado esquerdo e, um filme que consiste em várias camadas é mostrado à direita. Nota-se que, uma vez que todas as três zonas são estabelecidas, somente a Zona II cresce com o aumento do número de camadas. FONTE: Adaptado de Decher e Schlenoff (2002) [10].

Como resultado, o tempo de adsorção, o controle adequado de pH, a concentração de polieletrólito, e a quantidade de sal iônico adicionado devem ser considerados de modo a aumentar a superfície de revestimento de uma camada de polímero adsorvida sobre um substrato. Além disso, sem a lavagem exaustiva utilizando um fluxo de solvente puro, após a adsorção de uma camada de polieletrólito, as cadeias do polieletrólito fracamente adsorvidas aumentam significativamente a rugosidade da

superfície dos filmes de multicamadas, gerando um filme pobre em qualidade. Consequentemente, são necessárias condições próximas das ideais, tanto para adsorção quanto para as etapas de lavagem, para preparar filmes multicamadas bem definidos [33].

Há ampla literatura de filmes LbL contendo biomateriais com adsorção por imersão [34-37]. Dependendo da cinética de adsorção, o tempo de imersão para a adsorção dos polieletrólitos pode ser muito longo, o que torna o processo inviável em escala industrial. Outra limitação é a possibilidade de dissolução do filme e contaminação das soluções [10, 38]. Para vencer tais limitações, novas estratégias foram criadas, como a formação de filmes LbL por spray (Fig. 2.3), em que a deposição de uma camada pode ser reduzida de 20 minutos em imersão para até 5 segundos [19, 38, 39]. A aplicação desta técnica em uma grande área é vantajosa para a fabricação de dispositivos que ostentem multicamadas em aplicações como membranas e de revestimentos externos como proteção contra corrosão ou alteração de adesão. Embora a etapa de lavagem remova a maior parte do polímero presente na superfície, soluções de polieletrólito podem ser pulverizadas sem qualquer etapa de lavagem intermediária. Entretanto, os filmes, ainda que com espessura maior, são de qualidade significativamente mais pobre (muitas bolhas, fraca adesão) e a composição depende precisamente da quantidade de pulverização que incide sobre o substrato. Os filmes obtidos por *spray* são mais finos e menos rugosos do que os preparados por imersão [38].

Um dos aspectos mais interessantes desta técnica reside no fato de que a montagem por *spray* pode acelerar consideravelmente o tempo de deposição, como já relatado. A montagem de múltiplas camadas de determinados materiais pode ser acelerada por um fator de até 500 vezes. Os filmes automontados preparados por

"imersão" ou por "*spray*" apresentam diferenças consideráveis no que diz respeito às suas propriedades. Félix et al. [40] mostraram que filmes com o mesmo número de camadas preparados a partir das mesmas soluções de "imersão" ou "*spray*" diferem na espessura. Para filmes compostos de sal de sódio de poli(estireno sulfonato) (PSS) e poli(cloridrato de alilamina) (PAH) foi demonstrado que os filmes automontados por *spray* tinham apenas uma espessura de cerca de 70-75% da observada para a deposição clássica por "imersão". Investigações por AFM revelaram que os dois tipos de filmes também diferem em relação a rugosidade superficial. A desvantagem com relação à técnica de imersão é que a cada processo de *spray* há perda de material (material não adsorvido ou fracamente adsorvido sobre o substrato) que é drenado da superfície. Todavia, a redução do tempo e a facilidade de deposição fazem com que essa técnica seja usada para fabricar filmes para diversos fins [19, 38, 39].

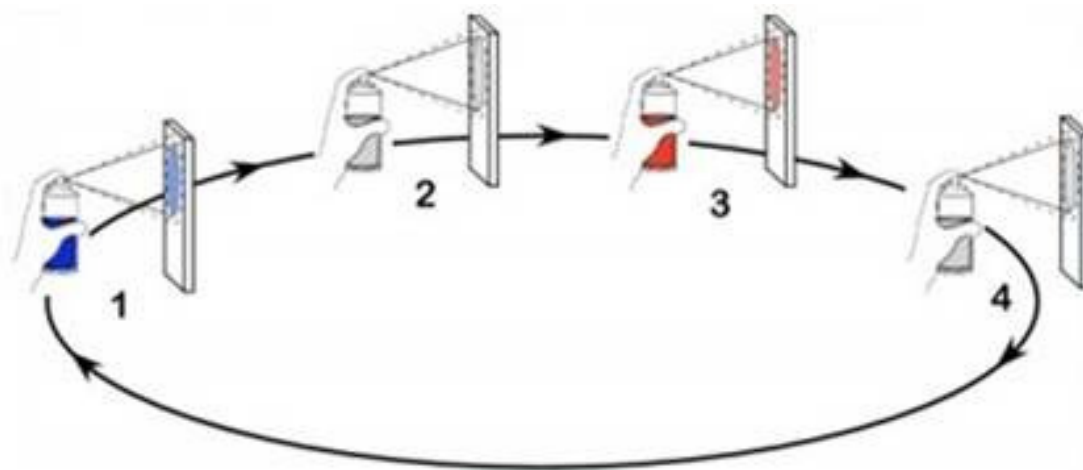


Figura 2.3. Esquema do processo de deposição por *spray*. Etapas 1 e 3 representam a deposição de Polianion e Polication, respectivamente; Etapas 2 e 4 representam o processo de lavagem. FONTE: Benkirane-Jessel et al. (2007) [41].

Pode-se também produzir filmes LbL com um equipamento de *spin-coating* (Fig. 2.4), em que o substrato é submetido a altas velocidades de rotação enquanto a solução de polieletrólito é injetada no centro da amostra. Essa alta rotação ajuda a formar uma fina camada de líquido que, devido à ação da força centrífuga e do fluxo de cisalhamento, induz adsorção do material em poucos segundos. Entre as vantagens desta técnica está a diminuição considerável no tempo de adsorção e o controle do volume de amostra para depositar cada camada, com diminuição da quantidade de amostra drenada da superfície [42]. Neste método, os principais parâmetros para controlar a quantidade de polieletrólito adsorvido são as concentrações de solução e taxa de rotação, que afetam a espessura dos filmes [43].

A técnica de *spin-coating* desenvolvida com base no método de solução de imersão foi uma tentativa de obter filmes finos em menores períodos de tempo, visto que no método de imersão o tempo requerido para a montagem dos filmes monomoleculares situa-se entre 1 min e 1 h dependendo do sistema adsorvente, sendo tipicamente entre 10 e 20 min, devido ao processo de adsorção em duas etapas: as cadeias poliméricas são primeiramente ancoradas à superfície por alguns segmentos (etapa rápida) e em seguida as cadeias relaxam e empacotam-se densamente (etapa mais lenta) [44]. A diferença significativa na quantidade adsorvida entre os métodos de imersão e *spin-coating* é causada por diferentes mecanismos de adsorção. No caso do método por imersão, as cadeias de polieletrólito difundem-se no substrato sob influência de interações eletrostáticas e, em seguida, as cadeias adsorvidas reorganizam-se sobre a superfície. Por outro lado, durante o processo de automontagem por *spin-coating* a adsorção e rearranjo de cadeias adsorvidas sobre a superfície e a eliminação de cadeias poliméricas fracamente adsorvidas são quase simultaneamente alcançadas a uma elevada velocidade de rotação por um curto período de tempo. A rápida eliminação de

água no processo por *spin-coating* aumenta significativamente a concentração molar da solução de polieletrólito durante o curto tempo de deposição e este aumento na concentração de polieletrólito produz camadas espessas, apesar da formação do filme fino ser tipicamente fornecida pela força centrífuga e pela força de cisalhamento do ar.

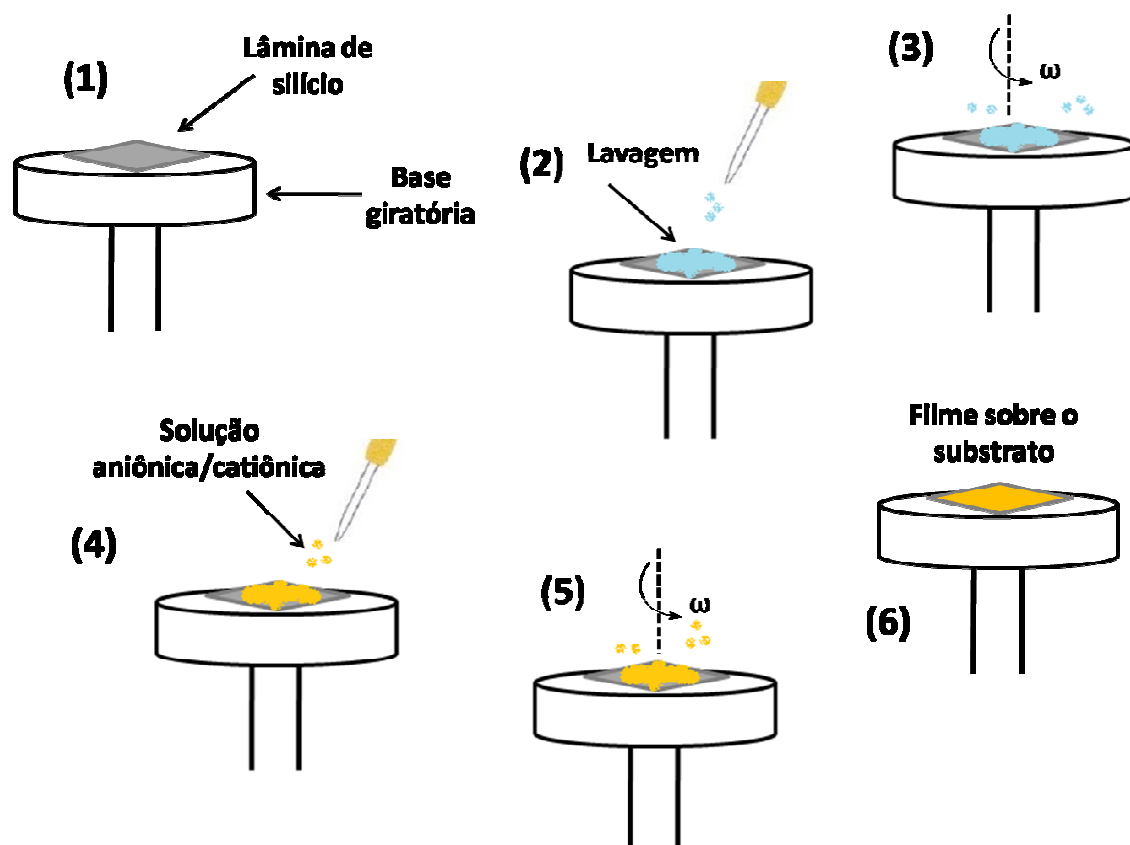


Figura 2.4. Representação esquemática do preparo de filmes finos e homogêneos por revestimento rotacional (*spin-coating*) sobre lâminas de silício. FONTE: Adaptado de Kosaka (2007) [45].

Os filmes obtidos por este método são mais ordenados internamente do que os filmes obtidos por imersão. Essa técnica também aumenta a atração eletrostática entre polímeros de cargas opostas, devido a presença de moléculas de água nas multicamadas. Quando as moléculas de água são adsorvidas sobre um substrato, as moléculas pré-

adsorvidas podem bloquear a adsorção do polieletrólito sobre a superfície e, assim, a superfície coberta com cadeias de polieletrólito pode ser incompleta. No entanto, se a adsorção dos polímeros e a drenagem de água são quase que simultaneamente realizadas num curto intervalo de tempo, como no caso do processo de automontagem por *spin-coating*, não haverá mais tempo suficiente para os polieletrólitos adsorverem sobre o substrato [33].

2.2. Quitosana (QT)

A Quitosana (QT) (Fig. 2.5) é um derivado parcialmente desacetilado da quitina, composto por unidades β -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose e pequenas quantidades de N-acetil-D-glucosamina. A quitina por sua vez, é uma substância natural encontrada em abundância no exoesqueleto de insetos, na concha de crustáceos e nas paredes celulares de fungos [46, 47]. O processo de desacetilação da quitina resulta em quitosana com uma porcentagem residual, entre 10 a 30%, de grupos amidas [7].

O termo QT é usado nesta Tese para indicar quitosana. A QT define a quitina com um grau de desacetilação excedendo 70%, cuja qualidade e propriedades dependem da purificação, do grau de desacetilação (variando entre 70 e 95%), da massa molar (variando entre c.a 100.000 e 1.200.000 g·mol⁻¹) e da cristalinidade. A QT é insolúvel em água pura e em solventes orgânicos, sendo solúvel em solução aquosa de ácido clorídrico e em ácidos orgânicos aquosos tais como ácido fórmico, acético, oxálico e láctico. O grau de solubilidade depende da concentração e do tipo de ácido. A solubilidade diminui com o aumento da concentração de ácido; soluções aquosas de alguns ácidos tais como o ácido fosfórico, sulfúrico e cítrico não são bons solventes [48]. Este polissacarídeo possui muitos grupos amino modificáveis em sua estrutura o

que o torna atrativo para aplicações no campo da medicina, farmácia e biotecnologia [46].

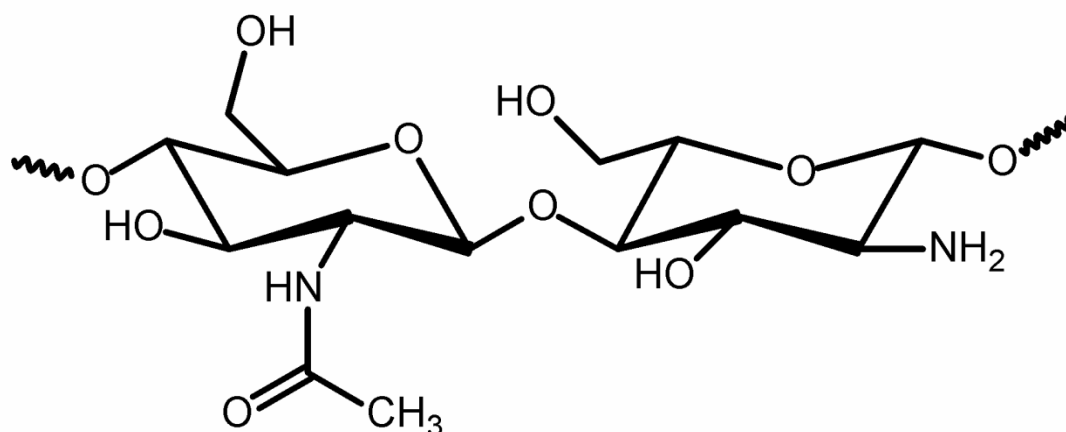


Figura 2.5. Unidades monossacarídicas repetitivas da Quitosana (QT).

A QT tem sido extensivamente utilizada na obtenção de complexos polieletrólitos, devido a sua natureza catiônica, quando em meio ácido, e às suas propriedades biológicas (biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, mucoadesividade e a possibilidade de se ligar a proteínas, genes e ácidos nucleicos) [49-51]. Suas propriedades mais distinguíveis são a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, portanto pode ser considerado como um polímero verde. A sua biocompatibilidade permite que interaja com biomoléculas sem degradá-las. Devido ao fato da QT ser carregada positivamente, em meio ácido, ela pode interagir fortemente com substâncias carregadas negativamente, incluindo muitos lipídios e proteínas. Isto é vantajoso em diversas aplicações tais como em transfecção, onde complexos estáveis entre a QT e fragmentos de DNA podem ser formados [52-55]. Dentre os vários usos da QT, destaca-se a sua capacidade de promover a regeneração tecidual, sendo bastante empregada na engenharia de tecidos, na cura de feridas e em implantes [52, 56, 57].

Formulações de QT são utilizadas na liberação de fármacos, onde a QT em várias formas, por exemplo, nanopartículas, micropartículas e fibras, atua como veículo para a liberação de fármacos [52, 58]. A QT é também usada como um agente antimicrobiano para evitar o crescimento bacteriano ou matar microorganismos, em ações que podem ser explicadas em termos de destruição da membrana celular e penetração da QT com perturbação das funções celulares. Outra característica da QT é a sua adequação como matriz para a imobilização de enzimas, onde a atividade da enzima é preservada em um filme sólido, provavelmente, devido a QT conservar uma considerável quantidade de moléculas de água ligadas [52, 59]. O estudo físico-químico de suas interações com os mais importantes componentes da matéria viva parece ser um ponto essencial para a interpretação de respostas biológicas induzidas pela presença da QT em meios vivos [60].

Recentemente a formação de complexos de QT/poliânion leva a novas estruturas de micro esferas e micro cápsulas como transportadores no encapsulamento de células, proteínas, ou vacinas. Complexos de QT frequentemente exibem boa biodegradabilidade. Por exemplo, a combinação de QT com alginato (ALG) é capaz de formar estruturas tubulares via LbL por meio de forças eletrostáticas, mecanicamente estáveis e com características específicas de biodegradabilidade. Tais estruturas tubulares automontadas tem potencial para aplicações como transportadores de genes e liberação de fármacos [61]. Complexos polieletrólíticos de quitosana-HA (HA = ácido hialurônico) são muito utilizados como dispositivos de implante e transportadores de fármacos [46]. Ito et al. [62] investigaram a formação de complexos polieletrólíticos entre os derivados da celulose e a sua compatibilidade no sangue. Dutkiewicz e Tuora [63] estudaram novas formas de complexos polieletrólíticos de quitosana com poli(ácido acrílico) (PAA), carboximetilcelulose, quitina, alginato e heparina. Eles

investigaram as interações entre membranas de complexos polieletrólíticos e diversas soluções de NaCl e proteínas plasmáticas. Mireles et al. [64] investigaram a formação de complexos de quitosana e poliânions de ocorrência natural, tais como a carragena, alginato e pectina nas indústrias de processamento de alimentos. Piai et al. [65] sintetizaram hidrogéis de quitosana com sulfato de condroitina e investigaram suas propriedades em diferentes condições de pH. Verificaram que o sulfato de condroitina é liberado do complexo e que simultaneamente à liberação de parte do sulfato de condroitina ocorre a reorganização do gel que se torna bem mais estruturado. Verificaram que tanto a liberação do sulfato de condroitina quanto a estruturação do gel ocorrem em solução tampão, principalmente com pHs acima do pKa da quitosana (6-7). Em outro trabalho neste mesmo tipo de material, A. R. Fajardo [66] e Fajardo et al. [1] verificaram que a reorganização do complexo de quitosana com sulfato de condroitina depende também do tempo de imersão. Em um trabalho mais recente Fajardo et al. [67] incorporaram sulfadiazina de prata (AgSD) em matrizes de QT/SC. Eles verificaram que as matrizes de QT/SC e QT/SC/AgSD apresentaram atividade contra bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e não apresentaram toxicidade para as células VERO (sadias). Outros trabalhos relatam a influência dos complexos polieletrólíticos de quitosana-pectina, no comportamento de liberação da vancomicina no trato gastrointestinal [68]. A formação de géis PEC, a partir da quitosana e poliânions, tem sido investigada como veículo para a liberação de fármacos e em sistemas imobilizados [51]. A literatura menciona, também, a aplicação de PECs como flocculantes na indústria têxtil [69], fabricação de papel [70] e no tratamento de água [71].

A QT também tem sido usualmente selecionada como a escolha primária para a construção de filmes multicamadas de aplicações biomédicas, cujas propriedades dos

filmes são afetadas por muitos parâmetros, incluindo sistemas de solvente, massa molar e grau de desacetilação [7, 9]. Serizawa et al. [72] estudaram a bioatividade alternada contra o sangue humano e a adesão de fibroblastos em filmes finos compostos de quitosana/sulfato de dextrana. Zhu et al. [73] aumentaram a biocompatibilidade do sangue com politetrafluoretileno expandido (ePTFE), aderindo o complexo polieletrólítico de QT e HEP sobre a superfície deste polímero. Enxertos feitos de ePTFE são amplamente empregados em cirurgia vascular reconstrutiva. Fu et al. [74] desenvolveram filmes com propriedades antiadesiva e antibacteriana a base de HEP/QT sobre substratos de poli(etileno tereftalato) (PET) modificado. Verificaram que as multicamadas dos filmes não apenas reduziram a adesão bacteriana, mas também mataram as bactérias aderidas sobre a superfície. Outros estudos reportam a deposição de QT e HA sobre artérias danificadas como um meio para proteger a artéria contra a trombogênese durante o procedimento de revascularização e controlar o processo de cura por incorporação de moléculas bioativas nos filmes multicamadas [75]. O mesmo sistema de multicamadas demonstrou ser resistente a condrócitos e bactérias [76]. As citocompatibilidades de poli(L-ácido láctico) aminolizado [77], poli(etileno tereftalato) hidrolisado [78] e titânio [79] foram melhoradas por meio de filmes multicamadas de QT/poli(estireno sulfonado), QT/sulfato de condroitina e QT/gelatina, respectivamente. Sistemas de multicamadas baseados em QT são também adequados para aplicações de biosensores. Multicamadas de filmes finos de QT/glucose oxidase foram aplicadas como revestimento sobre eletrodos afim de detectar glucose [80]. Assim, embora diversos trabalhos científicos reportam a formação de filmes de multicamadas de complexos polieletrólíticos entre quitosana e um número considerável de poliânions, existem poucos relatos na literatura que mencionem derivados carregados da quitosana, cujas propriedades biológicas são significativamente melhores daquelas da quitosana

[9]. Consequentemente, estudos e aplicações com derivados da QT, como por exemplo a N,N,N-trimetilquitosana (TMC), torna-se um campo de pesquisa bastante atraente para a fabricação de novos materiais.

2.3. N,N,N-Trimetilquitosana (TMC)

A N,N,N-trimetilquitosana (TMC) é um polícatión quaternário, obtido a partir da N-metilação da quitosana (QT). Possui cadeia linear e sítios carregados permanentemente devido aos átomos de nitrogênio parcialmente quaternizados (Fig. 2.6) [81]. A TMC é obtida por meio da reação da QT com excesso de iodeto de metila em condições fortemente alcalinas, usando N-metil-2-pirrolidona (NMP) como solvente e iodeto de sódio como catalisador [82]. Pode também ser sintetizada por meio do tratamento da QT com formaldeído para gerar a base Schiff, seguida pela reação com um agente redutor e, então, com haleto de metila [83, 84]. Recentemente, novos métodos tem sido empregados para a obtenção da TMC, tais como o tratamento da QT com dimetilsulfato, um agente mais barato e menos tóxico [85]. Contudo, quase todas as reações são executadas em condições fortemente básicas e aquecimento, o que resulta na indesejada O-metilação e diminuição da solubilidade da TMC em meio aquoso. Afim de evitar a O-metilação e com isso melhorar a sua solubilidade, pesquisadores vem desenvolvendo novas rotas para a obtenção da TMC livre de grupos O-metilados. Um novo método é a reação da QT com iodeto de metila, sem catalisador e em baixas temperaturas, usando uma mistura de DMF/H₂O como solvente [86]. Outro método promissor para a obtenção da TMC livre de grupos O-metílicos é a modificação da QT por meio da reação de Eschweiler-Clarke, seguida por metilação com excesso de iodeto de metila. Neste método, a TMC obtida é livre de grupos O-metílicos e não ocorre a cisão de cadeia [87, 88].

Muzzarelli e Tanfani [89] reportaram a síntese da TMC, em duas etapas, usando iodometano e N,N-dimetilquitosana (DMC). Eles demonstraram que até 60% dos grupos amino podem ser trimetilados por meio deste procedimento. Interessantemente, este método previne a cisão da cadeia e a desacetilação dos grupos N-acetil remanescentes, podendo resultar em TMC livre de grupos O-metílicos. Todavia, isto não foi investigado por estes pesquisadores. Recentemente, diversas adaptações para este método foram apresentados por Jia et al. [90] e Guo et al. [91] que introduziram hidróxido de sódio na segunda etapa para aumentar o grau de substituição. No entanto, o uso de uma base forte pode resultar na O-metilação [88]. A TMC sintetizada por estes métodos tem sido estudada para verificar a atividade antibacteriana.

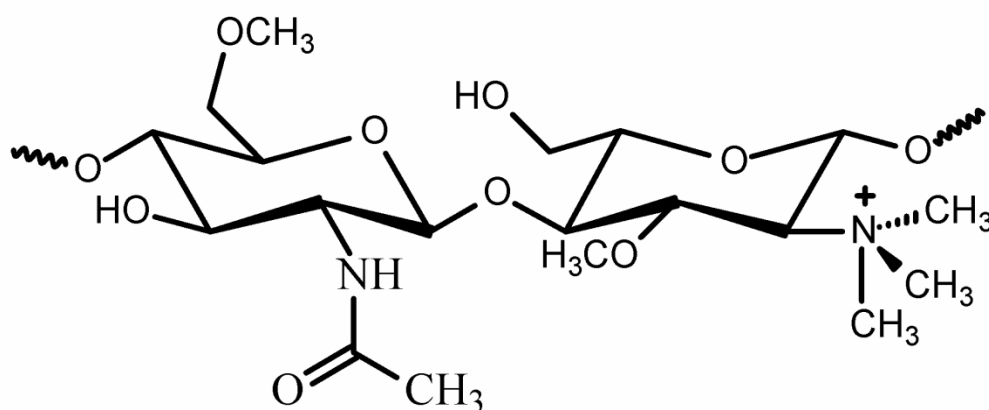


Figura 2.6. Estrutura da N,N,N-trimetilquitosana (TMC).

Com átomos de nitrogênio carregados positivamente, a atividade antibacteriana da TMC é superior a QT devido a quaternização permanente e a maior solubilidade em água em ampla faixa de pH [83, 92]. Geralmente, acredita-se que a QT e seus derivados exibam atividade antibacteriana devido a formação de complexos com o envelope celular ou a interferência da expressão de gene; a porção catiônica é sempre o sítio ativo

dos polímeros em ambos os mecanismos possíveis. Assim, com mais cargas positivas a TMC mostra maior atividade antibacteriana [87]. Investigando a eficiência antibacteriana da TMC livre de grupos O-metílicos, pesquisadores mostraram que os grupos amino protonados contribuíram para a atividade antibacteriana ao invés dos grupos trimetilados, enquanto que os grupos amino N-monometilados e N,N-dimetilados funcionaram como grupos amino livres [92]. Portanto, a eficiência antibacteriana da trimetilação torna-se algo controverso. Dessa forma, mais estudos sobre a atividade antibacteriana da TMC livre de grupos O-metílicos são ainda requeridos [87].

Além das propriedades antimicrobianas da QT, outras propriedades tais como a mucoadesividade, não toxicidade e biodegradabilidade permanecem na TMC. Estudos *in vitro* (células Caco-2) e *in vivo* (rato e porco) demonstraram que a TMC aumenta a permeação de compostos hidrofílicos (peptídeos e algumas proteínas) em relação à QT [93, 94]. A atividade antibacteriana da TMC é aproximadamente 100-500 vezes maior do que da QT. Vale a pena mencionar que a TMC é solúvel em ampla faixa de pH e, portanto, supera as limitações em solubilidade apresentadas pela QT em condições neutras e básicas. Por essas razões, a TMC torna-se muito promissora nos campos médicos e farmacêuticos, principalmente por apresentar melhores propriedades do que aquelas encontradas na QT. A estrutura química da TMC é uma importante característica, que determina de forma significativa as propriedades físicas e químicas deste polímero. Pesquisadores tem mostrado que a quantidade de grupos metílicos inseridos nos grupos amino da TMC influencia muitas propriedades da TMC como, por exemplo, sua estabilidade térmica [81]. A TMC também tem demonstrado ser um intensificador potente de adsorção intestinal para fármacos peptídicos, mesmo em ambientes neutros. Este polímero é capaz de abrir junções apertadas, que selam as vias

paracelulares, facilitando assim a difusão paracelular de fármacos peptídicos. O processo tem a vantagem adicional de ser reversível após a remoção do polímero, levando ao fechamento das junções apertadas [95].

Xu et al. [87] sintetizaram a TMC livre de grupos O-metílicos e a N,N,N-trimetil-O-carboximetil quitosana (TMCMC) com vários graus de trimetilação e carboximetilação, respectivamente. Eles investigaram a atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* em pH 5,5 e em pH 7,2; respectivamente. Verificaram que a TMC exibiu atividade mais forte que a QT em ambos os pHs. Entretanto, a atividade da TMC em pH 5,5 diminui quando o grau de substituição aumentou, enquanto que em pH 7,2 a relação da atividade-estrutura foi inversa. As atividades antibacterianas da QT e da TMC aumentaram quando os valores de pH diminuíram. Contudo, a TMC foi mais eficiente do que a QT em pH 5,5, enquanto que em pH 3,5 foi menos eficiente do que a QT. Além disso, a carboximetilação da TMC reduziu sua atividade. Synman et al. [96] encontraram que as propriedades de mucoadesividade da TMC diminuíram com um aumento no GQ, enquanto que Sandri et al. [97] reportaram resultados opostos. Com relação à citotoxicidade, Thanou et al. [98], Amidi et al. [99] e Florea et al. [100] indicaram que a TMC foi não tóxica mesmo em altos valores de GQ. Mao et al. [101] encontraram que a TMC com GQ de 40% exibiu tempo e dose dependentes da resposta de citotoxicidade, e a intensidade desta propriedade aumentou com o aumento da massa molar. Resultados similares tem sido encontrados por Kean et al. [102]. Essas discrepâncias podem ser atribuídas aos diferentes graus de dimetilação (GD) da TMC. A TMC com o mesmo GQ mas com diferentes GD podem mostrar distintas propriedades de mucoadesão e citotoxicidade. Em geral, a mucoadesividade e citotoxicidade da TMC podem, provavelmente, ser atribuídas às interações entre os grupos carregados positivamente da TMC e componentes aniônicos (ácido siálico) das

glicoproteínas em camadas mucosas e sobre a superfície das células epiteliais. Acredita-se que um aumento no GD além do GQ podem afetar a interação do polímero e a camada mucosa/células epiteliais, resultando na redução da mucoadesividade e citotoxicidade [103].

Jintapattanakit et al. [103] reportaram o efeito do GQ e GD nas propriedades físico-químicas da TMC em termos de solubilidade, propriedades mucoadesivas e citotoxicidade. A citotoxicidade da TMC correlacionada com a força de ligação mucoadesiva mostrou ser dependente da razão do GD e GQ. O alto GD na TMC levou a uma diminuição da mucoadesividade e citotoxicidade e o efeito do GD foi evidentemente observado quando $GD/GQ > 1$. No estudo foram empregadas TMCs com GD até três vezes maior que o GQ. Le Dung et al. [104] obtiveram 53% de quaternização dos grupos amino em apenas uma etapa de reação, sem nenhuma observação de O-metilação. Este método foi usado como base para preparar a TMC com diferentes graus de substituição a partir da QT, a fim de estudar o potencial desses derivados como potencilizador de absorção para fármacos hidrofílicos e macromoleculares tais como peptídeos e proteínas.

Diversos estudos tem sido realizados para determinar o GQ ideal para a liberação transepitelial de moléculas de fármacos de baixa massa molar e/ou proteínas, ou aumentar o potencial de transfecção de complexos de TMC com DNA de plasma. Tem sido reportado que o GQ de aproximadamente 40-50% é o ideal para a liberação transepitelial de compostos de baixa massa molar [105, 106] e proteínas [107]. Nesses estudos, a TMC usada também tinha uma variação extensiva de O-metilação e disparidades no comprimento da cadeia polimérica [88].

Diante do contexto, pode-se verificar que, a cada dia, novos estudos sobre a TMC e suas propriedades vem sendo realizados, especialmente porque os produtos

obtidos a partir deste material são de particular interesse tecnológico, sobretudo na fabricação de biomateriais e de dispositivos biomédicos. A combinação desse polímero com outros polissacarídeos (por exemplo, a heparina, como apresentado a seguir) pode vir a proporcionar uma melhoria no seu desempenho, visto que as propriedades individuais de cada componente podem ser somadas, ampliando a possibilidade de utilização desses materiais.

2.4. Heparina (HEP)

A Heparina (HEP) é um polissacarídeo linear constituído por unidades dissacarídicas de ácido urônico e resíduos de glucosamina ligados por ligação α - β (Fig. 2.7). Descoberta há quase 100 anos, esse polissacarídeo tem sido clinicamente empregado como um anticoagulante sanguíneo desde 1935; sua atividade anticoagulante é resultado da sua habilidade em se ligar ao inibidor da serina-protease da antitrombina, fazendo com que o inibidor desative a trombina [108, 109].

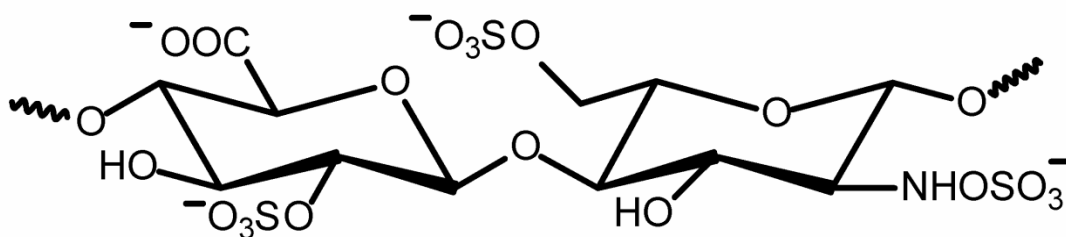


Figura 2.7. Unidades monossacarídicas repetitivas da Heparina (HEP).

Dada a sua função como um anticoagulante, a HEP pode exibir efeitos secundários indesejáveis, tais como complicações hemorrágicas, trombocitopenia induzida pela heparina e baixa biodisponibilidade, quando administrada por via não intravenosa [110]. Como resultado, a HEP de baixa massa molar (LMWHEP), que tem

uma composição química bem definida, tem sido desenvolvida para fornecer a dose anticoagulante mais previsível, meias-vidas mais longas e efeitos secundários reduzidos [111]. Muitos estudos tem indicado que a LMWHEP é mais efetiva na inibição do crescimento tumoral por meio da sua regulação da ligação de muitos fatores de crescimento angiogênicos (por exemplo, FGF - fator de crescimento de fibroblasto; e VEGF - fator de crescimento vascular endotelial) quando comparado com a HEP não fracionada [112, 113]. Pesquisadores tem também sugerido que a LMWHEP pode ser potencialmente usada como um agente antifibrótico em pacientes com hepatite B crônica [114].

A HEP não fracionada é geralmente isolada da mucosa intestinal de suínos e do tecido pulmonar bovino, com uma massa molar média de aproximadamente 15 kDa, sendo altamente heterogênea em termos de estrutura química e massa molar [115]. A prevalência de grupos sulfato e carboxilato presentes na estrutura química da HEP fazem com que a mesma apresente uma elevada densidade de cargas negativas, que intercede as interações eletrostáticas com muitas proteínas funcionais, incluindo fatores de crescimento, proteases, quimiocinas, enzimas, citocinas, componentes da matriz extracelular e adesão de moléculas [116, 117]. Essas interações, em muitos casos, servem para estabilizar as proteínas ou aumentar a sua afinidade para os receptores celulares [118, 119]. A estabilização dos fatores de crescimento - FGF e VEGF - pela HEP tem sido empregada na concepção de materiais como substratos para uso em engenharia de tecidos (para a regeneração de tecidos) e plataformas de liberação controlada para entrega de fator de crescimento [115, 120]. Deste modo, a HEP pode ser útil como um agente terapêutico em várias condições patológicas que envolvem proteínas funcionais. Entretanto, altas dosagens de HEP não podem ser utilizadas devido ao risco de sangramento excessivo [121].

Devido as suas atividades biológicas vantajosas, a incorporação da HEP em biomateriais tem sido altamente atrativa [73, 122, 123]. A HEP é muitas vezes fisicamente encapsulada ou conjugada de forma covalente a hidrogéis para proporcionar a liberação sustentada do anticoagulante [124]. Também, hidrogéis contendo HEP têm sido amplamente utilizados no sequestro e liberação controlada de fatores de crescimento para promover a angiogênese e a regeneração óssea [125, 126]. Superfícies e substratos modificados com HEP tem sido explorados para suprimir a absorção de proteínas não-específicas e localizar fatores de crescimento para promover a adesão e proliferação de células [127, 128]. Ela também atua indiretamente no mecanismo de coagulação do sangue e no crescimento celular [73, 122, 123]. Com sua conhecida antitrombogenicidade e forte hidrofilicidade, a HEP previne a adesão de células bacterianas e é um excelente candidato para revestimentos antiadesivos [13]. Além de ser um fármaco anticoagulante de uso frequente, a HEP é um polissacarídeo aniônico natural que contém grupos sulfônico, carboxílico e sulfanilamida. Desta forma, pode ser empregado para formar complexos polieletrólíticos (PECs) com polímeros catiônicos [17, 129] tais como proteínas, peptídeos e DNA de plasma para formar PECs estáveis, de uma forma que mantenha a orientação e a conformação bioativa de moléculas aprisionadas [130-132]. Diversos autores reportam o seu uso na formação de PECs que possuam aplicações na área biomédica. Entre eles, Oliviero et al. [133] desenvolveram hidrogéis porosos de PEG-heparina como uma matriz tridimensional (3D) com liberação controlada de VEGF para promover a angiogênese. Os precursores do hidrogel foram modificados com grupos metacrilato e reticulados fotoquimicamente juntamente com um agente de formação de espuma para causar a produção de uma rede porosa. O VEGF foi liberado a partir de hidrogéis de uma maneira controlada, com apenas 34% liberado em mais de 13 dias. Foi demonstrado que o VEGF liberado induz

a proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), bem como a formação da rede capilar *in vitro*. A QT imobilizada com HEP em várias camadas têm sido usada para ajustar as propriedades do *stent* coronário em termos de anticoagulação para a utilização clínica [134]. O sistema de QT/HEP foi reportado como antiadesivo e antibacteriano, formando uma automontagem biomacromolecular que é segura e eficiente na promoção da reendotelização e cura após o implante do *stent* [52]. Martins et al. [81] desenvolveram complexos polieletrólíticos de TMC e HEP em diferentes valores de pH (5, 8, 10 e 12). Eles verificaram que em altos valores de pH a formação e a estabilidade térmica dos PECs é maior. Nessas condições, a complexação entre a TMC e a HEP foi mais efetiva e foram claramente observadas alterações nos difratogramas de raios-X dos materiais obtidos.

Capítulo 3

Síntese e caracterização estrutural da TMC O-metilada e da TMC livre de grupos O-metílicos

Resumo

Neste capítulo foram obtidos derivados quaternários da quitosana (QT) com grupos hidroxílicos parcialmente metilados ou livres de O-metilação, usando diferentes metodologias. Os derivados quaternários da QT com grupos O-metílicos (TMC-OM) foram obtidos por meio da variação do número de etapas do processo de metilação e na presença de base forte. O aumento no número de etapas de reações aumentou o grau de quaternização (GQ) da TMC. Nesta metodologia foram obtidas TMC-OMs com GQ = 20 e 80%. A TMC livre de grupos metílicos (TMC-F) foi sintetizada primeiramente pelo tratamento da QT com ácido fórmico e formaldeído, seguida pela metilação com CH_3I . A TMC-F obtida neste procedimento apresentou GQ = 25%. O número de etapas de metilação e o tempo de reação afetaram o GQ da TMC. Os produtos obtidos foram caracterizados por FTIR, ^1H NMR, XRD e TGA. Foi observado que somente a TMC-OM com 80% de grupos N-trimetilados apresentou completa solubilidade em meio básico.

Palavras chave: Quitosana, N,N,N-trimetilquitosana, TMC O-metilada, TMC livre de O-metilação, grau de quaternização.

Abstract

Quaternary derivatives of chitosan (CHI) with partially methylated or free of O-methylation hydroxyl groups, using different methodologies were obtained as described in this chapter. The quaternary derivatives of CHI with O-methyl groups (TMC-OM) were obtained by varying the number of steps of the methylation process in the presence of strong base. The increase in the number of reaction steps increased the degree of quaternization (DQ) of the TMC. Through this methodology the TMC-OMs with DQ = 20 and 80% were obtained. For O-methyl free N,N,N-trimethyl chitosan (TMC-F), the raw CHI was firstly treated with formic acid and formaldehyde, followed by methylation with CH₃I. The TMC-F obtained in this procedure presented DQ = 25%. The number of methylation steps and the reaction time affected the DQ of the TMC-OM. The products were characterized by FTIR, ¹H-NMR, XRD and TGA. It was observed that only the TMC-OM with 80% of N-methylated groups showed complete solubility in neutral and alkaline aqueous medium.

Keywords: Chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan, O-methylated TMC, O-methyl free TMC, degree of quaternization.

3.1. Introdução

A quitosana (QT), um polissacarídeo obtido a partir de desacetilação parcial da quitina, surge na atualidade como um material promissor que apresenta propriedades inigualáveis, incluindo a biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, propriedades antimicrobianas, reconhecimento de células tumorais e liberação controlada e sustentada de fármacos. Embora, existam diversos estudos sobre a utilização da QT como carreador na liberação controlada de fármacos, o uso da QT vem sendo limitado devido a sua baixa solubilidade e permeabilidade acima de pH 5,6 [135]. A N,N,N-trimetilquitosana (TMC), a forma mais simples da quitosana quaternizada, possui maior solubilidade em meio aquoso em relação a QT, além de apresentar porosidade, eficiência de absorção, resistência química e ser antigênica [135]. Adicionalmente, estudos confirmaram que a TMC tem boas propriedades de mucoadesão e, a sua capacidade de transportar proteínas e peptídeos é elevada, quando comparada a QT. Estas propriedades tornam a TMC bastante atraente e interessante para a preparação de biomateriais [136]. Atualmente, prefere-se substituir a QT por TMC nas matrizes de hidrogéis (filmes, nanopartículas, micropartículas e beads) porque a TMC possui algumas propriedades que ultrapassam as encontradas na QT. Por outro lado, de acordo com Jintapattanakit et al. [103] a modificação química estrutural nos grupos amino leva a uma considerável diminuição na biocompatibilidade da TMC. O processo de O-metilação e a alta heterogeneidade estrutural das cadeias de TMC podem afetar as propriedades físico-químicas e biológicas deste material [136]. Existem na literatura diversos métodos para a obtenção da TMC [83, 88, 90], incluindo a síntese de TMC livre de grupos O-metílicos, o que pode contornar o problema acima mencionado.

A TMC é geralmente obtida por meio da modificação da QT com excesso de iodeto de metila em fortes condições alcalinas, usando N-metil-2-pirrolidona (NMP)

como solvente e iodeto de sódio como catalisador [82], ou sintetizada por tratamento da QT com formaldeído, seguida por reação com agente redutor e, então, com haleto de metila [83, 84]. Recentemente, novos métodos tais como o tratamento da QT com dimetilsulfato tem sido empregados para a obtenção da TMC [85]. No entanto, quase todas as reações são realizadas em condições fortemente básicas com aquecimento, o que resulta na O-metilação dos grupos hidroxílicos da QT. Esse tipo de reação secundária é quase incontrollável em tais metodologias e diminui a solubilidade da TMC em meio aquoso. Além disso, alguns autores relatam que a O-metilação diminui a atividade bactericida da TMC. Afim de evitar a O-metilação, pesquisadores vem desenvolvendo novas metodologias. Um dos métodos de síntese utilizados é a reação de trimetilação com iodeto de metila em baixas temperaturas, usando uma mistura de DMF/H₂O como solvente ao invés de NMP e sem catalisador [86, 88]. Neste método, o processo de metilação é repetido por várias vezes para obter um alto grau de trimetilação, se necessário. Outro método é a reação de Eschweiler-Clarke, seguida pela metilação com excesso de iodeto de metila. A TMC obtida neste método é livre de grupos O-metílicos e não apresenta cisão homolítica das cadeias [87, 88, 136]. Verheul et al. [88], mostraram que a TMC não O-metilada (GQ < 24 %) apresentou baixa citotoxicidade e modesta solubilidade, quando comparada a TMC O-metilada (GQ < 24 %).

Mediante o relato acima, verifica-se que diferentes métodos de preparação de TMC geram materiais com diferentes propriedades. Desta forma, o objetivo geral neste Capítulo 3 foi sintetizar e caracterizar derivados hidrossolúveis da QT, com grupos O-metilados ou livres de O-metilação, usando diferentes metodologias. Os materiais sintetizados neste Capítulo foram utilizados como precursores na construção dos filmes LbL, um dos focos dessa Tese.

Os objetivos específicos buscados neste Capítulo 3 da Tese foram:

- Sintetizar a N,N,N-trimetilquitosana, derivado hidrossolúvel da QT, com diferentes graus de quaternização;
- Sintetizar a N,N,N-trimetilquitosa livre de grupos O-metílicos;
- Caracterizar os derivados hidrossolúveis da quitosana por meio das técnicas de FTIR, ^1H NMR, XRD e TGA;
- Quantificar o grau de quaternização (GQ) dos produtos obtidos por meio de ^1H NMR.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Materiais

Quitosana (CAS 9012-76-4) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a $8,7 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ foi adquirida da Golden-Shell Biochemical (China); iodeto de metila (CAS 74-88-4); N-metil-2-pirrolidona (CAS 872-50-4), formaldeído estabilizado com metanol e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Membrana de celulose com poros que permitem a passagem de solutos de massa molar abaixo de 12 kDa, usada para diálise, foi obtida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Outros reagentes (hidróxido de sódio, iodeto de sódio, ácido clorídrico, etanol e éter dietílico) foram também utilizados. Todos os reagentes mencionados foram usados sem nenhuma purificação adicional e como recebidos do fornecedor.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Síntese da N,N,N-trimetilquitosana O-metilada (TMC-OM)

Para a obtenção da TMC de baixo grau de quaternização (TMC com GQ igual a 20 %), 10 g de QT foram previamente pesadas e dissolvidas em 400 mL de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a 45 °C, por 30 min. Então, 24 g de NaI e 60 mL de NaOH 15% (m/v) foram adicionados ao meio reacional, mantendo a agitação magnética durante 20 min. O sistema foi mantido sob refluxo e, então, 55 mL de iodeto de metila foi adicionado a reação. Após a adição desse agente redutor, a reação procedeu sob refluxo por 1 h a 45 °C. O produto, iodeto de N,N,N-trimetilquitosana (TMI), foi recolhido após a precipitação utilizando etanol (300 mL para cada 100 mL de solução). Então, o precipitado foi separado por centrifugação (3000 rpm por 5 min), lavado com éter dietílico (quatro vezes), filtrado, e seco sob vácuo a 40 °C por 48h. Finalmente, o produto foi dissolvido em solução aquosa de cloreto de sódio 10% (m/v) para proceder a troca dos contra íons iodeto por íons cloreto. Então, o cloreto de N,N,N-trimetilquitosana (TMC20) foi precipitado em etanol e finalmente isolado por centrifugação, seguindo a mesma metodologia descrita para a purificação do TMI [37, 82]. A denominação TMC20 foi utilizada para referir-se a TMC-OM com 20% de GQ.

Para a síntese da TMC com alto grau de quaternização (TMC com GQ igual a 80 %), empregou-se duas etapas de reação. A primeira etapa foi precedida de uma mistura de QT (10 g) e iodeto de sódio (24 g). A mistura foi dissolvida em NMP (400 mL), sob agitação magnética. Após a dissolução, 60 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 15% (m/v) e iodeto de metila (55 ml) foram adicionados a reação, sob agitação constante. O sistema foi mantido sob refluxo durante 1 h a 60 ° C. O produto, iodeto de N,N,N-trimetilquitosana (TMI), foi precipitado com etanol e isolado por centrifugação (3000 rpm durante 5 min). Depois de ser lavado com éter dietílico (quatro vezes), o

produto foi filtrado e seco sob vácuo a 40 °C durante 48 h. Na segunda etapa, o TMI obtido foi dissolvido em 400 ml de NMP, sob constante agitação. Iodeto de sódio (24 g), solução aquosa de hidróxido de sódio (55 ml) e iodeto de metila (35 mL) foram adicionados ao meio reacional, mantendo o sistema sob agitação. O sistema foi mantido sob refluxo durante 30 min a 60 °C. Mais tarde, iodeto de metila (10 mL) e pastilhas de hidróxido de sódio (3 g) foram adicionados à mistura e a agitação foi mantida por 70 min a 60 °C. O TMI foi precipitado em etanol, isolado por centrifugação, lavado com éter dietílico, filtrado e seco sob vácuo. Finalmente, o TMI foi dissolvido em 10% (m/v) de solução de cloreto de sódio para a troca do íon iodeto. Em seguida, o cloreto de N,N,N-trimetilquitosana (TMC80) foi precipitado, isolado, lavado, e seco seguindo a mesma metodologia descrita para a purificação do TMI [37, 82]. A denominação TMC80 foi utilizada para referir-se a TMC-OM com 80% de GQ.

3.2.2.2. Síntese da N,N,N-trimetilquitosana livre de grupos O-metílicos (TMC-F)

A N,N,N-trimetilquitosana livre de O-metilação foi obtida, a partir da N,N-dimetilquitosana (DMC), segundo metodologia descrita por Verheul et al. [88].

I) Síntese da N,N-dimetilquitosana (DMC)

Inicialmente, 10 g de QT foram transferidas para um balão de 500 mL e, então, foram adicionados 30 mL de ácido fórmico, 40 mL de formaldeído e 180 mL de água destilada, totalizando um volume de 250 mL. O sistema foi colocado em refluxo a 70 °C por 120 horas, sob agitação magnética, sendo obtida uma solução amarelada e viscosa. O material foi precipitado em solução de NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), sendo observada a formação de um gel. O gel foi lavado com água deionizada para remover as impurezas e, então, dissolvido em solução aquosa diluída de HCl (pH ~ 4,0). Finalmente, a solução

resultante foi dialisada em membrana de tamanho de poro 12 kDa. A diálise foi realizada com água deionizada durante três dias e, então, o material foi congelado e liofilizado.

II) Síntese da N,N,N-trimetilquitosana (TMC) a partir da DMC

A segunda etapa foi conduzida dissolvendo-se 2,0 g de DMC em 100 mL de água destilada (pH 4.0) e, em seguida, o pH da solução da DMC foi ajustado para 11,0 com auxílio de uma solução aquosa de NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Este passo foi realizado para assegurar a desprotonação dos grupos amino terciários da DMC. Assim, após a formação do gel este foi lavado com água destilada e após acetona, por três vezes. Em seguida, o material foi adicionado a um balão de 500 mL juntamente com 200 mL de N-metil-2-pirrolidona (NMP) e 6 mL de iodeto de metila, mantendo a temperatura a 40°C . A dispersão foi mantida sob agitação magnética durante 72 horas e, posteriormente, 600 mL de uma mistura de etanol/éter dietílico (1/1) foram utilizados para a precipitação da TMC. O precipitado foi isolado por centrifugação e lavado exaustivamente com éter etílico. Após a secagem, a TMC foi dissolvida em 200 mL de uma solução de cloreto de sódio 10% (m/v) para promover a troca iônica (processo de 18 horas). Finalmente, a TMC foi dialisada contra água deionizada por três dias e liofilizada. A denominação TMC-F foi utilizada para referir-se a TMC livre de grupos O-metílicos.

3.3. Caracterização

3.3.1. Caracterização dos derivados da quitosana por meio de ^1H NMR

Os espectros de ^1H NMR da QT, DMC, TMC-F, TMC20 e TMC80 foram adquiridos utilizando um espectrômetro de NMR Varian, Mercury Plus 300 BB, operando em 300,06 MHz para a frequência do ^1H . Para a aquisição dos espectros de

^1H NMR, 10 mg das amostras foram dissolvidos em 1,0 ml de $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100/1 v/v) para a QT; 1,0 ml de $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$ (100/1 v/v) para a DMC; e 1,0 ml de D_2O para as TMCs. Os espectros de ^1H NMR foram adquiridos em temperatura ambiente e os principais parâmetros de aquisição foram fixados como segue: um pulso de 45° , tempo de relaxamento de 10 s e 128 acúmulos para cada espectro. Dados de domínio do tempo foram apodizados com função exponencial de 0,2 Hz (LB) para melhorar a relação sinal-ruído antes de aplicar a transformação de Fourier. O grau de dimetilação (GD) da DMC e o grau de quaternização (GQ) das TMCs foram determinados, respectivamente, a partir dos espectros de ^1H NMR da DMC e das TMCs. Para isso, foram utilizadas as seguintes equações [129]:

$$S = \frac{[(\text{CH}_3)_3]}{9} + \frac{[(\text{CH}_3)_2]}{6} + \frac{[(\text{NHCOCH}_3)]}{3} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$\text{GD \%} = \left[\frac{(\text{CH}_3)_2}{6} \times \frac{1}{S} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

$$\text{GQ \%} = \left[\frac{(\text{CH}_3)_3}{9} \times \frac{1}{S} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

onde $[(\text{CH}_3)_2]$ é a integral dos hidrogênios metílicos dos grupos N-dimetilados (sítios ND) em 2,70; 3,06 e 3,10 ppm; $[(\text{CH}_3)_3]$ é a integral dos hidrogênios metílicos dos grupos N-trimetilados (sítios ^+NT) em 3,35 e 3,38 ppm e o termo $[(\text{NHCOCH}_3)]$ é a integral dos hidrogênios metílicos dos grupos acetamida em 2,10 e 2,12 ppm.

3.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Espectros de FTIR da QT e seus derivados foram obtidos em pastilhas de KBr, a 3% m/m, utilizando um espectrômetro Bomen FTIR, modelo MB 100. Os espectros foram adquiridos no modo de transmitância, entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 64 acúmulos para cada espectro.

3.3.3. Difração de Raios-X (XRD)

A QT e seus derivados foram caracterizados também por meio de difração de raios-X (XRD). As medidas foram conduzidas em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD-6000, operando na região de 5° a 70° com resolução 0,02° e velocidade de $2\theta = 2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$. A radiação foi gerada em linha de Cu K α a 40,0 kV e 30,0 mA ($\lambda = 0,15418 \text{ nm}$). Foi usado um sistema de fenda de 0,300 mm para coleta do feixe de luz difratada com ângulo de divergência de 1°.

3.3.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análises da QT e de seus derivados foram realizadas em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TG-50, operando com taxa de aquecimento 10 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de 50 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura entre 25 a 800 $^\circ\text{C}$.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Caracterização da N,N,N-trimetilquitosana por meio de ^1H NMR

3.4.1.1. N,N,N-trimetilquitosana com grupos O-metílicos (TMC-OM)

A estrutura química da QT e de seus derivados estão ilustradas na Figura 3.1. A síntese da TMC-OM foi confirmada por meio de ^1H NMR. Os valores de GQ da TMC

(com baixo e com alto GQ) foram obtidos por meio das Eq. 3.1 e 3.3, integrando as áreas dos sinais do espectro de ^1H NMR da TMC atribuídos aos átomos de hidrogênio como descrito na seção experimental (item 3.3.1). Os valores de GQ obtidos para a TMC-OM com baixo e alto GQ foram 20 e 80%, respectivamente. Assim, os derivados quaternários da QT foram rotulados como TMC20 e TMC80.

Na Figura 3.2 são mostrados os espectros de ^1H NMR da QT, TMC20 e TMC80, respectivamente. Todos os sinais foram atribuídos e relacionados com as estruturas dos polissacarídeos, apresentadas na Figura 3.1. O espectro de ^1H NMR da QT foi usado para confirmar que a modificação química da QT foi bem sucedida. As diferenças nos espectros de ^1H NMR confirmam a obtenção da TMC-OM (20 e 80%). O espectro da QT (Fig. 3.2a) mostrou sinais em 1,90 ppm, referindo-se aos átomos de hidrogênio metílicos dos grupos acetamida; em 2,96 ppm (H2); 3,53-3,70 ppm (H3-H6); e H1 em 4,69 ppm, respectivamente. Todos esses sinais foram atribuídos aos átomos de hidrogênio presentes nas unidades sacarídeas da QT.

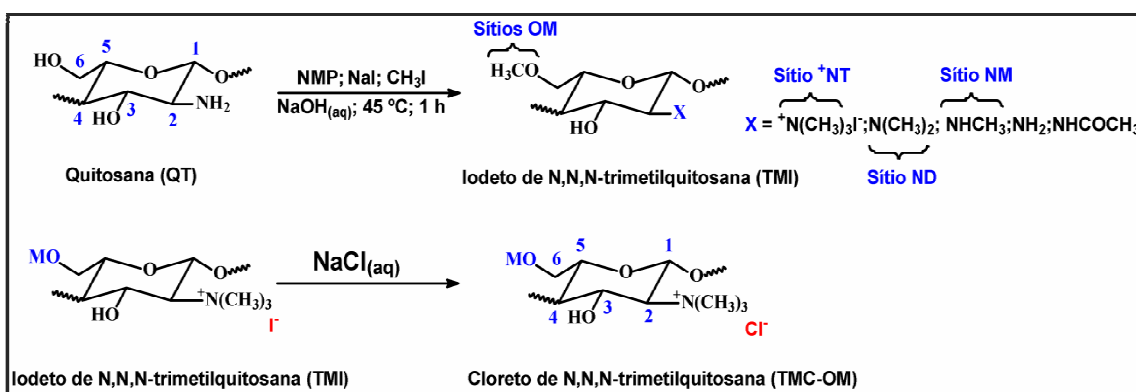


Figura 3.1. Rota sintética da TMC com grupos O-metílicos (TMC-OM).

Sieval et al. [82] obtiveram TMC com GQ de 60% e atribuíram os sinais de 2,60 ppm aos átomos de hidrogênio dos grupos N-monometilados (NHCH_3) e N-

dimetilados ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), rotulados como sítios NM e ND, respectivamente (Fig. 3.2). Os autores confirmaram experimentalmente que os sinais dos átomos de hidrogênio dos sítios NM e ND foram deslocados para a região de 3,10 ppm, após a adição de uma gota de DCl na solução de TMC, antes de proceder as análises de ^1H NMR.

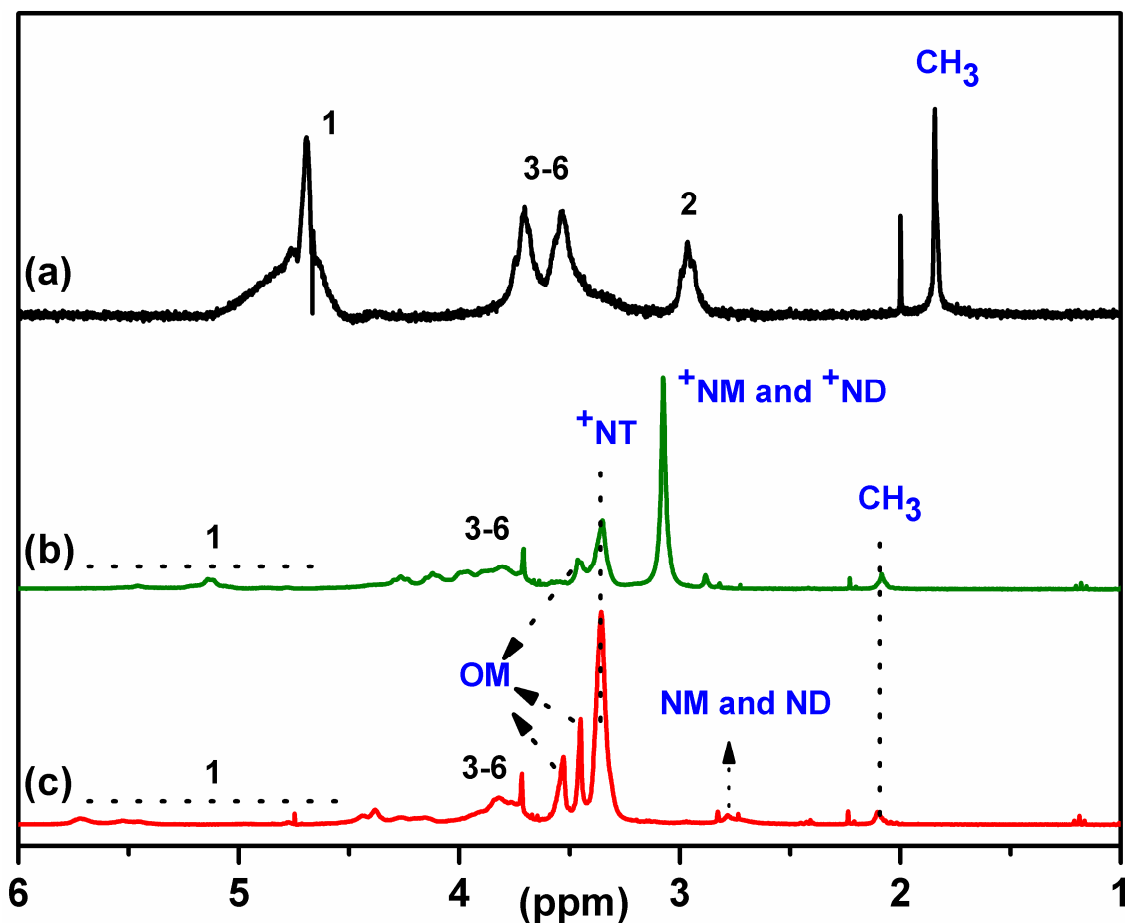


Figura 3.2. Espectros de ^1H NMR da QT (a), TMC20 (b) e TMC80 (c).

Dessa forma, eles verificaram que o pH final de obtenção da TMC tem influência direta no deslocamento químico (δ) dos átomos de hidrogênio atribuídos aos sítios NM e ND. Assim, o pico de baixa intensidade que aparece no espectro de ^1H NMR da TMC80 na região de 2,70 ppm pode ser atribuído aos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios NM e ND (Fig. 3.2c). A baixa intensidade deste pico se deve ao alto

GQ da TMC. Este fato demonstra que a TMC80 tem, em solução aquosa, sítios NM e ND não carregados, pois os átomos de hidrogênio metílicos absorvem perto da região de 2,60 ppm, mais precisamente em 2,70 ppm. O sinal relacionado aos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios NM e ND na TMC20 absorve exatamente em 3,10 ppm (Fig. 3.2b) [82].

Estes resultados indicam que os sítios NM e ND na estrutura da TMC20 estão carregados positivamente, de acordo com as reações $\text{NM} + \text{H}^+ \rightarrow {}^+\text{NM}$ e $\text{ND} + \text{H}^+ \rightarrow {}^+\text{ND}$. O sinal em 3,35 ppm no espectro (Fig. 3.2b e 3.2c) se deve aos átomos de hidrogênio dos grupos N-trimetilados [${}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$], rotulados como sítios ${}^+\text{NT}$ [82, 137]. Os sinais em 3,45 e 3,55 ppm se devem a O-metilação em C3-OH e C6-OH (sítios OM) e os que aparecem na região delimitada de 4,7 a 5,7 ppm correspondem aos sinais dos átomos de hidrogênio H1 (Figs. 3.2b e 3.2c) [137]. O sinal de H2 no espectro de TMC é ainda desconhecido (Fig. 3.2b e 3.2c). Alguns autores afirmam que o sinal de H2 está sobreposto ao sinal dos átomos de hidrogênio dos sítios NM e ND [138, 139]. O processo de quaternização também afeta o δ dos sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos acetamida (Fig. 3.2b e 3.2c) [37].

3.4.1.2. N,N,N-trimetilquitosana livre de grupos O-metílicos (TMC-F)

Na Figura 3.4 são apresentados os espectros de ${}^1\text{H}$ NMR da QT, DMC e da TMC livre de O-metilação (TMC-F). Todos os sinais foram atribuídos e relacionados com as estruturas dos polissacarídeos apresentadas na Figura 3.3.

As diferenças nos espectros de ${}^1\text{H}$ NMR (Fig. 3.4) e os respectivos sinais indicam que a DMC e a TMC-F foram efetivamente obtidas. O sinal em 2,05 ppm presente no espectro de ${}^1\text{H}$ NMR da QT (Fig. 3.4a) foi atribuído aos átomos de hidrogênio dos resíduos acetilados; o sinal em 3,16 ppm foi atribuído aos átomos de

hidrogênio (H2); os sinais observados entre 3,61-4,45 ppm foram atribuídos aos átomos de hidrogênio (H3-H6) e o sinal que ocorre na faixa espectral entre 4,5 a 5,5 ppm foi atribuído aos átomos de hidrogênio (H1) [129, 138].

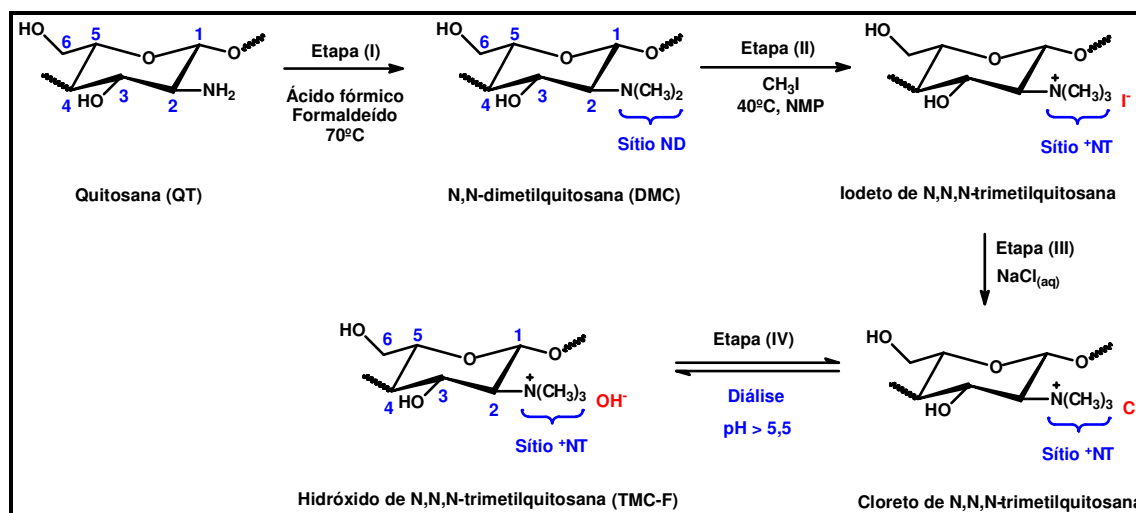


Figura 3.3. Rota sintética da DMC e TMC livre de grupos O-metílicos (TMC-F).

O espectro da Figura 3.4b confirmou a obtenção da DMC com grau de dimetilação (GD) de 86%. O GD foi obtido por meio da Equação 3.2, a partir da área referente ao sinal atribuído aos átomos de hidrogênio dos sítios N-dimetilados (N(CH₃)₂), em 3,10 ppm, e a área do sinal em 2,10 ppm atribuída aos átomos de hidrogênio metílicos dos grupos acetamida. O elevado valor de GD da DMC (GD = 86%), confirmou a completa N-dimetilação dos grupos NH₂ da QT, uma vez que a QT apresenta grau de acetilação em torno de 15%. O espectro de ¹H NMR da TMC está apresentado na Figura 3.4c. O aparecimento de um novo sinal em 3,38 ppm, atribuído aos átomos de hidrogênio dos grupos N-trimetilados [129], confirmou a obtenção da TMC. O grau de quaternização (GQ) da TMC foi determinado a partir da Equação 3.3. Para isso, foram utilizadas as áreas dos sinais dos átomos de hidrogênio dos sítios N-trimetilados (⁺NT) em 3,38 ppm e N-dimetilados (ND) em 3,06 ppm, bem

como a área do sinal atribuído aos átomos de hidrogênio metílicos dos grupos acetamida em 2,12 ppm. A TMC-F apresentou GQ de 25%.

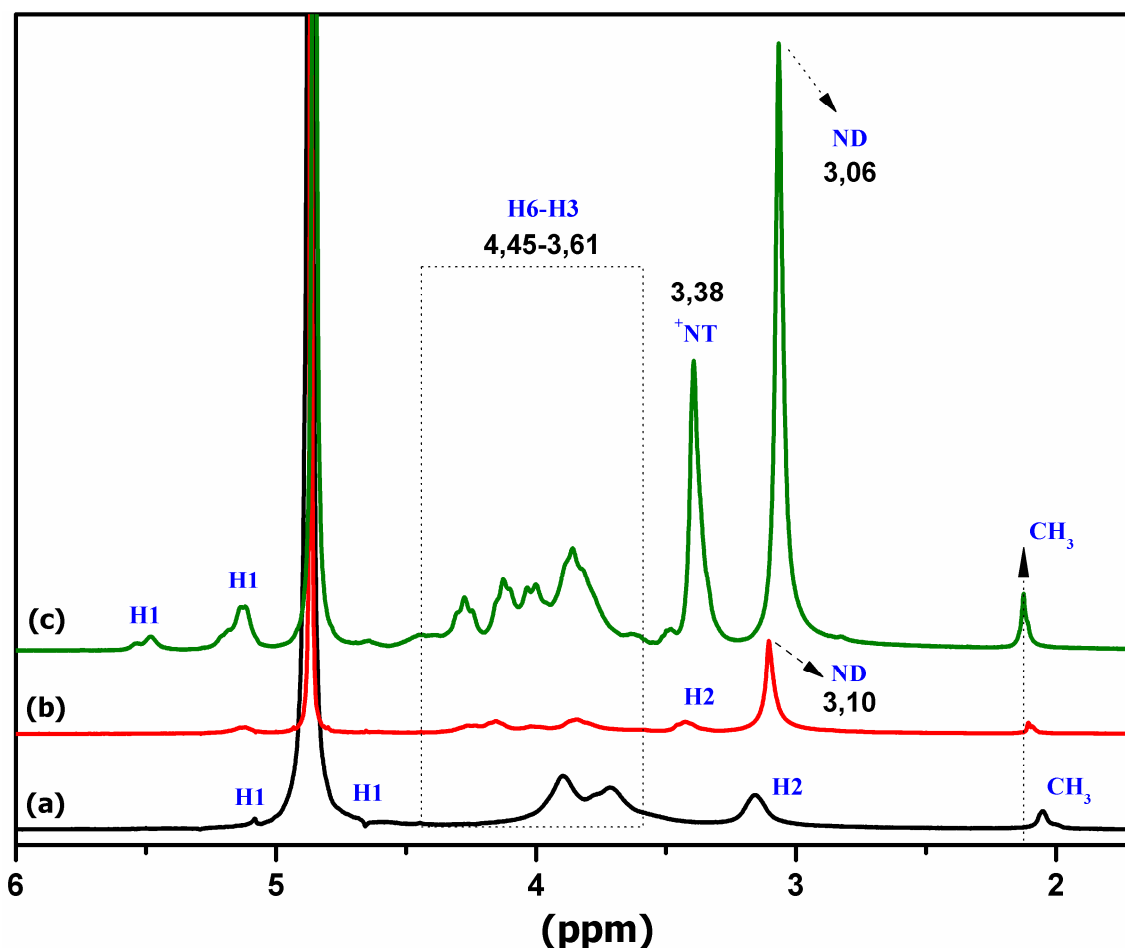


Figura 3.4. Espectros de ^1H NMR da QT (a), DMC (b) e TMC-F (c).

3.4.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Na Figura 3.5 são apresentados os espectros de FTIR dos materiais em estudo. Por meio dos espectros de FTIR verificou-se que os derivados de QT apresentaram bandas atribuídas a estrutura sacarídea em 898 e 1154 cm^{-1} [87, 129].

A banda que aparece próximo de 1600 cm^{-1} refere-se à deformação angular das ligações N-H (Fig. 3.5a e 3.5b). As bandas de absorção em 1661 e 1320 cm^{-1} são características da QT e atribuídas a amidas I e III, respectivamente [87, 140]. A banda

em 1481 cm^{-1} presente nos espectros de FTIR da DMC, TMC-F e TMC-OM corresponde ao estiramento assimétrico das ligações C-H dos grupos metílicos, característicos do sal de QT quaternário com elevado grau de metilação [87]. Vale a pena ressaltar que a banda referente a ligação N-H (1600 cm^{-1}) desapareceu no espectro de FTIR da TMC-F e TMC-OM, fato proporcionado pelo processo de trimetilação dos grupamentos NH_2 (Fig. 3.5) [87, 140]. A banda em 1080 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento das ligações C-O de alcoóis primários [129].

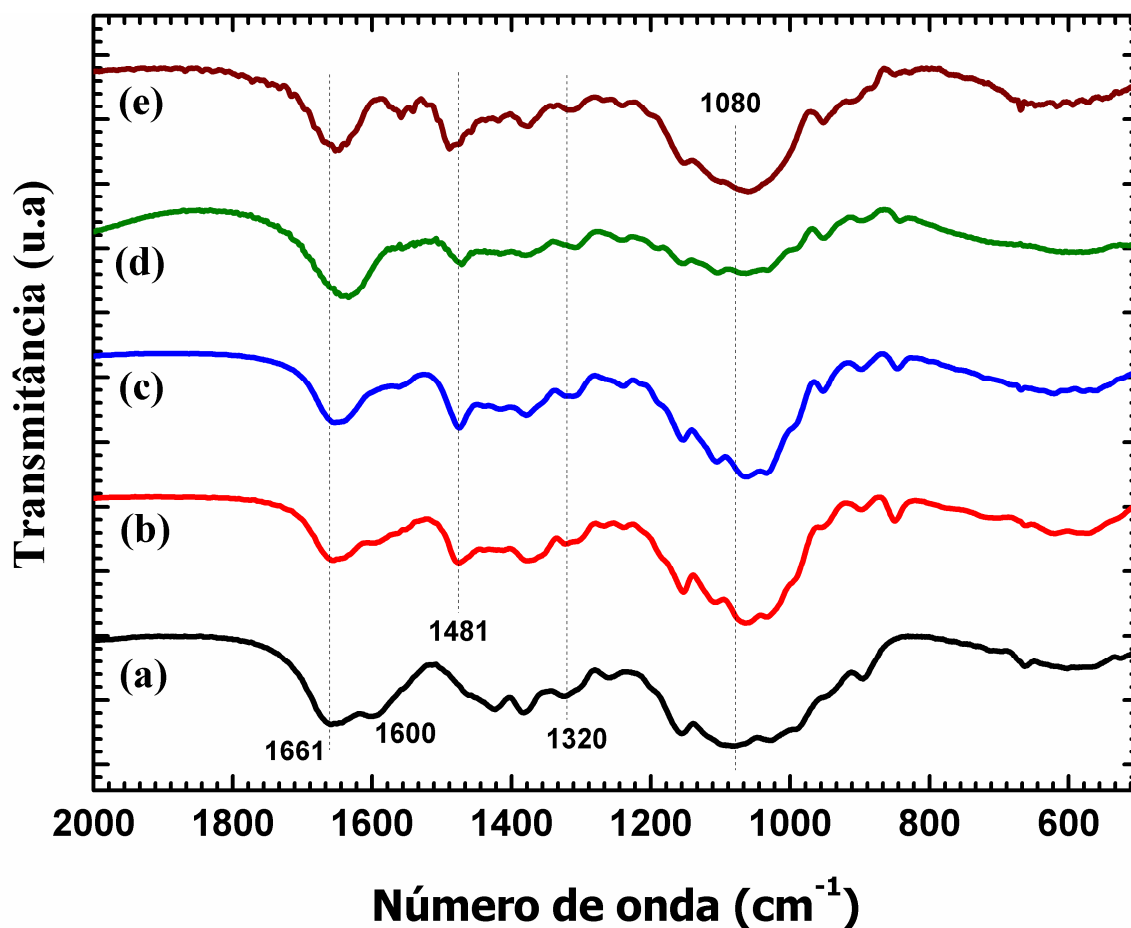


Figura 3.5. Espectros de FTIR da QT (a), DMC (b), TMC-F (c), TMC20 (d) e TMC80 (e).

3.4.3. Difração de Raios-X (XRD)

Os difratogramas de raios-X da QT, DMC, TMC-F, TMC20 e TMC80 são mostrados na Figura 3.6. O difratograma da QT exibiu picos de difração em $2\theta = 6,88^\circ$; $12,26^\circ$; $19,10^\circ$; $21,25^\circ$ e $26,40^\circ$ que são característicos da parte cristalina da QT. Esses domínios cristalinos são regiões onde as cadeias estão ordenadas devido a ligações de hidrogênio entre os grupos amino entre as cadeias de QT [1]. Yen et al. [141] mostraram que a QT fúngica apresenta picos cristalinos em $2\theta = 9,7^\circ$ e $19,9^\circ$. Prashanth et al. [142] encontraram que o padrão de XRD para a QT extraída de camarão possui dois picos de difração característicos em $2\theta = 9,9^\circ - 10,7^\circ$ e $19,8^\circ - 20,7^\circ$. Fajardo et al. [1], encontraram no difratograma da QT dois sinais em $2\theta = 10,8^\circ$ e $19,9^\circ$, os quais foram atribuídos a regiões cristalinas.

Pela análise dos difratogramas dos derivados quaternários da QT, verificam-se diferenças significativas quando comparados ao difratograma da QT. Nos difratogramas da DMC e TMC-F verifica-se a presença de picos alargados em $2\theta = 8,67^\circ$ e $20,05^\circ$ (Fig. 3.6b) e $2\theta = 23,53^\circ$ (Fig. 3.6c), respectivamente. Esses picos são característicos de amostras pouco cristalinas. A ausência de picos de difração em $2\theta = 6,88^\circ$ e $12,26^\circ$ no difratograma da TMC-F, deve-se a completa N-metilação dos átomos de nitrogênio e a ausência de grupos NH_2 na estrutura química da TMC-F [136]. Os difratogramas das amostras TMC20 e TMC80 apresentaram picos de difração bem definidos, característicos de amostras cristalinas [143]. Os difratogramas dessas amostras foram semelhantes, sendo observados picos de difração intensos em $2\theta = 27,47^\circ$; $31,78^\circ$; $45,54^\circ$; $56,69^\circ$ e $66,26^\circ$, o que sugere a formação de regiões cristalinas com diferentes regiões periódicas.

Os picos de difração cristalina presentes nos difratogramas da TMC20 e TMC80 se devem ao fato destes derivados estarem na forma de sais de cloreto [82,

104]. Martins et al. [144] estudaram a cristalinidade dessas amostras antes e após a diálise. Eles verificaram que a TMC-OM antes da diálise apresentou picos de difração intensos e estreitos. Em contrapartida, a TMC-OM após o processo da diálise apresentou picos de difração de baixa intensidade e alargados. Aqueles autores associaram esse fato às interações dos contra-íons cloreto com os grupos ^+NT da TMC.

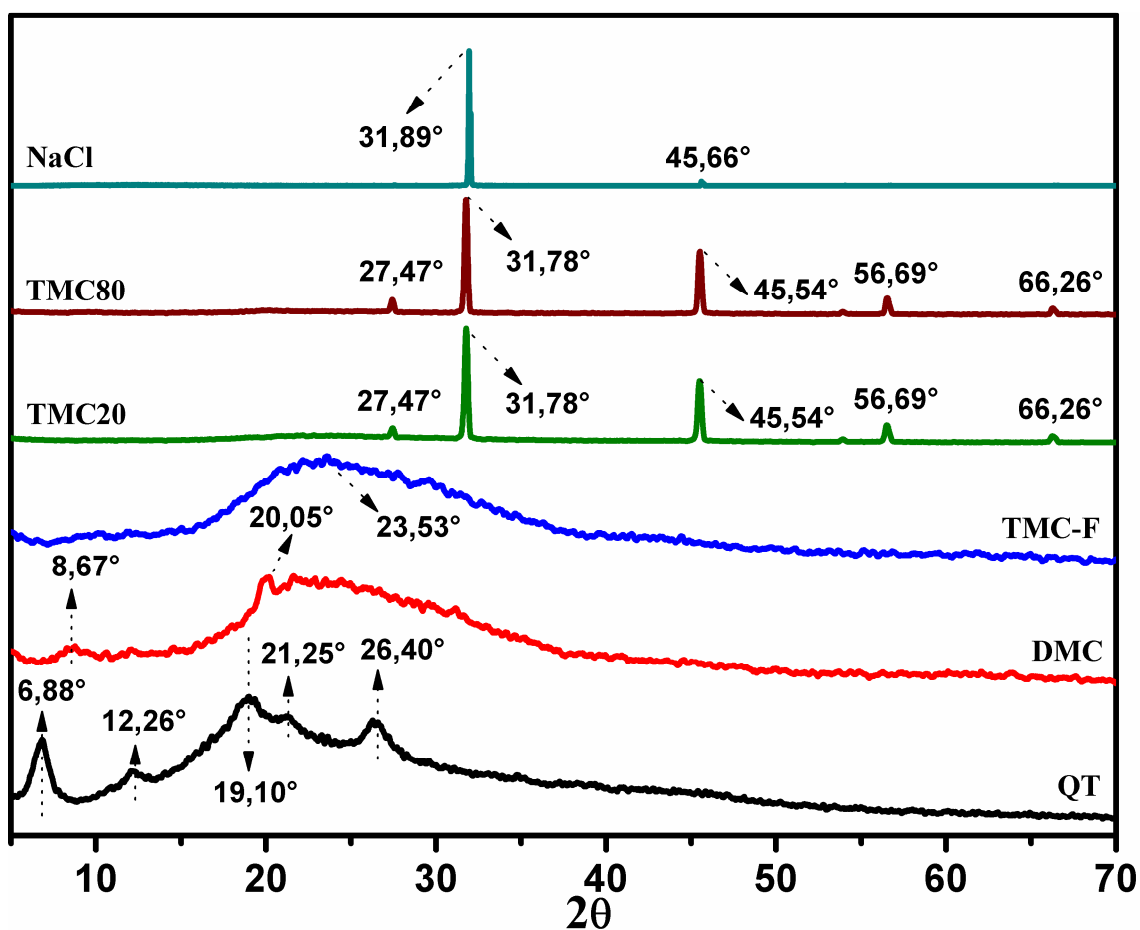


Figura 3.6. Difratomogramas de raios-X da QT, DMC, TMC-F, TMC20 e TMC80.

O efeito da blindagem provocada pelos íons cloreto torna as cadeias mais rígidas, consequentemente mais cristalinas [144]. Para os demais derivados, que apresentaram baixa cristalinidade, tem-se a prevalência de regiões de repulsão nas

amostras. Na estrutura da TMC-F, obtida após diálise, a repulsão ocorre devido à desblindagem dos sítios NT⁺.

3.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA e DTG da QT e de seus derivados estão apresentadas na Figura 3.7. Pela análise das curvas, pode-se verificar a existência de duas etapas distintas sendo a segunda relativa a degradação desses materiais. A primeira etapa ocorre entre 30 °C a 100 °C com perda de massa que variou entre 4-15 % e foi atribuída à evaporação de água e compostos voláteis [87, 140]. Nota-se que essas amostras apresentaram diferentes teores de água. A TMC-F e DMC apresentaram maior teor (% em massa) de água (14,12 e 12,00; respectivamente). A QT apresentou um valor intermediário (10,15% em massa), enquanto que TMC20 e TMC80 apresentaram valores menores (5,70% e 4,05%, respectivamente).

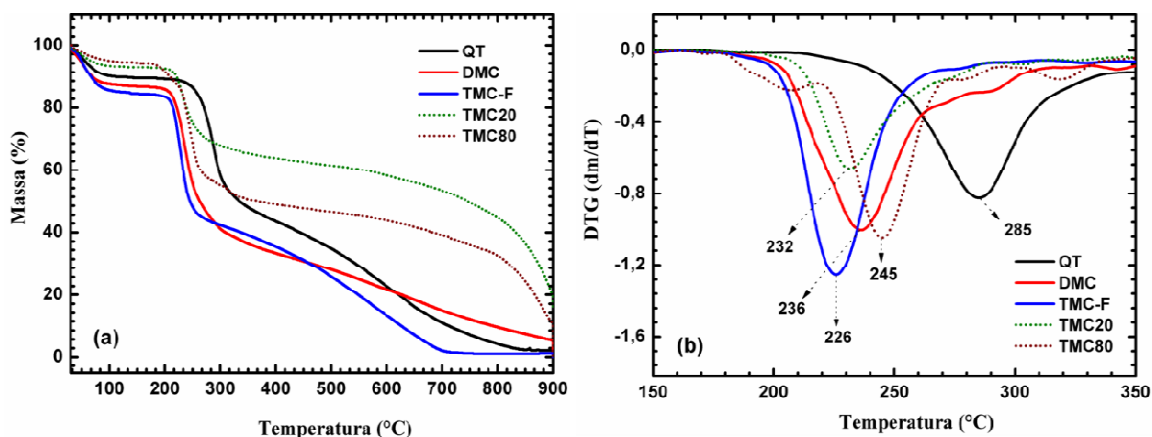


Figura 3.7. Curvas de TGA (a) e DTG (b) da QT e seus derivados.

O maior conteúdo de água na TMC-F ocorre devido ao aumento da hidrofilicidade do material com a quaternização. A densidade de cargas positivas nos átomos de nitrogênio possibilita maior interação com moléculas de água quando

comparada a QT e DMC [129, 140]. Assim, maior quantidade de água é necessária para diminuir a repulsão entre as cadeias de TMC positivamente carregadas. Vale ainda destacar que a TMC-F e DMC apresentam em sua estrutura grupamentos hidroxila que interagem fortemente com água via interações tipo ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo. Os grupamentos hidroxila (-OH) e amino (-NH₂) na estrutura sacarídea da QT fornecem sítios para interações com a água. Em contraste, as moléculas de TMC-OM (20 e 80 %) apresentam em sua estrutura grupos metílicos (hidrofóbicos) inseridos nas posições C2, C3 e C6, o que dificulta a sua interação com as moléculas de água [81, 129].

A segunda etapa de perda de massa ocorreu na faixa de 200 a 350 °C e foi atribuída à degradação das amostras (decomposição da cadeia principal da QT e de seus derivados e a clivagem dos grupos substituintes) [140]. O valor exato da temperatura em que a segunda etapa ocorreu foi obtido por meio da primeira derivada (DTG) da respectiva curva de TGA (Fig. 3.7a). A temperatura máxima de degradação térmica registrada para as amostras em estudo foram de: 285 °C para a QT, 236 °C para DMC; 226, 232, 245 °C para a TMC-F, TMC20 e TMC80, respectivamente. Nota-se que a estabilidade térmica diminuiu após subsequente quaternização e que a TMC20 e TMC80 apresentaram maior estabilidade térmica que a TMC-F. Este fato pode ser devido ao efeito da blindagem dos íons cloreto, como anteriormente discutido nas análises de raios-X. Este fato corrobora com a maior cristalinidade na TMC20 e TMC80.

3.5. Conclusões

A N,N,N-trimetilquitosana livre de grupos O-metílicos (TMC-F) e O-metilada (TMC-OM) foram sintetizadas por meio da N-metilação da quitosana (QT) e

caracterizadas por meio de FTIR, ^1H NMR, XRD e TGA. Os resultados mostraram que a TMC-OM com baixo grau de quaternização (20%) foi efetivamente sintetizada, utilizando apenas uma etapa de reação. A síntese da TMC-OM com maior grau de quaternização (80%) requer duas ou mais etapas de reação. A TMC-F foi obtida por meio da subsequente reação de metilação da N,N-dimetilquitosana (DMC). Os resultados de XRD mostraram existência de cristalinidade das amostras de TMC-OM devido à presença dos contra-íons cloreto, e uma maior estabilidade térmica quando comparado a TMC-F. A TMC livre de grupos O-metílicos apresentou menor estabilidade térmica e menor cristalinidade comparada a QT e a TMC O-metilada.

Capítulo 4

Filmes de multicamadas antiadesivos e antibacterianos formados por complexos de TMC/Heparina por meio da técnica de automontagem Layer-by-Layer

Resumo

A N,N,N-trimetilquitosana (TMC), um agente antibacteriano, e a heparina (HEP), um biopolímero antiadesivo, foram alternativamente depositados sobre filmes de poliestireno modificado, como substrato, para construir filmes de multicamadas com propriedades antiadesiva e antibacteriana. As propriedades dos filmes multicamadas foram investigadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força de Kelvin. Estudos *in vitro* da liberação controlada da HEP foram realizados em fluido intestinal simulado (SIF) e em fluido gástrico simulado (SGF). O teste de adesão inicial da *E. coli* sobre a superfície de filmes de multicamadas mostraram propriedades antiadesivas efetivas. O teste antibacteriano *in vitro* indicou que os filmes de multicamadas de TMC/HEP baseados em TMC80 podem matar as bactérias *E. coli*. Portanto, filmes finos de multicamadas antiadesivos e antibacterianos podem apresentar bom potencial para o uso em revestimentos e para a modificação da superfície de materiais em aplicações biomédicas.

Palavras chave: N,N,N-trimetilquitosana, heparina, Layer-by-Layer, bactericida, antiadesivo.

Abstract

N,N,N-Trimethyl chitosan (TMC), an antibacterial agent, and heparin (HEP), an antiadhesive biopolymer, were alternately deposited on modified polystyrene films, as substrates, to built antiadhesive and antibacterial multilayer films. The properties of the multilayers films were investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and Kelvin force microscopy. *In vitro* studies of controlled release of HEP were performed in simulated intestinal fluid (SIF) and simulated gastric fluid (SGF). The initial adhesion test of *E. coli* on multilayers films surfaces showed effective antiadhesive properties. The *in vitro* antibacterial test indicated that the multilayers films of TMC/HEP based on TMC80 can kill the *E. coli* bacteria. Therefore, antiadhesive and antibacterial multilayer films may have good potential for coatings and surface modification for biomedical applications.

Keywords: N,N,N-trimethyl chitosan, heparin, Layer-by-Layer, bactericidal, antiadhesive.

4.1. Introdução

A N,N,N-trimetilquitosa (TMC) é um polycation quaternário obtido a partir da N-metilação da quitosana (QT) [81]. Da mesma forma que a QT, a TMC também possui propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesividade, não toxicidade e atividade antimicrobiana. Contudo, estudos recentes mostraram que a TMC tem maior capacidade bactericida do que a QT [145]. Por outro lado, tal atividade antimicrobiana depende da estrutura química quaternária, massa molar, e grau de quaternização (GQ) da TMC [146-148]. O grau de quaternização (GQ) e grau de dimetilação (GD) referem-se, respectivamente, a porcentagem molar dos grupos $-N(CH_3)_3^+$ e $-N(CH_3)_2$ presentes na estrutura da TMC [137]. Outra vantagem da TMC sobre a QT é, que a mesma, possui maior solubilidade em uma maior faixa de pH quando comparada com a QT, enquanto que esta é solúvel apenas em $pH < 6,5$ [82, 104, 149, 150]. Portanto, em ambientes neutros e básicos, predominantes no intestino humano, as moléculas de QT perdem sua carga e precipitam [81]. Assim, a solubilidade limitada da QT em meios com pH maiores que 6,5 restringe a sua aplicação biomédica, principalmente em situações onde a entrega controlada de fármacos é necessária [151].

A Heparina (HEP) é um poliânion biocompatível com atividade anticoagulante. Este biopolímero tem aplicações na indústria farmacêutica, dispositivos médicos e engenharia de tecidos [12-14]. A alta densidade de carga negativa da HEP impede a adesão de células bacterianas e, portanto, este biopolímero é um excelente candidato para atuar como revestimentos antiadesivos [74]. Assim, formulações de complexos polieletrólitos baseados na TMC (polycation antibacteriano) e HEP (poliânion antiadesivo) podem apresentar potencial para aplicação como dispositivos biomédicos [17, 81]. Nesta direção, Kweon et al. [152] desenvolveram uma pomada de uso tópico à base de QT e HEP que promove uma acentuada aceleração na capacidade de

cicatrização de feridas em ratos. Zhu et al. [73] aumentaram a biocompatibilidade do sangue com politetrafluoretileno expandido (ePTFE), aderindo o complexo polieletrólítico de QT e HEP sobre a superfície do ePTFE, uma vez que enxertos de ePTFE são amplamente empregados em cirurgia vascular reconstrutiva [153].

A técnica de adsorção "*Layer-by-Layer*" (LbL) de polieletrólitos de cargas opostas é um método eficiente de fabricação de filmes de multicamadas de macromoléculas biocompatíveis [9, 20, 154]. O método envolve, sequencialmente, a imersão de um substrato carregado em soluções aquosas diluídas de polieletrólitos de cargas opostas, permitindo que o polímero ao ser adsorvido reverta a carga superficial predominante antes da sua adsorção. O processo pode ser repetido várias vezes. Assim, a espessura da camada LbL é determinada pelo número de imersões. Este método possui vantagens que incluem a simplicidade, a universalidade, baixo custo operacional e o controle da espessura do filme [9, 17, 21, 155]. Por exemplo, Fu et al. [74] desenvolveram filmes LbL baseados em QT e HEP sobre substratos de poli(etileno tereftalato) (PET) quimicamente modificado. Os filmes desenvolvidos apresentaram boas propriedades antimicrobianas e antiadesivas.

Dessa forma, o objetivo geral neste Capítulo 4 da Tese foi a obtenção de filmes finos de multicamadas de TMC/HEP por meio da técnica de automontagem LbL, usando poliestireno quimicamente modificado (PS-mod) como substrato. Objetiva-se a construção de filmes finos, com propriedades antiadesiva e antibacteriana, que possam ser utilizados em revestimentos de biomateriais, em áreas onde o risco de infecção por microorganismos ainda não é controlado.

Os objetivos específicos buscados neste Capítulo 4 da Tese foram:

- Obter filmes finos de TMC/HEP, variando o GQ da TMC e o pH de montagem das multicamadas, por meio da técnica de deposição Layer-by-Layer. As TMCs utilizadas possuem diferentes GQ (TMC20 e TMC80). Dessa forma, será possível avaliar o efeito do GQ sobre os filmes formados;
- Caracterizar os filmes finos obtidos utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (SEM), ângulo de contato, microscopia de força atômica (AFM) e microscopia de força de Kelvin (KFM);
- Estudar a liberação controlada da HEP a partir dos filmes obtidos, em fluido simulado gástrico (SGF) e intestinal (SIF);
- Avaliar as propriedades antimicrobianas e antiadesivas dos filmes formados.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Materiais

Quitosana (CAS 9012-76-4) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica (Mv) igual a $8,7 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ foi adquirida da Golden-Shell Biochemical (China); azul de metileno (CAS 97130-83-1) foi comprada da Sigma (EUA). Heparina sódica (CAS 9041-08-1) foi gentilmente cedida pela Kin Master (Brasil). TMC20 e TMC80 com graus de quaternização (GQ) iguais a 20% e 80%, e massa molar viscosimétrica de $26 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $13 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente. Sintetizadas como descrito no Capítulo 3. A viscosidade foi determinada solubilizando as amostras em uma solução tampão de ácido acético/acetato de sódio utilizando um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde (Modelo Cannon 100/E534), a 25 °C. As constantes utilizadas na equação de Mark-Houwink-Sakurada para a TMC foram $K = 1,38 \times 10^{-5}$ e $a = 0,85$ [1]. Placas de Petri de poliestireno foram compradas da Prolab (Brasil) e outros

reagentes (hidróxido de sódio, cloreto de sódio, persulfato de sódio, ácido clorídrico, hidrogenofosfato de potássio e etanol) foram também utilizados. Todos os reagentes mencionados foram usados como recebidos do fornecedor, ou seja, sem nenhuma purificação adicional.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Modificação da superfície do poliestireno por oxidação

Placas de Petri de poliestireno foram cortadas, nas dimensões de 7,5 x 2,5 cm, e imersas em etanol durante 24h a fim de remover o máximo possível as impurezas contidas na superfície. Após esse período, os filmes de PS foram lavados com água deionizada em abundância e submetidos ao processo de oxidação. Para tal, os filmes foram mantidos em solução de persulfato de sódio (10% m/v) durante 90 minutos, à temperatura de 70 °C. Após o processo de oxidação, os mesmos foram lavados com água deionizada em abundância [156]. A denominação de PS-mod foi utilizada para se referir aos filmes de poliestireno oxidados.

4.2.2.2. Preparação dos Filmes Finos de Multicamadas

O substrato sólido PS-mod, com superfície de carga negativa, foi imerso em uma solução de 2% (m/v) de TMC20 (pH 3,0) ou TMC80 (pH 3,0 e 7,4). O tempo de imersão foi fixado em 60 segundos. Posteriormente, o conjunto PS-mod/TMC foi lavado por 30 segundos em uma solução aquosa de mesmo pH da solução da TMC, a fim de eliminar o excesso do material não adsorvido no substrato. Após 30 segundos (tempo de secagem) o material com uma camada de TMC20 (ou TMC80) adsorvido sobre a superfície do PS-mod foi imerso por 60 segundos em uma solução aquosa de 2% (m/v) de HEP (pH 3,0 e 7,4), novamente lavado e seco, seguindo o mesmo tempo

de imersão e secagem mencionados anteriormente. As imersões foram realizadas com o auxílio de um aparelho semi-automático "*dip-coating*" desenvolvido e adaptado por nosso grupo de pesquisa. Assim, filmes finos de multicamadas de TMC20/HEP (pH 3,0) e TMC80/HEP (pH 3,0 e 7,4) com 3, 9, 12 e 18 bicamadas foram obtidos a partir das condições descritas acima.

4.2.3. Análise da superfície

4.2.3.1. Medições do ângulo de contato

Os ângulos de contato da gota de água (Mili-Q[®]) depositada sobre a superfície do PS virgem, PS-mod e filmes finos de TMC/HEP (18 bicamadas) foram medidos em temperatura ambiente, utilizando aparelho de ângulo de contato Tantec Contact Angle Meter (modelo Cam Micro, EUA). O valor do ângulo de contato apresentado é uma média de seis medidas diferentes, realizada sob as mesmas condições experimentais e em partes distintas de uma dada amostra.

4.2.3.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

As estruturas químicas dos filmes de multicamadas de TMC/HEP, bem como o crescimento do número de bicamadas, foram caracterizadas por meio da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) usando um espectrômetro BOMEM, modelo MB-100. As análises foram realizadas usando a técnica de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), na faixa de 4000 a 625 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos com uma resolução de 4 cm⁻¹ e foram realizadas 64 acumulações para cada espectro.

4.2.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens de AFM da superfície do PS virgem, PS-mod e filmes finos de multicamadas de TMC/HEP foram obtidos no equipamento de Microscopia de Força Atômica, da Shimadzu (modelo SPM-9500 J3, Japão), a temperatura ambiente.

4.2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram obtidas em microscópio eletrônico Shimadzu (modelo SS-550, Japão) e usadas para maior detalhamento das regiões de superfície dos filmes. O equipamento foi operado com tensão de aceleração de 10 e 12 kV e foram feitos aumentos de 1000 e 2000 vezes. Os materiais foram colocados diretamente sobre o porta-amostras. As amostras foram recobertas com uma camada de ouro para evitar acúmulo de carga, devido a sua baixa condutividade [157]. Todas as análises foram realizadas a 20 °C. Filmes de PS virgem e PS-mod foram usados como controles.

4.2.3.5. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A composição química dos domínios presentes no filme de poliestireno oxidado foi avaliada usando um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, modelo SS-550) equipado com micro sonda de energia dispersiva de raios-X (EDX). Essa análise foi realizada com o objetivo de identificar a presença de oxigênio na estrutura do PS-mod.

4.2.3.6. Microscopia de Força de Kelvin (KFM)

As amostras de filmes multicamadas de TMC/HEP foram cortadas em pequenos quadrados (~5 mm de borda) e imagens foram obtidas no modo não contato. Foi usado

um microscópio de varredura por sonda (Shimadzu, modelo SPM-9600), com uma ponteira de silício da Nanoworld EFM-20 (frequência de ressonância = 79 kHz e força constante = $2,6 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$). Este equipamento, localizado no IQ-UNICAMP, é contido em uma câmara ambiental que permite controlar a umidade relativa, pressão e temperatura ($25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durante a análise por meio de varredura de força Kelvin.

4.2.4. Adesão inicial da *Escherichia coli* (*E.coli*) sobre substratos de PS-mod com filmes finos de multicamadas de TMC/Heparina

Amostras (cada uma com c.a 1 cm^2 de área) dos filmes finos de multicamadas de TMC/HEP foram colocadas em placas de cultura de 24 poços. Então, 1 mL da suspensão bacteriana ($5 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) em PBS (solução salina tamponada) foi adicionado em cada poço. A placa de cultura foi incubada a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h. Então, a suspensão bacteriana foi removida e as amostras lavadas três vezes com PBS estéril. Filtro de papel esterilizado foi usado para retirar umidade na superfície do filme. Para a fixação da *E. coli* as amostras foram imersas em formaldeído 4% em PBS a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 h. Após este período, a solução de formaldeído foi removida e as amostras foram lavadas com PBS, e desidratadas com 25, 50, 70, 95 e 100% de etanol (v/v) por 10 minutos cada. Em seguida, os substratos foram secos e recobertos com uma fina camada de ouro para fins de obtenção de imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (Shimadzu, modelo SS 550, Japão). As amostras foram também analisadas por Microscopia de Interferência de Normaski (Olympus BX51, Japão) e as imagens foram capturadas com uma câmera UC 30° (Olympus). Filmes de PS virgem e PS-mod foram usados como controle [74].

4.2.5. Teste antibacteriano *in vitro*

Os testes de atividade antibacteriana dos filmes finos contra a *Escherichia coli* (*E. coli*; ATCC 26922) foram realizados de acordo com o método de viabilidade celular por meio de contagem [74]. As amostras (1 cm²) dos filmes finos de multicamadas de TMC/HEP foram colocadas em placas de cultura de 24 poços e 1 mL de inóculo de *E. coli* (5x10⁴ UFC·mL⁻¹) em PBS foi adicionado na superfície dos substratos. A suspensão da *E. coli* cobriu completamente a superfície dos filmes. Em paralelo, a *E. coli* (5x10⁴ UFC·mL⁻¹) foi usada como controle positivo. As placas foram incubadas a 37 °C por 6 horas. Em seguida, alíquotas de suspensões bacterianas foram diluídas com PBS estéril para uma concentração final de 5x10³ UFC·mL⁻¹. A partir dessa solução, 20 µL foram espalhadas em Agar Tríptico de Soja (TSA). Após a incubação por 24 h, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.6. Liberação *in vitro* da Heparina

Os estudos da liberação *in vitro* da heparina foram realizados em dois ambientes diferentes, ambos sem a presença de enzimas: fluido intestinal simulado (SIF - 6,8 g de KH₂PO₄ e 77 mL de uma solução aquosa de NaOH 0,2 mol·L⁻¹ em 1000 mL de água destilada, pH = 6,8) e fluido gástrico simulado (SGF - 2,0 g de NaCl e 7,0 mL de HCl 37% (v/v) em 1000 mL de água, pH = 1,2). Cinco amostras (1,0 cm²) de cada filme de TMC/HEP (18 bicamadas) foram colocados em um frasco selado com 25 mL de SGF ou SIF a 37 °C. Em intervalos desejados de tempo, uma alíquota (100 µL) foi removida do frasco e adicionada diretamente em 4,0 mL de uma solução aquosa de azul de metileno (AM) (5,0 mg·L⁻¹, pH 5,5) para a quantificação de heparina liberada por meio de medidas de UV. As medidas de absorbância do complexo metacromático azul de

metileno/heparina (AM/HEP) foram realizadas imediatamente após a homogeneização das amostras, que ocorreu rapidamente após a mistura, de acordo com a metodologia descrita por Martins et al. [129]. Para quantificar o soluto liberado dos filmes de multicamadas da TMC/HEP, foram construídas duas curvas analíticas correlacionando a absorção de complexos de AM/HEP com a concentração de heparina (0,20 a 7,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) usando os meios SGF ($R^2 = 0,987$) ou SIF ($R^2 = 0,989$), como solventes. As análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (Femto, Brasil) modelo 800Xi e as leituras foram feitas a 567 nm.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Modificação química da superfície do poliestireno (PS) para obter o PS-mod

4.3.1.1. Medidas de ângulo de contato

Medidas de ângulo de contato do PS virgem e PS-mod foram realizadas com o objetivo principal de verificar mudanças sobre a superfície de molhabilidade devido ao processo de oxidação. O PS virgem tem características hidrofóbicas, possuindo um alto valor de ângulo de contato, aproximadamente 81° (ver Tabela 4.1). Contudo, o processo de oxidação altera significativamente a molhabilidade da superfície do material com relação ao PS virgem, como verificado pela diminuição do valor de ângulo de contato para aproximadamente 65° (Tabela 4.1). Esta diminuição é uma indicação da modificação química da superfície do PS. Os resultados apresentados são consistentes com a literatura [156]. Segundo Curti et al. [156] a oxidação de poliestireno em solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ é dificultada pelo fato da água presente no meio reacional possuir uma interação muito pequena com a superfície polimérica. Dessa forma, a oxidação provavelmente ocorre de forma mais efetiva nos pontos da superfície em que haja

condições favoráveis para os radicais reagirem, como por exemplo, algum defeito ou irregularidade da superfície.

Tabela 4.1. Valores de ângulo de contato das superfícies do PS virgem e PS-mod.

Filmes de PS antes da modificação	Filmes de PS após a modificação
$82^\circ \pm 1,63$	$66^\circ \pm 3,47$
$81^\circ \pm 2,75$	$58^\circ \pm 4,19$
$84^\circ \pm 1,63$	$64^\circ \pm 4,68$
$81^\circ \pm 1,51$	$68^\circ \pm 3,41$
$78^\circ \pm 3,28$	$65^\circ \pm 4,69$
$81^\circ \pm 1,00$	$66^\circ \pm 3,03$

4.3.1.2. Análise de AFM e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Imagens da superfície do PS virgem, PS-mod e PS-mod com uma camada de TMC80 depositada em pH 7,4, obtidas por AFM, são apresentadas na Figura 4.1. Como esperado, o PS virgem apresentou uma superfície lisa, compacta e mais homogênea (Fig. 4.1a). O PS-mod possui superfície rugosa com projeções e alta heterogeneidade (Fig. 4.1b). A rugosidade é maior na superfície de PS-mod do que no PS virgem. Este fato, juntamente com o aumento da molhabilidade na superfície do PS-mod, confirma a modificação química na superfície do PS.

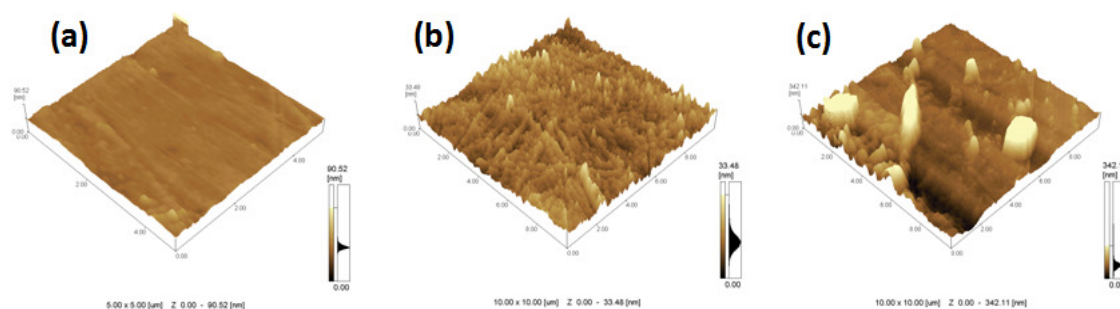


Figura 4.1. Imagens de AFM do PS: (a) virgem, (b) oxidado e (c) oxidado com uma camada de TMC80 adsorvida em pH 7,4.

Ainda assim, a análise de EDS foi realizada para identificar a presença de oxigênio na amostra e, com isso, ratificar a ocorrência da modificação química do polímero usado como substrato neste trabalho, cujo espectro de EDS é mostrado na Fig. 4.2. A presença do sinal de átomos de oxigênio no espectro de EDS do PS-mod confirmou a existência de átomos de oxigênio na superfície da amostra. O PS virgem não contém este elemento em sua estrutura, evidenciando assim a oxidação do filme com persulfato de sódio [156].

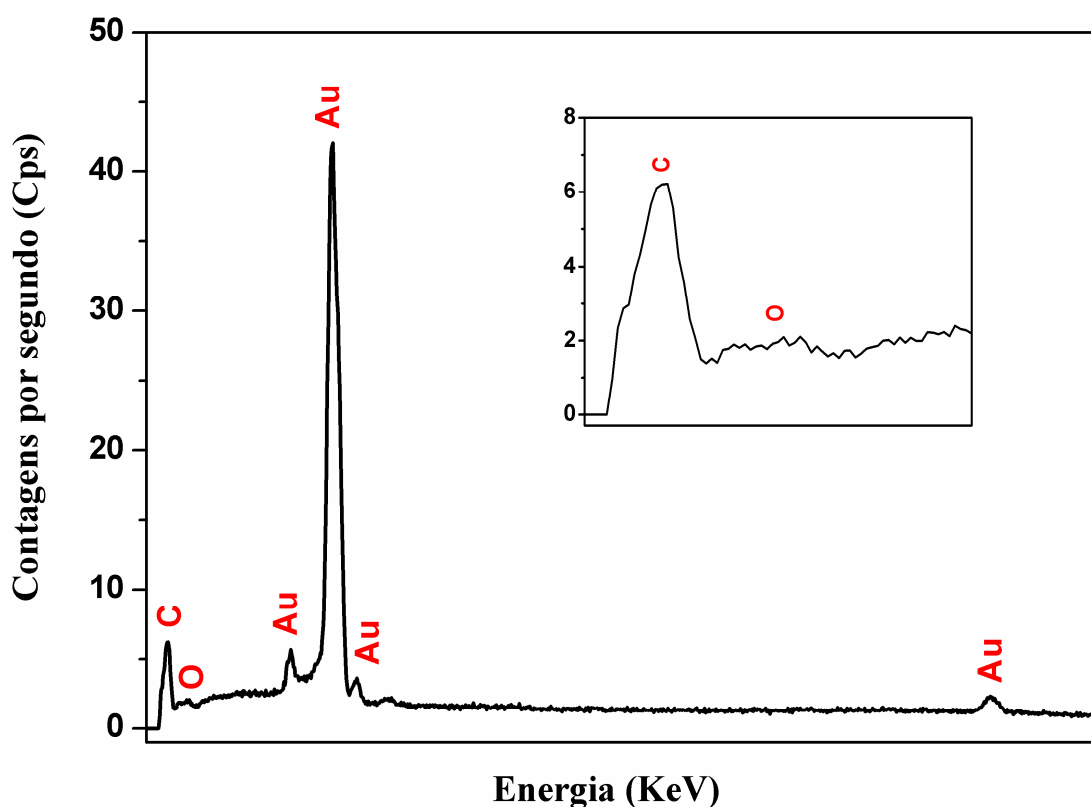


Figura 4.2. Espectro de EDS do PS-mod.

A presença de Au na amostra deve-se ao fato do filme ter sido metalizado com uma fina camada de ouro. A adsorção da TMC80 provoca alterações topográficas em relação a superfície do PS-mod (veja a Fig. 4.1b,c). A análise topográfica da superfície

do PS-mod contendo TMC80 adsorvido mostrou que a superfície de tal material é menos plana e com presença de pontos de rugosidade, em contraste com o PS-mod. Assim, confirma-se que houve a formação de uma camada de TMC sobre a superfície de PS-mod.

4.3.2. Caracterização das multicamadas adsorvidas sobre a superfície do PS-mod

4.3.2.1. Espectroscopia de FTIR-ATR

Na Figura 4.3 (A,B,C) são apresentados os espectros de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP preparados em pH 3,0 e TMC80/HEP preparados em pH 3,0 e 7,4, respectivamente.

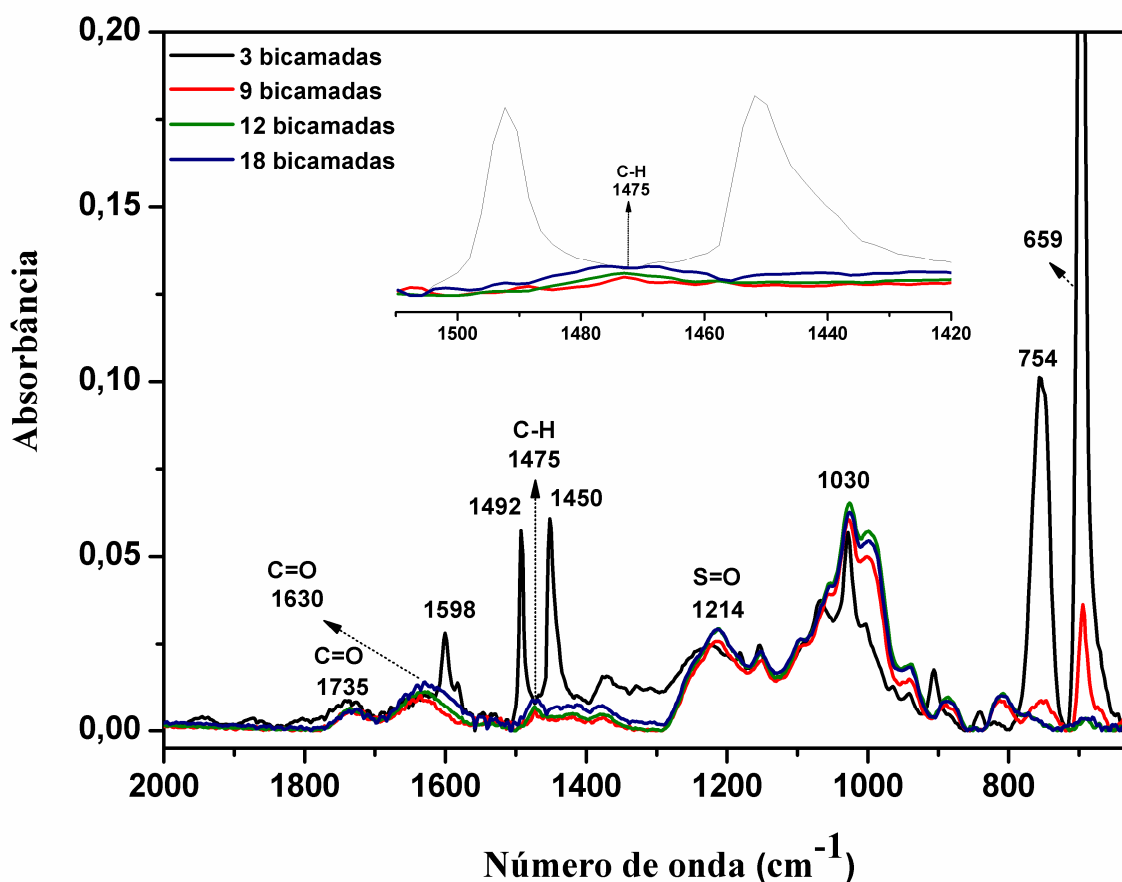


Figura 4.3A. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP preparados em pH 3,0.

Estiramentos atribuídos à deformação angular das ligações C=C (1492 e 1598 cm^{-1}); H-C-H (1450 e 1459 cm^{-1}) e C-H (659 e 754 cm^{-1}) são característicos do poliestireno e estão presentes no espectro FTIR-ATR do poliestireno oxidado [158]. Com o aumento do número de bicamadas (TMC/HEP) há diminuição da intensidade de todas essas bandas (Figura 4.3A-C). Contudo, a confirmação da adsorção dos polissacarídeos (HEP e TMC) sobre a superfície de PS-mod foi ratificada pelo aumento na intensidade das bandas relativas ao estiramento das ligações C=O dos ácidos carboxílicos (1735 cm^{-1}), amida secundária e ânions carboxilato (1601 a 1655 cm^{-1}); S=O (1219 e 1225 cm^{-1}) e C-O (1030 cm^{-1}) de alcoóis primários, como mostrado na Figura 4.3 (A,B,C), respectivamente.

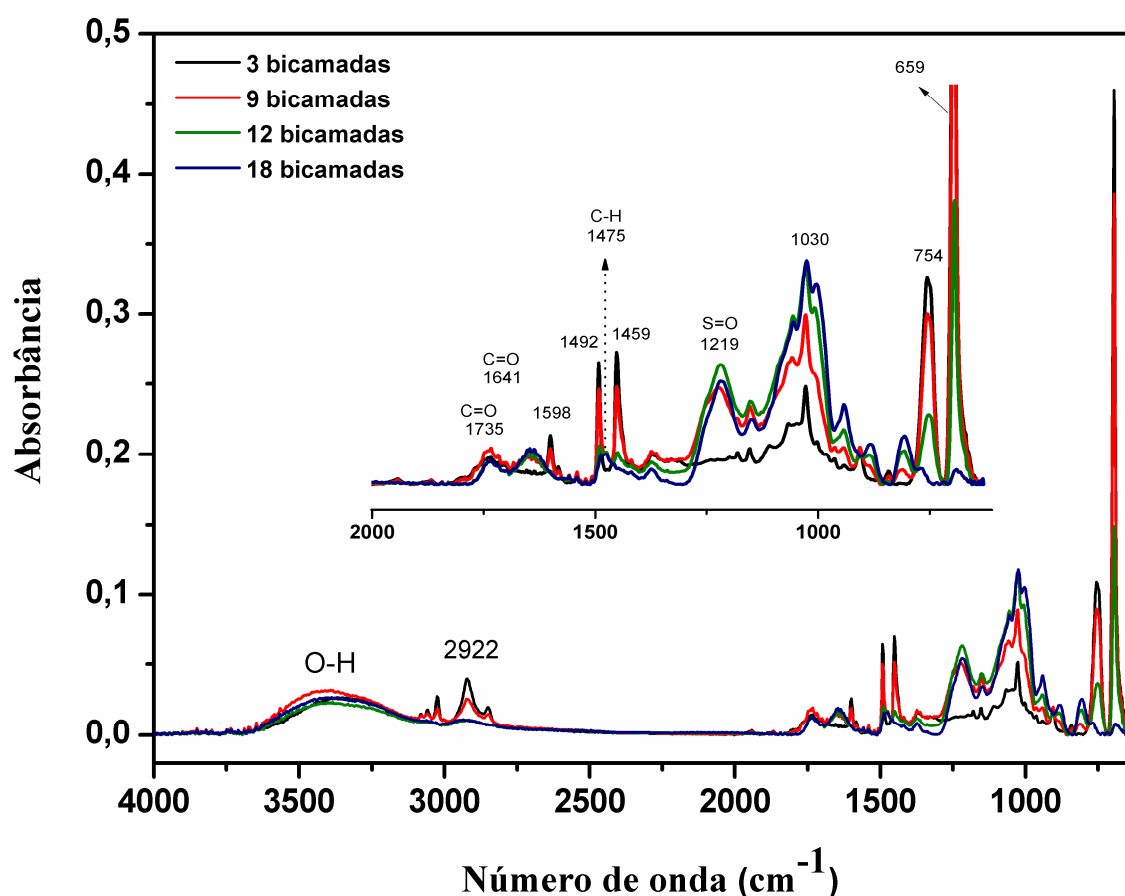


Figura 4.3B. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 3,0.

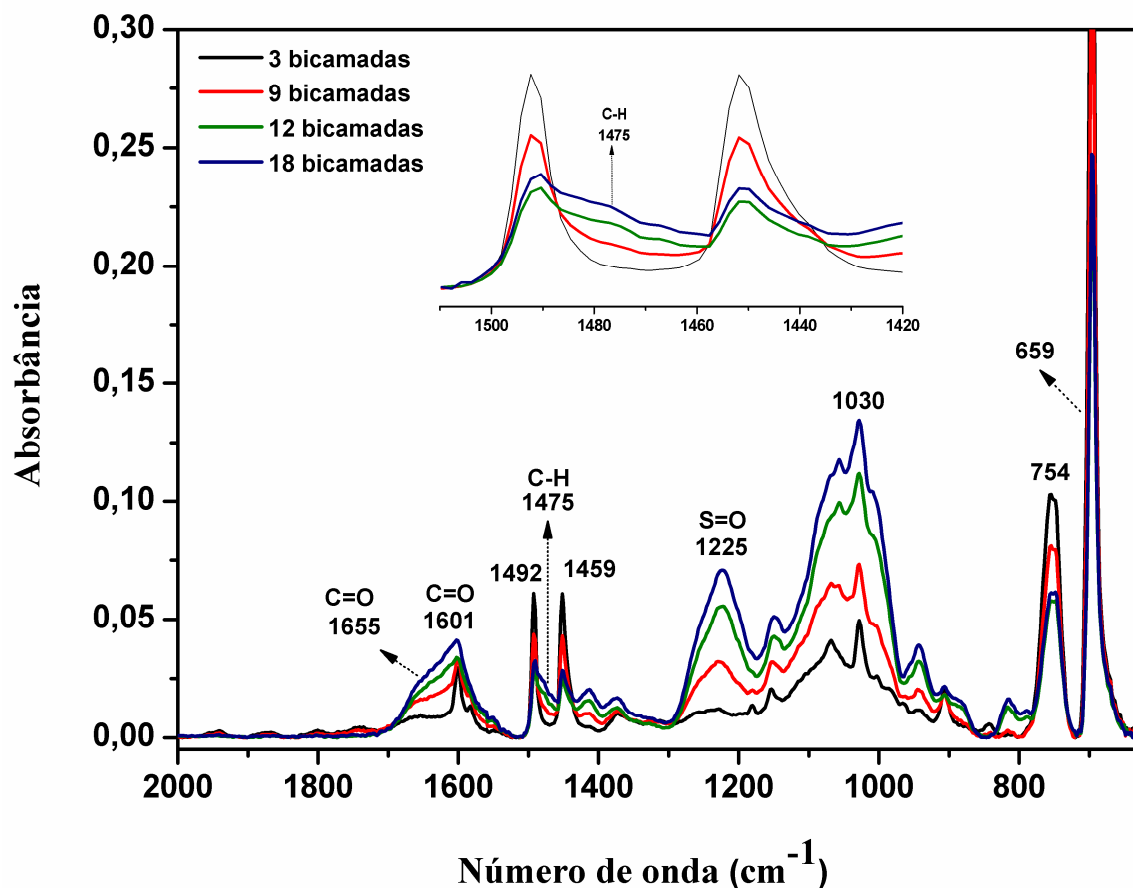


Figura 4.3C. Espectro de FTIR-ATR dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 7,4.

Vale ressaltar o aumento na intensidade das bandas em 1219 e 1225 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações S=O presentes na estrutura da HEP (Fig. 4.5). A banda em 1475 cm^{-1} (Fig. 4.3A) está relacionada à deformação angular das ligações de C-H dos grupamentos metílicos existentes em maior proporção na estrutura da TMC20. Esta banda é observada apenas no espectro da Figura 4.3A. Na Figura 4.3B,C há sobreposição da banda em 1475 cm^{-1} pelas bandas em 1459 e 1492 cm^{-1} . A maior diferença observada entre os espectros de FTIR-ATR (Fig. 4.3) foi devido à diferença nas condições de pH que os filmes de multicamadas de TMC/HEP foram automontados. Por exemplo, a banda em 1735 cm^{-1} (Fig. 4.3 A,B) foi atribuída aos grupos de ácido

carboxílico que são parcialmente ionizados na estrutura da HEP em meio ácido (veja Fig. 4.5). Contudo, esta banda não foi observada no espectro de FTIR-ATR da Figura 4.3C devido a completa ionização dos grupos de ácido carboxílico em pH 7,4.

4.3.2.2. Análise de AFM

A Figura 4.4 (A,B,C) mostra imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP obtidos em pH 3,0 e dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP obtidos em pHs 3,0 e 7,4. Com o aumento no número de bicamadas há diminuição das ondulações e projeções e a minimização das depressões sobre a superfície dos filmes de multicamadas. A topografia dos filmes (Fig. 4.4 A-C) apresentaram diferenças significativas que dependem do pH e da heterogeneidade estrutural da TMC. Após a análise da Figura 4.4 pode-se inferir que o sistema de TMC20/HEP apresentou maior compatibilidade com a superfície do PS-mod em relação ao sistema TMC80/HEP, devido à maior homogeneidade dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP obtidos em pH 3,0 (compare as Figs. 4.4A e 4.4B). Este fato é explicado com base na maior hidrofiliabilidade da TMC20 quando comparada com a TMC80. Essas informações são melhores compreendidas analisando-se a Figura 4.5.

Pela metodologia adotada neste Capítulo da Tese para a síntese da TMC, a reação de obtenção da TMC não é controlada. Desta forma, o processo de metilação não ocorre apenas nos grupos $-NH_2$ da QT, mas também nos grupos $-OH$. O maior número de etapas empregadas na reação da síntese da TMC favorece o aumento do GQ [81, 129, 137]. A TMC20 foi obtida usando metodologia envolvendo uma única etapa e apresentou M_v igual a $26 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Enquanto que a TMC80 foi preparada usando metodologia de duas etapas e apresentou M_v igual a $13 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Portanto, a metodologia utilizada para a síntese da TMC (uma ou duas etapas) influencia

diretamente a massa molar do produto final [81, 129, 137, 144]. O excesso de hidróxido de sódio empregado na síntese da TMC80 diminuiu consideravelmente a massa molar média do derivado da QT (TMC80) para $13 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Adicionalmente, mesmo a menor concentração de íons hidróxido empregada na síntese da TMC20 (uma única etapa) conduziu a menor massa molar média do derivado, passando de $87 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (QT) para $26 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (TMC20).

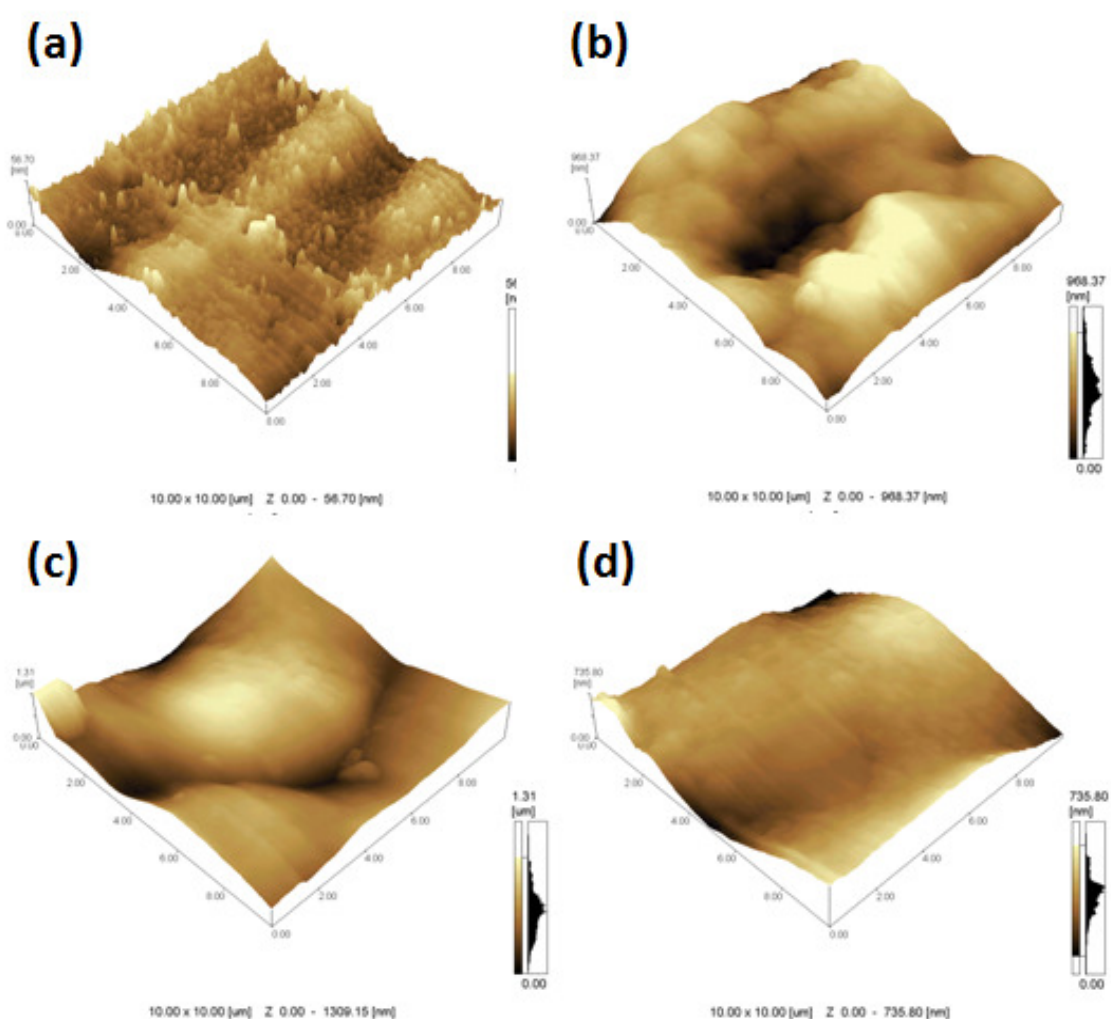


Figura 4.4A. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP obtidos em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas.

A elevada concentração de íons hidróxido faz com que ocorra a clivagem das ligações glicosídicas e com isso a diminuição na massa molar média da TMC quando comparado com a QT [137]. De acordo com Verheul et al. [88] a reação de alquilação dos grupos amino da QT é realizada em condição fortemente alcalina e processada com excesso de iodometano em meio de NMP (solvente). Isto promove a cisão das cadeias do polímero e, o que é mais importante, conduz a metilação parcial e descontrolada nos grupos hidroxilas C3 e C6 das cadeias de QT (Fig. 4.5).

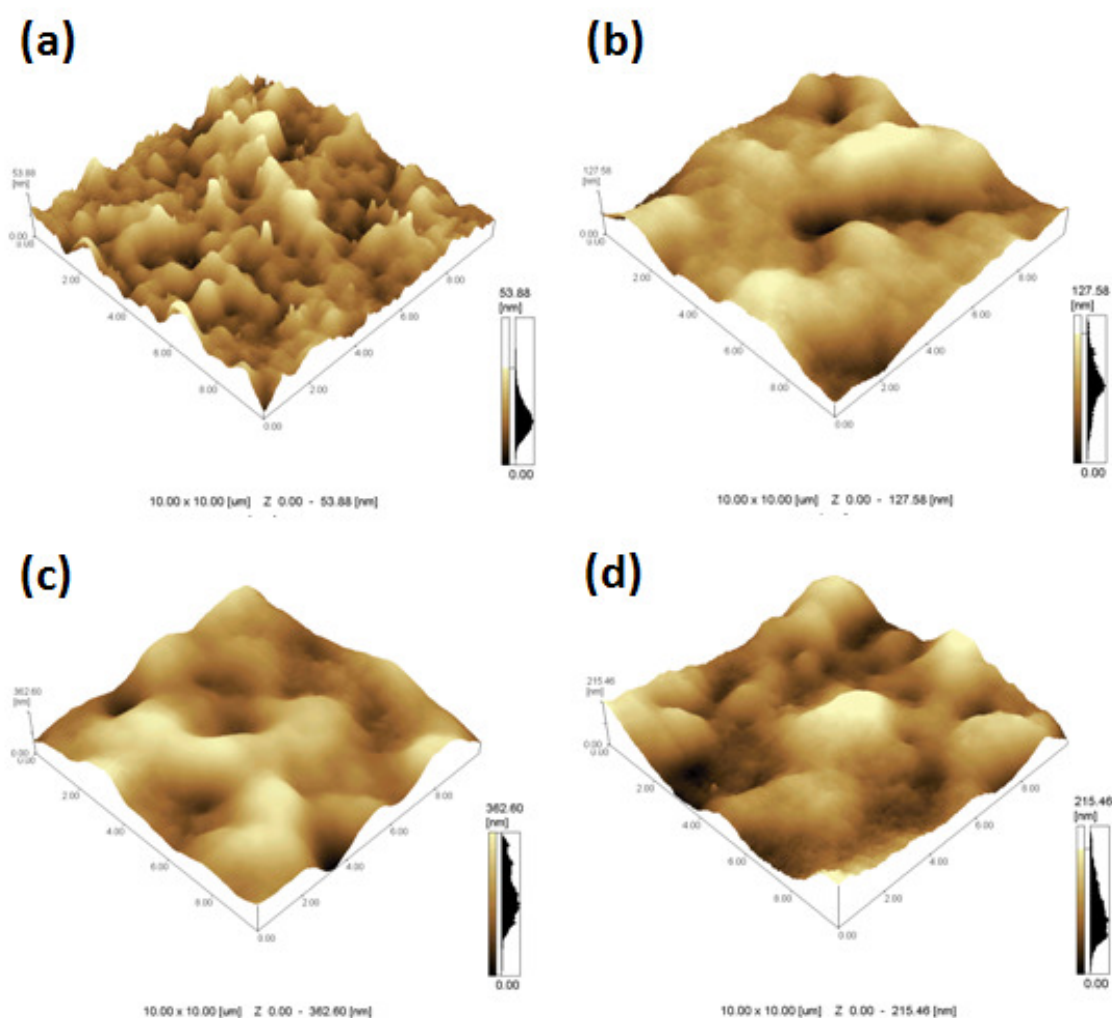


Figura 4.4B. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP obtidos em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas.

Assim, devido ao alto GQ, a TMC80 tem principalmente sítios N-trimetilados e O-metilados em sua estrutura sacarídea (Figura 4.5a,b). A alta densidade de grupos O-metílicos contribui para o aumento da hidrofobicidade da TMC80 frente a TMC20 [81, 129, 137]. Esta característica reduz significativamente a associação entre a TMC80 e a HEP (biopolímero de alta hidrofiliabilidade) [81, 129]. Por isso, é visível ainda nas imagens da Figura 4.4 a existência de depressões e projeções nos filmes de TMC80/HEP com 12 e 18 bicamadas (Figura 4.4B (c,d) e 4.4C (c,d)), não observando o mesmo para os filmes de TMC20/HEP com o mesmo número de bicamadas (Fig. 4.4A (c,d)). A TMC20 tem maior hidrofiliabilidade quando comparada a TMC80 principalmente devido a menor proporção dos sítios O-metilados na sua estrutura (Figura 4.5c). Portanto, a alta densidade de grupos metílicos no C₃-OCH₃ e C₆-OCH₃ é responsável pela alta hidrofobicidade da TMC80 frente a TMC20. As medidas de ângulo de contato confirmaram a maior hidrofiliabilidade da superfície da TMC20/HEP em relação ao sistema de TMC80/HEP. A superfície dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP (pH 3,0), TMC80/HEP (pH 3,0) e TMC80/HEP (pH 7,4) apresentaram ângulo de contato de $25^\circ \pm 2,2$; $45^\circ \pm 3,2$ e $51^\circ \pm 2,3$; respectivamente.

Outro fator que favorece a associação da HEP com a TMC20 é a existência da elevada proporção de grupos amino, sítios N-monometilados e N-dimetilados presentes na estrutura química da TMC20, quando comparada a TMC80 (Fig. 4.5a-c). A menor capacidade hidrofóbica e o efeito estérico dos grupos amino, sítios N-metilados e N-dimetilados quando comparados aos grupos N-trimetilados proporciona maior associação da TMC20 com a HEP em pH 3,0. A maior densidade de grupos -NH₃⁺, -NH₂CH₃⁺ e -NH(CH₃)₂⁺ da TMC20 em pH 3,0 aumentou a sua capacidade de complexação com a HEP, em relação a maior quantidade de sítios N-trimetilados da TMC80 [81, 129]. Portanto, a associação mais forte entre as moléculas de TMC20 e

HEP contribuiu para a obtenção de filmes de multicamadas com superfícies mais homogêneas (Fig. 4.4A), enquanto que os filmes de multicamadas de TMC80/HEP mostraram superfície com maior heterogeneidade (Fig. 4.4B,C).

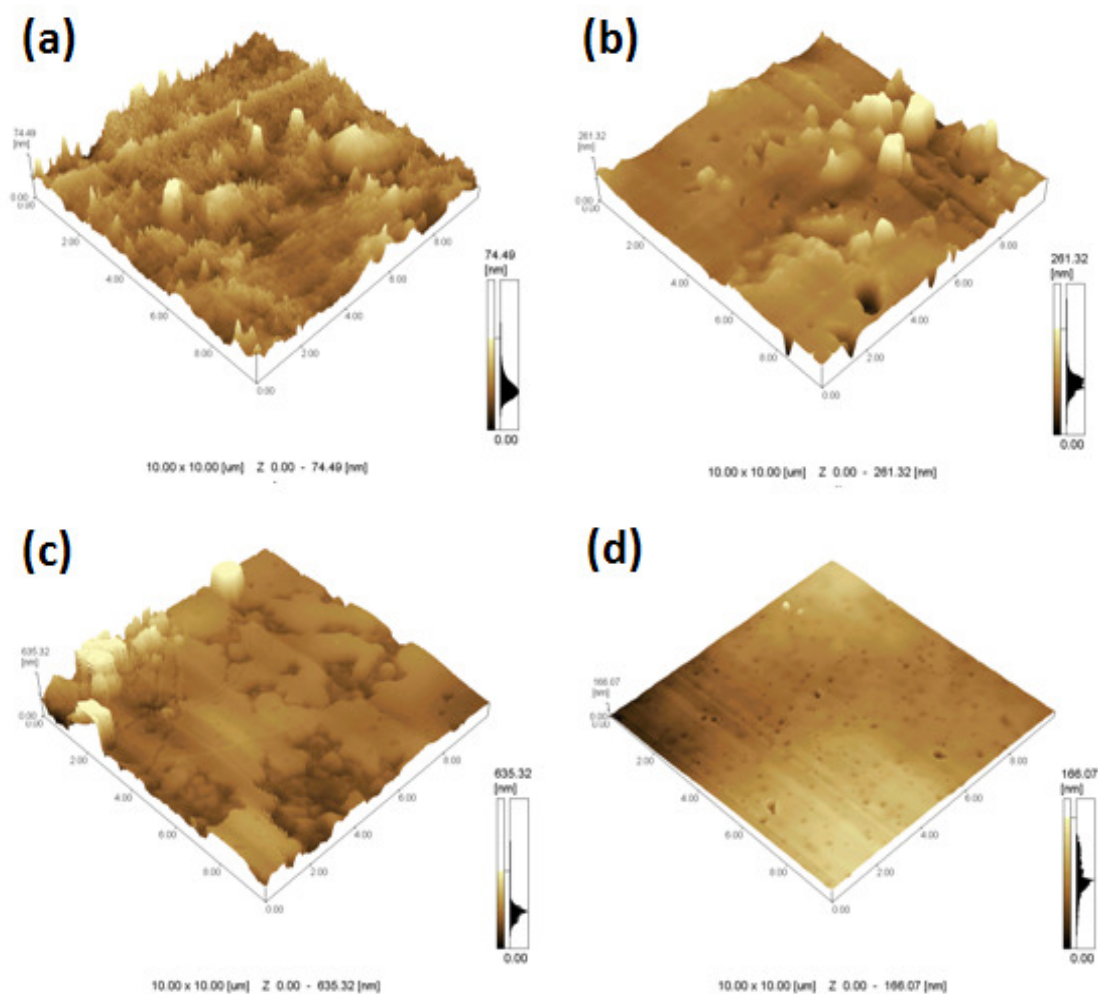


Figura 4.4C. Imagens de AFM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP obtidos em pH 7,4 com: 3 (a), 9 (b), 12 (c) e 18 (d) bicamadas.

Três importantes observações podem ser feitas após a análise das imagens de AFM da superfície dos filmes de TMC/HEP com 18 bicamadas (Figs. 4.4A (d), 4.4B (d) e 4.4C (d)). As multicamadas de TMC20/HEP apresentaram superfícies lisas (Fig. 4.4A (d)), enquanto que as multicamadas de TMC80/HEP, preparadas em condições

ácidas, apresentaram superfície com depressões e projeções (Fig. 4.4B (d)). Entretanto, o que mais chamou a atenção foi a existência de pequenos poros na superfície das multicamadas de TMC80/HEP, preparados em condições alcalinas (Fig. 4.4C (d)). As diferenças topográficas dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP com 18 bicamadas foram relacionadas com o processo de ionização dos grupos -COO^- e -OSO_3^- existentes na estrutura da HEP (Fig. 4.5). Este fato é reforçado porque a densidade de cargas da TMC80 é quase independente do pH devido ao seu elevado GQ (Fig. 4.5a). Vale a pena ressaltar que em meio alcalino (pH 7,4) a HEP está totalmente ionizada (Fig. 4.5d) [81, 129].

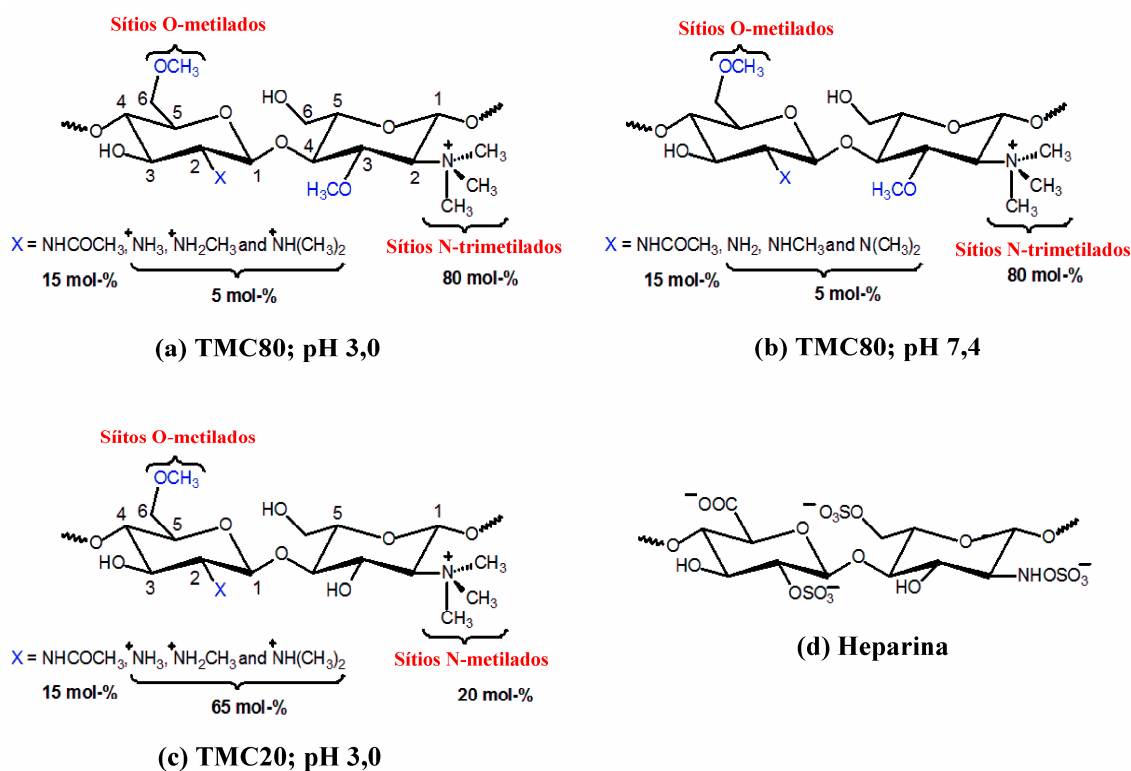


Figura 4.5. Estruturas predominantes da TMC80, TMC20 e HEP.

Ainda assim, a presença desses pequenos poros pode estar relacionada com a baixa massa molar da TMC80 quando comparada a TMC20. Polímeros com alta massa

molar mostram maior adsorção em relação a polímeros com menor massa molar. A adsorção desses materiais poliméricos sobre as superfícies sólidas é originária do ganho entrópico devido ao deslocamento das moléculas de solvente da superfície do substrato para o interior da solução: cada molécula de solvente ganha mobilidade quando deixa a superfície, enquanto a cadeia de polímero ao ser adsorvida perde apenas um pouco de mobilidade, comparado com o solvente. A diferença em ganhar (solvente)-perder (polímero) mobilidade é maior quando a massa molar do polímero é aumentada. Vale a pena ressaltar que o número de moléculas de solvente deixando a superfície é sempre maior do que o número de segmentos de polímeros chegando à superfície durante o processo de adsorção. Na adsorção de polímeros com maior massa molar, a configuração de equilíbrio produzirá uma camada de, aproximadamente, 3-30 nm de espessura [159]. A adsorção é quase monomolecular e o processo é irreversível, pois sempre haverá um segmento do polímero adsorvido na superfície. Para frações com menores valores de massa molar a irreversibilidade não acontece, pois haverá poucos pontos de contato entre o polímero e a superfície [159].

4.3.2.3. Análise por meio de SEM

Os filmes de multicamadas de TMC/HEP foram também caracterizados por SEM (Fig. 4.6(A,B,C)). O objetivo deste estudo foi proceder uma análise confirmatória em relação ao observado por AFM quanto às características morfológicas dos filmes de multicamadas de TMC/HEP. Analisando a Figura 4.6, foi possível observar que a TMC20 apresenta maior compatibilidade com a HEP quando comparada a TMC80. A sobreposição total das regiões oxidadas do filme de PS-mod ocorre após a adsorção alternada de 9 (nove) bicamadas de TMC20/HEP (Fig. 4.6A (a)). O mesmo comportamento foi observado para o sistema de TMC80/HEP, em meio ácido, onde

após a adsorção de 12 (doze) bicamadas foi verificada a completa sobreposição das regiões oxidadas do PS-mod (Fig. 4.6B (b)). No entanto, para as multicamadas de TMC80/HEP preparadas em pH 7,4, a sobreposição completa dos pontos de oxidação dos filmes de PS-mod ocorre somente após 18 (dezoito) bicamadas (Fig. 4.6C (c)) terem sido adsorvidas na superfície do PS oxidado. Isto indica que em condições alcalinas a TMC80 possui menor hidrofilicidade e menor capacidade de associar-se com a HEP.

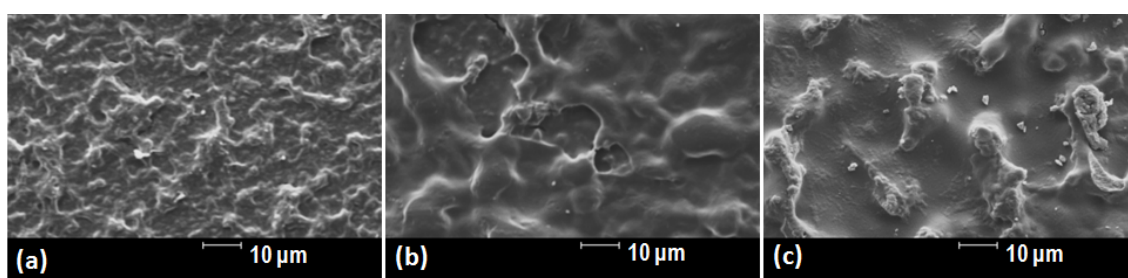


Figura 4.6A. Imagens obtidas por SEM dos filmes de multicamadas de TMC20/HEP preparados em pH 3,0 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas.

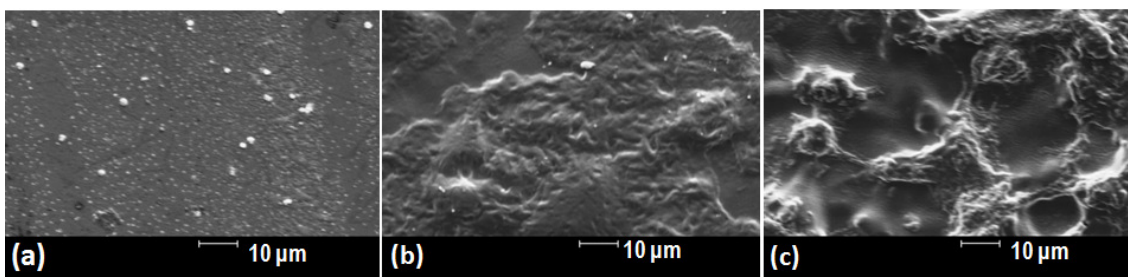


Figura 4.6B. Imagens obtidas por SEM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 3,0 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas.

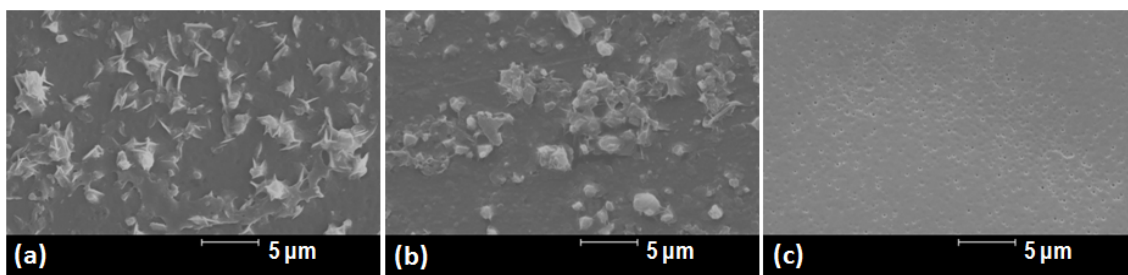


Figura 4.6C. Imagens obtidas por SEM dos filmes de multicamadas de TMC80/HEP preparados em pH 7,4 com: 9 (a), 12 (b) e 18 (c) bicamadas.

A ocorrência de nano poros na superfície das multicamadas de TMC80/HEP foi observada pela análise de SEM e as micrografias são mostradas na Fig. 4.6C (c). Isto está em concordância com os dados fornecidos pela análise de AFM (Fig. 4.4C (d)). O tamanho dos nanoporos foi de c.a 170 nm. Todos os resultados relacionados com a morfologia de superfície, discutidos anteriormente, foram observados por meio de ambas as técnicas, AFM e SEM. Isto confirma a dependência topográfica dos filmes de multicamadas de TMC/HEP com o pH da solução onde se fez as imersões e com o GQ da TMC.

4.3.2.4. Análise de KFM

Na Figura 4.7 (A,B) são apresentadas as imagens de Microscopia de Força de Kelvin (KFM) dos filmes em estudo. A KFM é frequentemente usada para investigar as propriedades elétricas de superfície e para mapear a distribuição de potencial elétrico na superfície de um determinado material [160]. As imagens de topografia e potencial de superfície do PS-mod e dos filmes de multicamadas de TMC/HEP com 18 bicamadas estão apresentadas na Figura 4.7A. A deposição dos polímeros (18 bicamadas de TMC/HEP) sobre a superfície de PS-mod é responsável pela alteração do potencial negativo de superfície (em V) de -4,02 (PS-mod) para -0,015 (TMC20/HEP, pH 3,0); -1,075 (TMC80/HEP, pH 3,0); e -0,030 (TMC80/HEP, pH 7,4), como observado na Figura 4.7A. Deve ser enfatizado que a técnica de KFM leva em conta uma pequena região da superfície e, devido à morfologia heterogênea dos filmes automontados de TMC/HEP, os valores de potencial elétrico podem apresentar discrepâncias em relação a outras regiões do mesmo filme. As diferenças de potencial entre as amostras estão relacionadas à estrutura química dos polímeros (TMC20 e TMC80) e as possíveis interações que existem nas multicamadas de TMC/HEP. O potencial de superfície dos

filmes de multicamadas de TMC80/HEP em pH 3,0 foi o mais negativo, quando comparado ao potencial das superfícies das outras amostras. No entanto, vale ressaltar que a deposição de TMC e HEP sobre a superfície de PS-mod aumenta consideravelmente o potencial elétrico da superfície em relação ao PS oxidado. Por outro lado, esta propriedade não se alterou de forma significativa quando comparada aos diferentes filmes de multicamadas de TMC/HEP obtidos em condições variadas (Fig. 4.7A). Além disso, a topografia das amostras também influenciou o potencial elétrico de superfície dos filmes. Devido ao elevado GQ, a TMC80 possui em sua grande maioria, grupos N-trimetilados (sítios ^+NT) e O-metilados (sítios OM) em sua estrutura sacarídica.

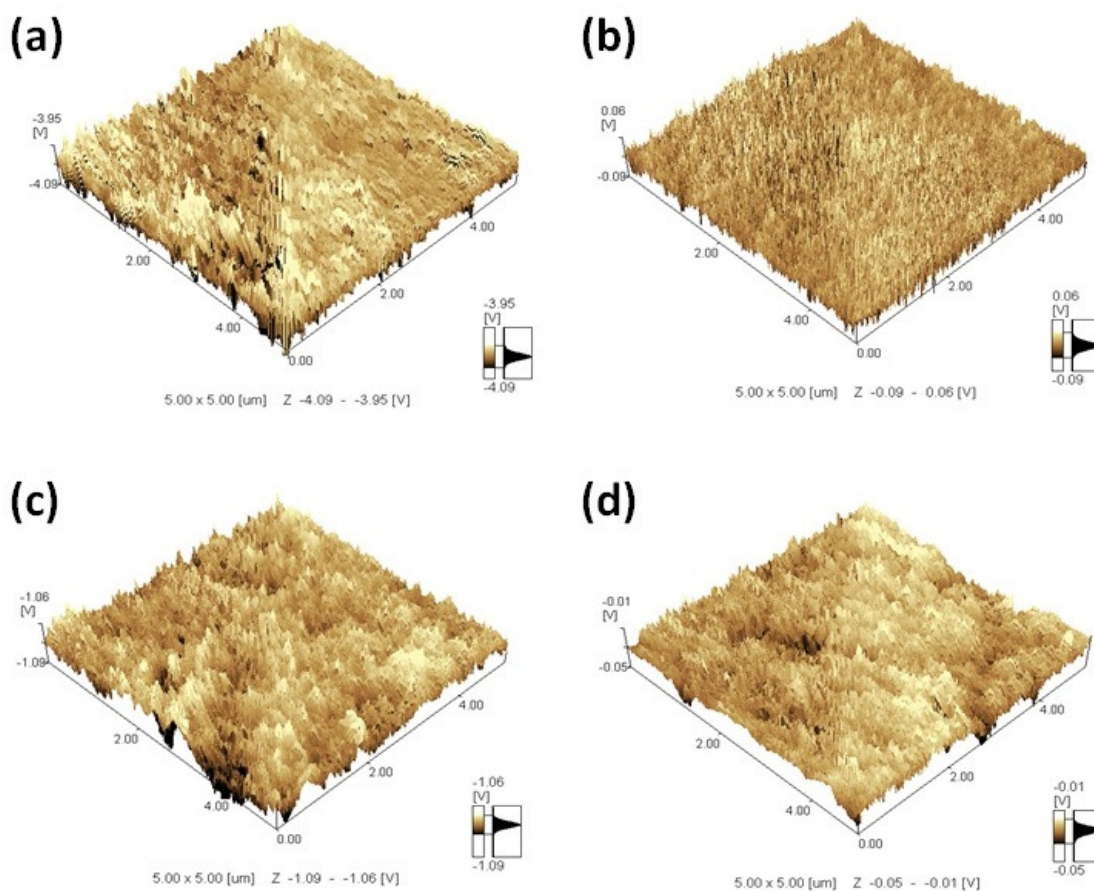


Figura 4.7A. Imagens de KFM do PS-mod (a) e filmes finos de 18 bicamadas de: (b) TMC20/HEP (pH 3,0), (c) TMC80/HEP (pH 3,0) e (d) TMC80/HEP (pH 7,4).

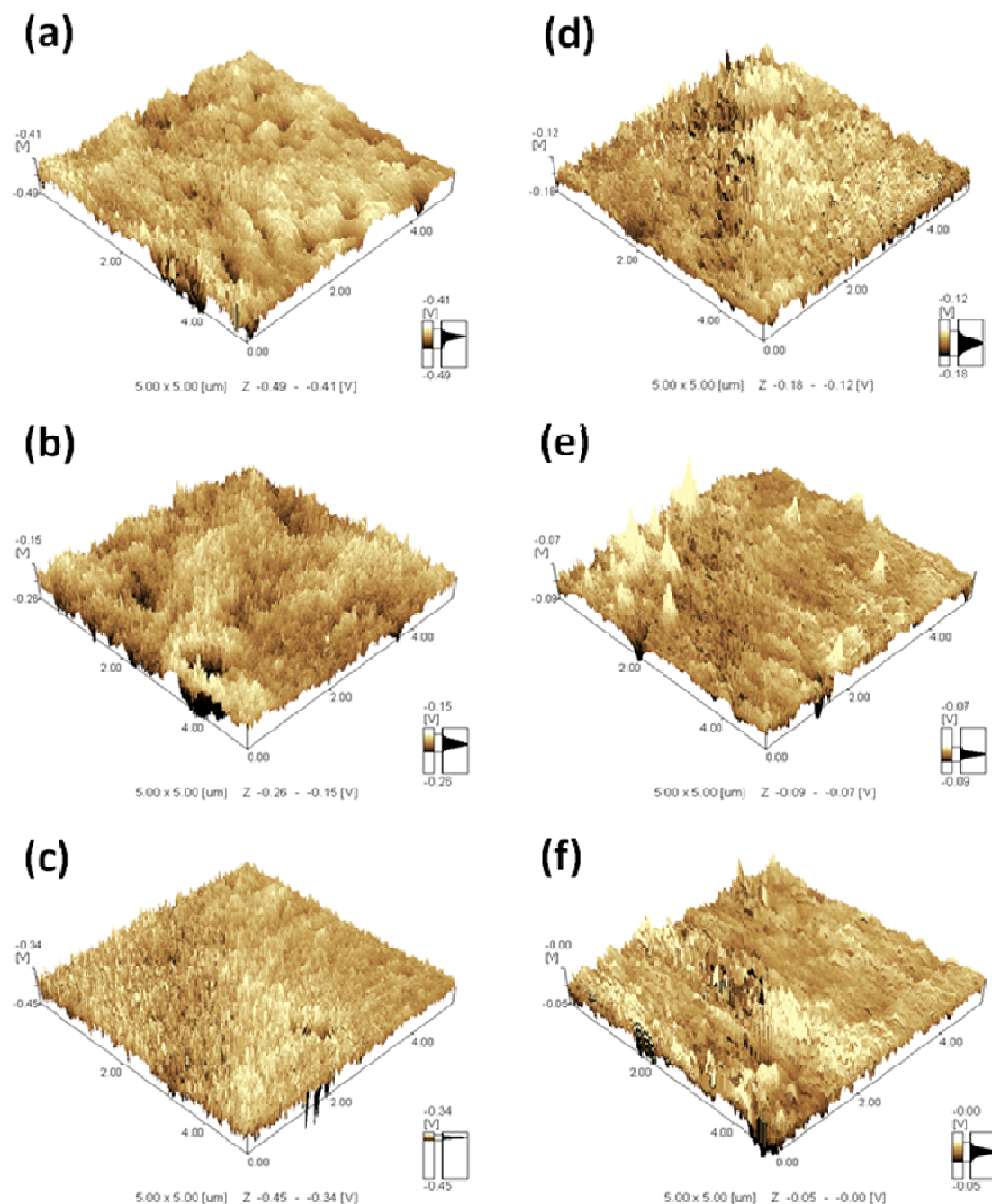


Figura 4.7B. Imagens de KFM dos filmes finos de TMC20/HEP preparados em pH 3,0 com: 3 (a), 9 (b) e 12 (c) bicamadas e dos filmes finos de TMC80/HEP preparados em pH 7,4 com: 3 (d), 9 (e) e 12 (f) bicamadas.

A elevada densidade de sítios OM contribui para o aumento da hidrofobicidade da TMC80 frente a TMC20. Esse fato reduz significativamente a associação da TMC80

com a HEP (biopolímero de elevada hidrofiliçidade). Este fato explica os menores valores de potencial elétrico para a superfície dos filmes de TMC80/HEP. Já a TMC20 apresenta maior maior hidrofiliçidade em relação a TMC80, devido à baixa proporção de sítios OM em sua estrutura. Vale ainda ressaltar que a TMC20 apresenta maior densidade de cargas $^+NH_3$, em meio ácido, quando comparada a TMC80. Sítios $^+NH_3$ com densidade de cargas positivas apresentam maior disponibilidade para complexar com a HEP quando comparados aos sítios ^+NT . Fato este que explica o valor de potencial elétrico mais positivo para o sistema de TMC20/HEP (Fig. 4.7A(b)) em relação aos sistemas de TMC80/HEP (4.7A(c,d)). As multicamadas de TMC/HEP (com 18 bicamadas) apresentaram topografia menos rugosa quando relacionadas às outras amostras. Assim, aumentando o número de bicamadas o potencial elétrico na superfície dos filmes também aumenta pois, como observado, há maior homogeneidade das superfícies de TMC/HEP com maior número de bicamadas. Em geral, os potenciais elétricos de superfície observados para as amostras com 3, 9 e 12 bicamadas (Fig. 4.7B) foram mais negativos quando comparados aos respectivos potenciais elétricos encontrados para a superfície dos filmes de multicamadas de TMC/HEP com 18 bicamadas (Fig. 4.7A).

4.3.3. Adesão inicial da *E.coli* sobre superfícies de PS-mod e filmes de multicamadas de TMC/Heparina

A adesão microbiana em diferentes substratos é influenciada pelas propriedades químicas e físico-químicas do substrato, incluindo o grau de hidrofobicidade que é um dos fatores mais importantes. A *E. coli* (bactéria Gram-negativa) possui uma fina camada de glicoproteína coberta por uma espessa camada formada principalmente por lipoproteínas e lipídios [74, 161]. Assim, o caráter hidrofóbico na superfície deve

favorecer a interação da *E. coli* com as bicamadas lipídicas. A Figura 4.8 mostra as imagens de SEM da superfície do PS-mod (usado como controle) e dos filmes de multicamadas de TMC/HEP (18 bicamadas), após serem submetidos ao contato com a *E. coli*. A presença da *E. coli* foi apenas detectada no grupo do controle. Este fato pode ser explicado pela baixa hidrofiliicidade da superfície de PS-mod quando comparado às superfícies das multicamadas de TMC/HEP. O ângulo de contato diminuiu significativamente após a deposição das bicamadas de TMC/HEP sobre a superfície do PS-mod. Assim, as multicamadas de TMC/HEP apresentaram maior hidrofiliicidade quando comparadas a superfície de PS-mod.

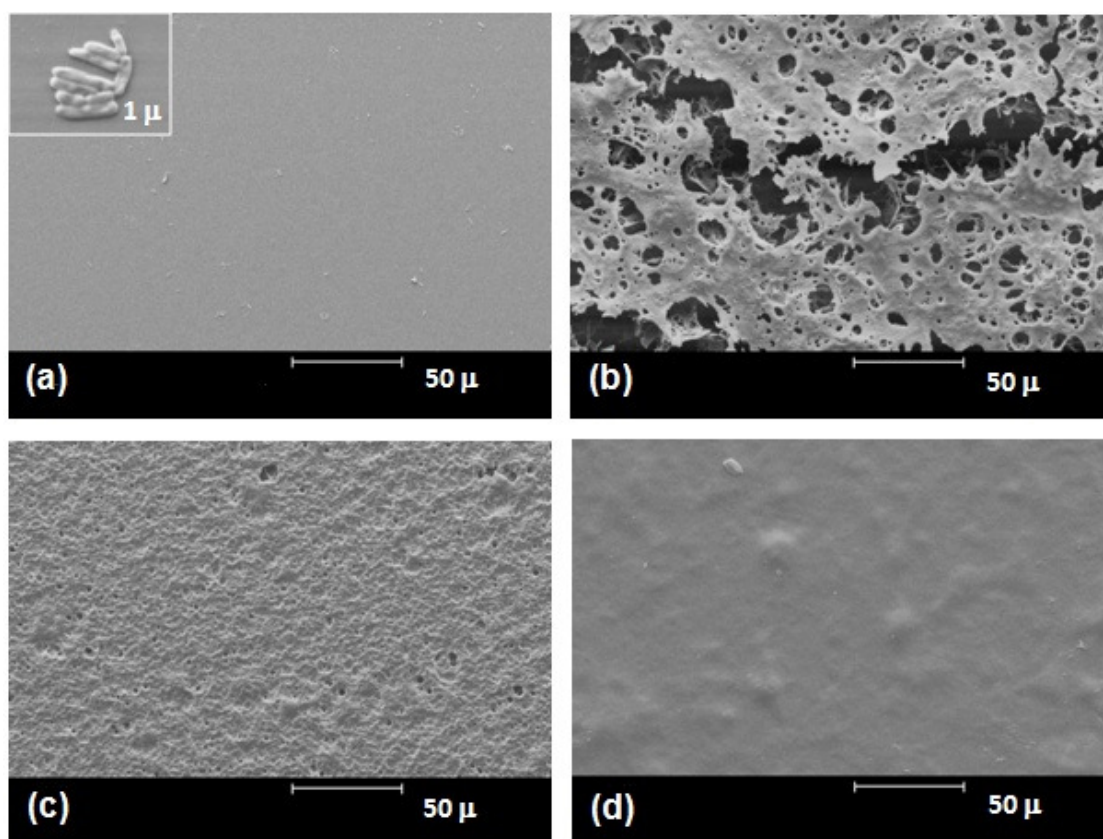


Figura 4.8. Micrografia eletrônica de varredura do (a) PS-mod, (b) filmes de multicamadas de (TMC20/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (c) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (d) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 7,4) após a exposição de 5×10^7 células·mL⁻¹ de *E. coli* por 4h.

Portanto, as excelentes propriedades antiadesivas apresentadas pelos filmes de multicamadas de TMC/HEP foram atribuídas ao aumento da molhabilidade de superfície desses filmes. Vale a pena mencionar que a última camada dos filmes de TMC/HEP é constituída de HEP (biopolímero hidrofílico e antiadesivo). Os resultados sugerem que filmes finos de TMC/HEP usando TMC com diferentes GQ e pH de imersão são ótimos candidatos para revestimentos de superfícies para fins bactericidas. A observação por microscopia de contraste de interferência de Normaski (Fig. 4.9) mostra os mesmos resultados observados nas análises de SEM (Fig. 4.8), sendo a mesma realizada para ratificar os resultados obtidos por SEM.

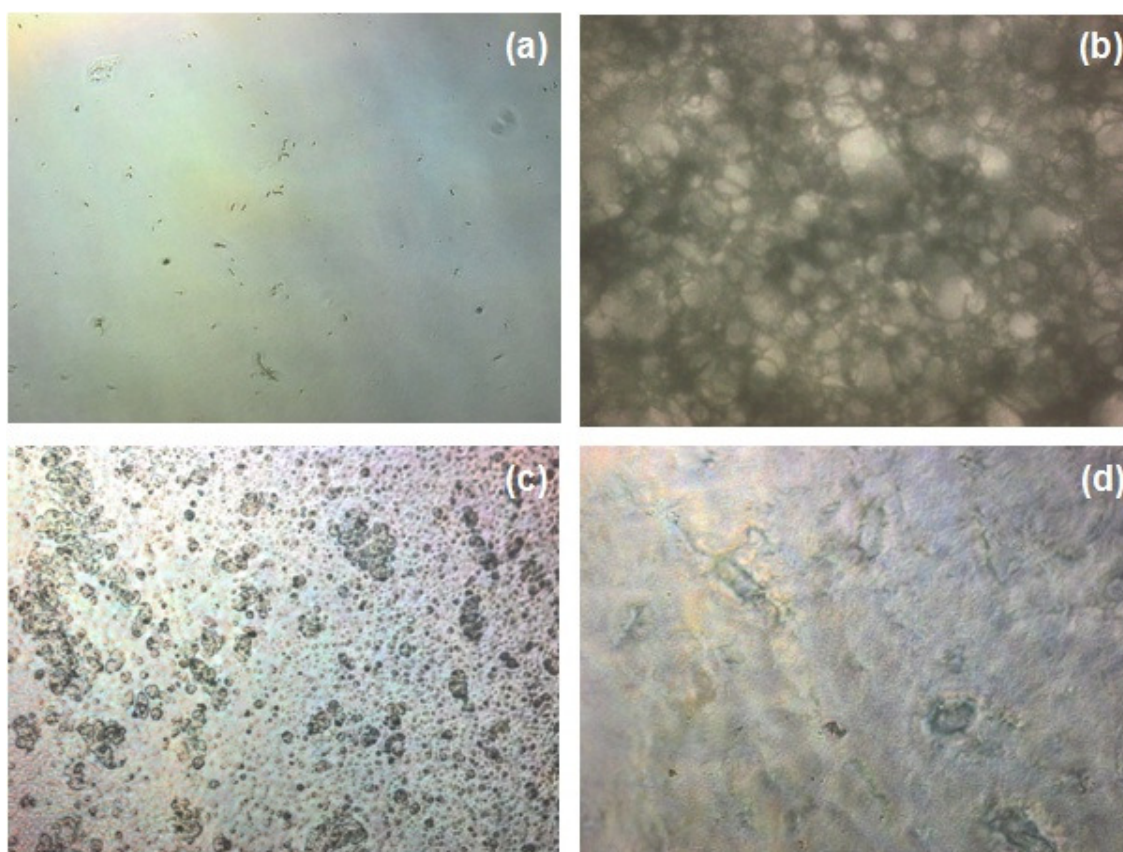


Figura 4.9. Microscopia de contraste de interferência de Normaski (400x) do: (a) PS-mod, (b) filmes de multicamadas de (TMC20/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (c) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 3,0), (d) filmes de multicamadas de (TMC80/HEP)₁₈ (pH = 7,4) após a exposição de 5×10^7 células·mL⁻¹ de *E. coli* por 4h.

4.3.4. Teste antibacteriano *in vitro*

Na Figura 4.10 podem ser comparadas as atividades antibacterianas dos diferentes sistemas de multicamadas de TMC/HEP, preparados sobre os substratos de PS oxidado, com a atividade antibacteriana do filme de PS-mod, usado como controle. Verifica-se que o filme de TMC80/HEP preparado em meio ácido (pH 3,0) não apresentou influência significativa sobre a atividade antibacteriana quando comparado ao controle. Por outro lado, a TMC20/HEP (preparada em pH 3,0) e a TMC80/HEP (preparada em pH 7,4) apresentaram um efeito bactericida de inibição de c.a $32,7 \pm 4,4$ e $64,6 \pm 0,31\%$, respectivamente.

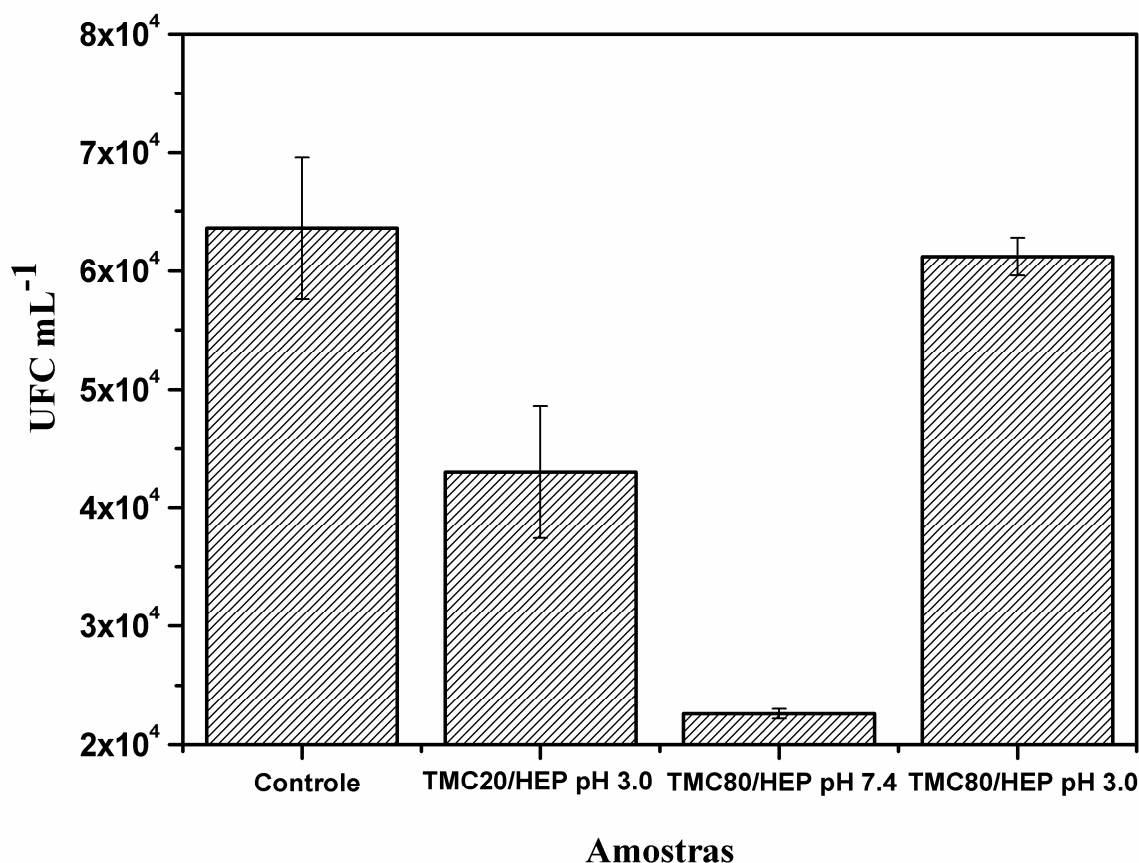
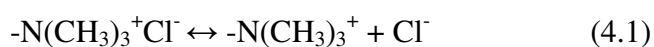


Figura 4.10. Alteração da viabilidade das células *E.coli* com tempo de exposição (6 h) para os filmes de TMC20/HP (pH 3,0), TMC80/HEP (pH 7,4) e TMC80/HEP (pH 3,0), terminados em heparina.

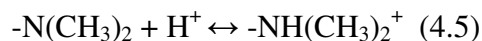
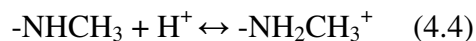
Comparando os filmes de TMC20/HEP e TMC80/HEP, ambos preparados em pH 3,0, foi observado um efeito bactericida mais efetivo para os filmes de TMC20/HEP, devido as diferenças estruturais da TMC, como anteriormente discutido e ilustrado na Figura 4.5. Martins, A. F. [162] relatou que a atividade antimicrobiana dos complexos de TMC/alginato é fortemente afetada pelo pH de formação do biomaterial. Assim, as diferenças entre as atividades bactericidas dos sistemas mostrados na Figura 4.10 podem ser explicadas ao se considerar o pH de preparação dos filmes.

Comparadas com as cadeias de TMC20, as cadeias de TMC80 são mais flexíveis e possuem maior facilidade de interagir com o envelope celular da *E.coli*, fato este relacionado com o elevado GQ da TMC80. Portanto, de acordo com os dados da Figura 4.10, o sistema de TMC80/HEP obtido em pH 7,4 apresentou um efeito bactericida mais efetivo do que o sistema de TMC20/HEP, devido ao fato do GQ da TMC20 ser menor que o da TMC80. No entanto, a atividade bactericida é fortemente dependente do pH de formação dos sistemas automontados de TMC/HEP. A TMC80 tem elevado GQ e comporta-se como um sal de ácido forte, devido aos grupos $-N(CH_3)_3^+Cl^-$ da TMC80 que podem se dissociar como ilustrado nas seguintes equações [87]:



Por outro lado, devido ao baixo GQ, o processo de dissociação da TMC20 depende principalmente dos grupos $-NH_2$, $-NHCH_3$ e $-N(CH_3)_2$ e podem ser ionizados como segue-se [144]:





O baixo valor de pH utilizado para a formação dos filmes finos pode beneficiar a protonação dos grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, mas reprimir a dissociação das espécies $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ [87, 144]. De acordo com Xu et al. [87], os grupos $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ podem não interagir com os sítios de carga negativa do envelope celular e a TMC com $\text{GQ} = 95\%$ pode apresentar forte atividade bactericida em pH 7,2. Assim, os filmes finos de TMC80/HEP preparados em pH 3,0 apresentaram baixa atividade antibacteriana, pois os sítios de $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ não estão inicialmente dissociados. Portanto, em pH 3,0 as cadeias de TMC80 não são flexíveis o suficiente para interagir com o envelope celular. Por outro lado, o sistema de TMC80/HEP obtido em pH 7,4 mostrou alta ação bactericida, pois nesta condição de pH os grupos $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ são facilmente dissociáveis, fornecendo mobilidade suficiente para as cadeias de TMC80. Este fato permite a interação com o envelope celular da bactéria e aumenta a inibição bactericida para $64,6 \pm 0,31\%$ (Figura 4.10). Assim, a inibição de $32,7 \pm 4,4\%$ observada para o sistema de TMC20/HEP é principalmente devido ao processo de ionização dos grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, tal como representados nas equações 4.3-4.5. Em geral, as interações entre as cargas positivas dos grupos $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2\text{CH}_3^+$, $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ e as cargas negativas da membrana celular microbiana (*E. coli*) leva a perda de constituintes protéicos e de outros intracelulares [162].

Os testes bactericidas foram conduzidos em pH fisiológico (7,4), portanto, o pH de formação dos filmes foi o fator responsável pelos resultados mostrados na Figura 4.10. Além dos fatores já mencionados, outros também podem ter influenciado os resultados obtidos, tais como a quitosana bruta (fonte, massa molar e o grau de

desacetilação) usada na síntese da TMC, a metodologia usada para a síntese da TMC (proporção dos sítios N-monometilados, N-dimetilados, N-trimetilados e a troca iônica da TMC), e as condições de ensaio tais como temperatura de cultura e força iônica [87, 162]. Além disso, os diferentes efeitos bactericidas apresentados na Figura 4.10 estão associados com o potencial elétrico da superfície dos filmes, relatados na seção de análise de KFM (item 4.3.2.4). Os filmes que apresentaram um maior aumento no potencial elétrico de superfície (TMC80/HEP, pH 7,4 e TMC20/HEP, pH 3,0) em relação ao potencial elétrico da superfície de PS-mod foram mais bactericidas. De acordo com Sadeghi et al. [163] as moléculas de QT com potencial de superfície menos positivo mostraram menor inibição bacteriana; reciprocamente, a C2-C6-trimetil-6-amino-6-desoxi quitosana, com maior Potencial Zeta (PZ), apresentou maior atividade antibacteriana. Os materiais com elevado PZ tem, provavelmente, maior habilidade para se ligar aos peptidoglicanos negativos presentes na parede celular bacteriana e podem induzir alterações morfológicas graves no envelope bacteriano [163]. Os testes bactericidas também foram realizados para o sistema de TMC/HEP na qual a última camada do filme formado é constituída de TMC20 ou TMC80 (Fig. 4.11). Foi verificado que existe um pequeno aumento na ação bactericida desses filmes (c.a 4,6% para o filme de TMC80/HEP em pH 7,4) quando comparados aos filmes contendo HEP como última camada (Fig. 4.10).

Fu et al. [74] obtiveram filmes de multicamadas de quitosana/heparina (QT/HEP) em diferentes condições de pH (2,9; 3,8 e 6,0) e estudaram a atividade antibacteriana desses filmes frente a *E. coli* em pH 7,4. O pH de automontagem dos filmes finos de QT/HEP tem um efeito notável sobre as propriedades antibacterianas das multicamadas. O ensaio antibacteriano *in vitro* indicou que as multicamadas de QT/HEP poderiam efetivamente matar as bactérias. No entanto, as amostras

automontadas em pH 2,9; 3,8 e 6,0 apresentaram inibições bactericidas de 58, 68 e 46%, respectivamente. Por conseguinte, os filmes de QT/HEP foram mais bactericidas quando estes foram montadas em meio ácido ($\text{pH} < 4$). Por outro lado, as multicamadas de TMC80/HEP preparadas neste trabalho em pH 7,4 mostraram $64,6 \pm 0,31\%$ de inibição bactericida em pH fisiológico (7,4). Este resultado confirma que o sistema de TMC80/HEP, montado em pH 7,4, tem potencial para ser utilizado como recobrimento de dispositivos cardiovasculares devido a excelente atividade bactericida deste sistema.

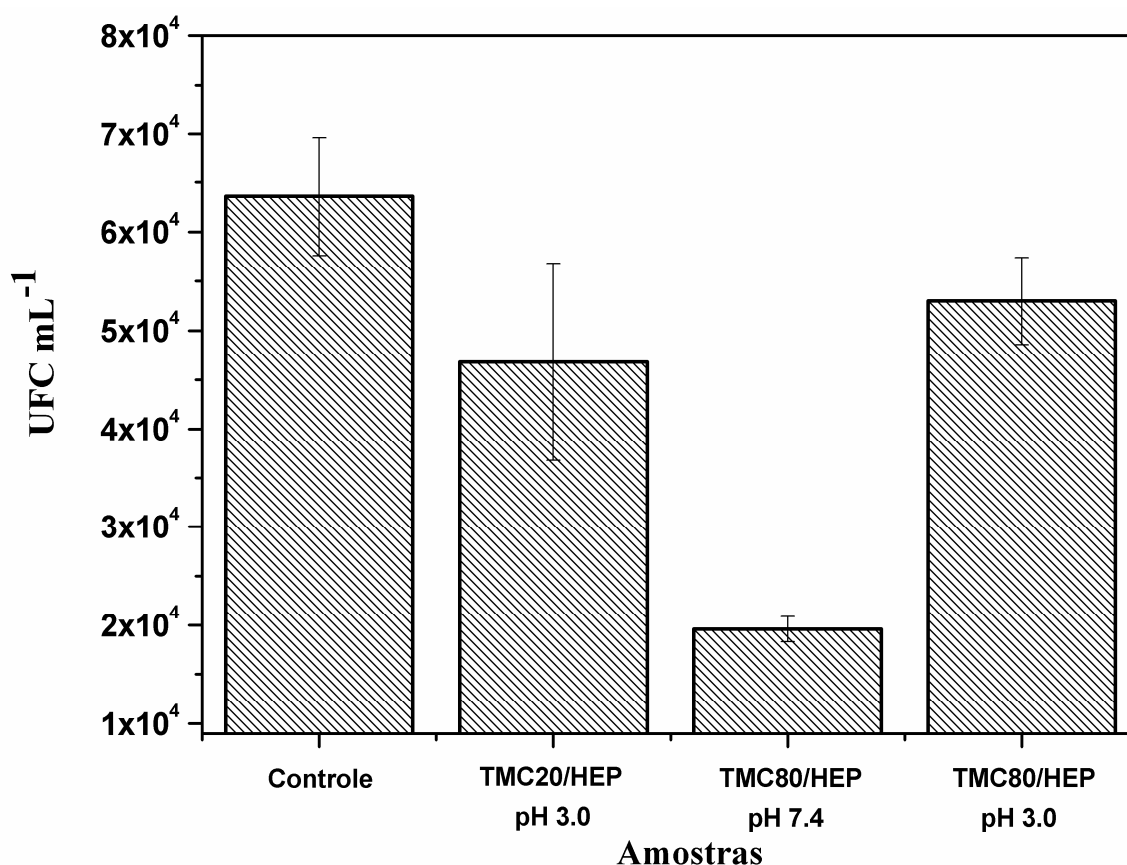


Figura 4.11. Alteração da viabilidade das células *E.coli* com tempo de exposição (6 h) para os filmes de TMC20/HP (pH 3,0), TMC80/HEP (pH 7.4) e TMC80/HEP (pH 3,0), terminados em TMC.

4.3.5. Liberação *in vitro* da heparina

A curva de liberação da HEP para as multicamadas de TMC/HEP (18 bicamadas) em SIF é apresentada na Figura 4.12a. Considerando as multicamadas de TMC20/HEP e as multicamadas de TMC80/HEP preparadas em pH 3,0, foi verificado que a concentração máxima de HEP liberada em SIF foi de aproximadamente 30 e 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, e, em ambos os casos, ocorreu após 1 h de imersão (Fig. 4.12a). Estes resultados mostram que os filmes de TMC20/HEP e TMC80/HEP (automontados em pH 3,0) apresentaram grande potencial para serem usados como dispositivos para a liberação sustentada de HEP em meio neutro, quase a mesma condição encontrada na região intestinal. Por outro lado, as amostras de TMC80/HEP preparadas em pH 7,4 não liberam HEP em SIF (Fig. 4.12a). O perfil de liberação da HEP em SGF é apresentado na Figura 4.12b. Os filmes finos apresentaram estabilidade em SGF, e a extensão da liberação da HEP não foi tão elevada quanto a observada em SIF (Fig. 4.12b).

A liberação da HEP é fortemente pronunciada em meio SIF devido a ionização dos grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Nas condições em que as multicamadas de TMC20/HEP e TMC80/HEP foram obtidas (pH 3,0), estes sítios estavam inicialmente carregados positivamente e efetivamente interagindo com as moléculas de HEP. Em SIF (pH 6,8), os sítios ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2\text{CH}_3^+$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_2^+$) tornaram-se desprotonados e parte da HEP que estava complexada com as moléculas de TMC foram liberadas para o meio. A TMC20 tem maior teor de grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ em sua estrutura quando comparada com a TMC80, de modo que a concentração de HEP liberada das multicamadas de TMC20/HEP foi superior a TMC80/HEP (Fig. 4.12a).

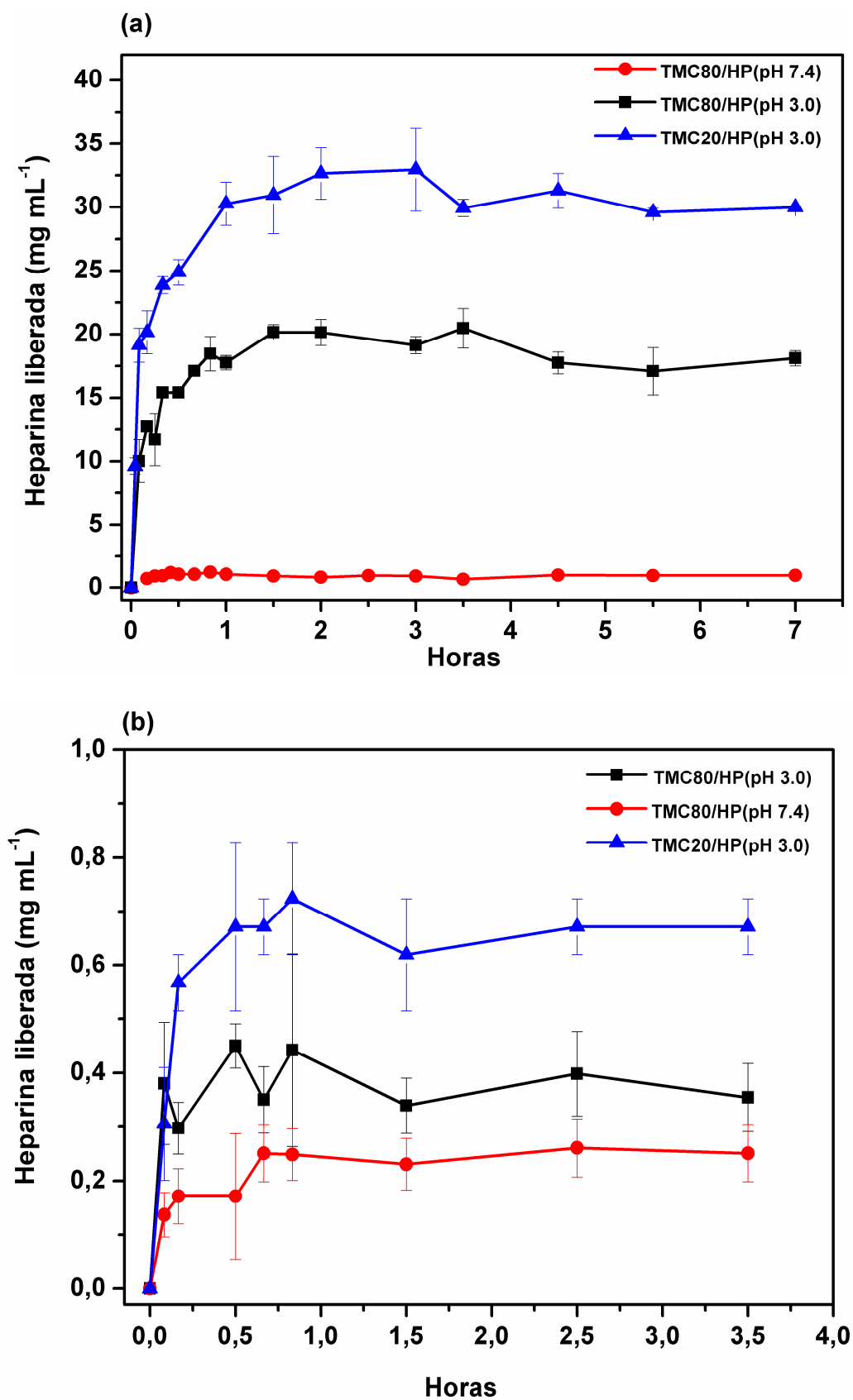


Figura 4.12. Curva de liberação da HEP dos filmes de TMC/HEP em SIF (a) e em SGF (b).

Por outro lado, as multicamadas de TMC80/HEP obtidas em pH 7,4 são extremamente estáveis. Nesta condição de pH (7,4) a complexação da TMC/HEP ocorre exclusivamente através dos sítios ionizados da TMC ($-N(CH_3)_3^+$). Na TMC80/HEP obtida em pH 7,4 a complexação é permanente e reprime a liberação da HEP (Fig. 4.12). Quando o teste de liberação da HEP foi avaliado em SGF (pH 1,2), os sítios $-NH_2$, $-NHCH_3$ e $-N(CH_3)_2$ da TMC são protonados e interagem fortemente com a HEP por meio de interações eletrostáticas. Este fato reduz substancialmente a quantidade de HEP liberada em SGF (Fig. 4.12b). Uma maior hidrofobicidade da TMC80 quando comparada a TMC20 pode minimizar a propagação da HEP em toda a superfície da TMC80. No entanto, a HEP interage fortemente com a TMC80, mesmo em alguns poucos pontos da superfície. Assim, devido a isto, uma menor quantidade de HEP é liberada em relação ao sistema de TMC20/HEP. A quantidade de HEP liberada em SIF atinge o equilíbrio após aproximadamente 1 h, e os ensaios de antiadesividade e bactericida foram investigados em pH 7,4 durante 4h. Este fato, associado com a complexação menos efetiva entre as cadeias de HEP e TMC, em pH 7,4, em comparação com os sistemas de TMC20/HEP deve também estar relacionado aos efeitos antiadesivo e bactericida observados neste trabalho para o sistema TMC/HEP.

4.4. Conclusões

Foi possível obter multicamadas de TMC/HEP por meio da técnica LbL, em diferentes pH (3,0 e 7,4), com base nas cargas positivas ao longo das cadeias de TMC e cargas negativas nas cadeias de HEP. A adsorção alternada de TMC e HEP formando multicamadas na superfície de PS-mod foi confirmada por meio de FTIR-ATR, AFM, SEM e KFM. A diminuição da rugosidade e minimização das depressões sobre a superfície das multicamadas bem como o aumento no número das bicamadas de

TMC/HEP foram observados pelas imagens de AFM e SEM. As multicamadas de TMC/HEP reduziram a adesão bactericida e o sistema de TMC80/HEP automontado em pH 7,4 mostrou efetiva atividade bactericida, o que torna o sistema de TMC/HEP adequado para o uso como revestimentos para fins anti-infecciosos.

Capítulo 5

Obtenção e caracterização de filmes finos de derivados da Quitosana livres de O-metilação: aplicações em estudos celulares.

Resumo

Filmes finos de Heparina (HEP) com quitosana (QT), N,N-dimetilquitosana (DMC) e N,N,N-trimetilquitosana (TMC) foram obtidos a partir de diferentes métodos de deposição *Layer-by-Layer* (LbL): imersão, *spray* e *spin-coating*; e caracterizados pelas técnicas de elipsometria, ângulo de contato e AFM. Todas as técnicas utilizadas na caracterização confirmaram a adsorção dos diferentes polieletrólitos na superfície do silício (pré-tratado). Os filmes obtidos foram submetidos a ensaios celulares, utilizando fibroblastos 3T3. Microscopia óptica e teste de MTT foram utilizados para investigar a adesão e proliferação celular dos fibroblastos sobre a superfície dos filmes formados. Os resultados demonstraram um fraco contato celular na superfície das multicamadas dos filmes com QT e um maior contato celular entre os fibroblastos e a superfície dos filmes contendo TMC. Fibroblastos 3T3 espalharam-se aleatoriamente com morfologia de fuso sobre a superfície da QT e de seus derivados. O comportamento celular observado está relacionado com as interações entre os fibroblastos e a superfície dos filmes. A N,N,N-trimetilquitosana (TMC) provou ter biocompatibilidade e boa capacidade de proliferação celular.

Palavras chave: deposição *Layer-by-Layer*, fibroblastos NIH/3T3, derivados da quitosana, heparina.

Abstract

Thin films of Heparin (HEP) with chitosan (CHI), N,N-dimethyl chitosan (DMC) and N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) were obtained through Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique from different deposition methods: immersion, *spray* and *spin-coating*; and characterized by ellipsometry, contact angle and AFM techniques. All used techniques confirmed the adsorption of different polyelectrolytes on pretreated silicon surface. The films were submitted to cellular assays using 3T3 fibroblasts. Optical microscopy and MTT assay were used to investigate the fibroblasts adhesion and proliferation on surface of the formed films. The results showed weak cell contact at the surface of the multilayer films as QT was used as polycation, but the cell contact between fibroblasts and surface increased in the films containing TMC. 3T3 fibroblasts were randomly scattered with spindle morphology on the QT/HEP and QT derivatives/HEP surfaces. The cell behavior observed was associated to the interactions between fibroblasts and the films surface. N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) proved to have biocompatibility and good capacity for cell proliferation.

Keywords: Layer-by-Layer deposition, NIH/3T3 fibroblasts, chitosan derivatives, heparin.

5.1. Introdução

A quitosana (QT) é um derivado parcialmente desacetilado da quitina, composto por unidades β -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose e pequenas quantidades de N-acetil-D-glucosamina. A QT tem sido extensivamente utilizada na engenharia de tecidos devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade e baixa toxicidade [50, 51, 164]. Este polissacarídeo pode influenciar na adesão e proliferação celular de osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos e, como um polissacarídeo bioativo, pode compartilhar algumas características com vários glicosaminoglicanos (GAGs), que tem interações específicas com fatores de crescimento, receptores e adesão de proteínas [165]. Pelo fato da QT apresentar em sua estrutura grupos amino e hidroxila facilmente suscetíveis a reações químicas, a mesma tem sido utilizada para a obtenção de derivados a partir de modificações químicas que apresentem propriedades químicas e físicas adaptáveis e superiores as da QT e que possam ser utilizados como biomateriais.

A N,N,N-trimetilquitosana (TMC), um derivado parcialmente quaternizado da QT, foi primeiramente sintetizado com o intuito de aumentar a solubilidade da QT em meios neutro e básico, onde é desejada a entrega controlada de fármacos. O aumento da solubilidade é conseguido por substituição dos grupos amino primários, na posição C-2 da QT, por grupos amino quaternários. Alguns trabalhos reportam que a TMC pode diminuir a resistência elétrica transepitelial (TEER) das monocamadas de células Caco-2 e aumentar o transporte de diversos compostos hidrofílicos, fármacos peptídeos e proteínas, recebendo considerável atenção no campo da liberação, não somente na rota por via oral, mas também na ocular, intranasal, bucal, pulmonar e via retal [103]. Tem sido demonstrado que a TMC é potente intensificador de absorção intestinal para fármacos peptídicos, mesmo em ambientes neutros [95]. A densidade de carga deste

polímero, determinada pelo grau de quaternização (GQ), tem um importante efeito na melhoria das propriedades que propiciem a adsorção deste polímero [95]. Outros autores relatam o uso da TMC na formação de complexos com DNA, para liberação de genes [166]. Nanopartículas automontadas preparadas à base de TMC e ácido gama-poli-glutâmico foram obtidas para a liberação oral da insulina. Foi observada estabilidade superior das nanopartículas em uma maior faixa de pH e um perfil de liberação sustentada de insulina com aumento da permeação [167]. A presença de grupos quaternários na TMC tem demonstrado possuir atividade antimicrobiana maior do que o seu precursor [166]. Mao et al. [101, 168] encontraram que a TMC com GQ de 40% exibiu respostas citotóxicas dependentes do tempo e da dosagem, observados por meio do ensaio de MTT, para os fibroblastos L929 e HEK293. Mediante o relato pode-se verificar a diversidade de estudos e aplicações usando a TMC, principalmente no que diz respeito à liberação controlada de fármacos e o seu uso como reparador tecidual. A presença de grupos N-dimetilados e N-trimetilados na molécula de TMC e a sua biocompatibilidade motivou a investigação de suas propriedades biológicas com o principal objetivo de desenvolver novas aplicações biomédicas. Neste estudo foram comparados os comportamentos celular dos fibroblastos NIH/3T3, tais como adesão celular e morfologia, nas superfícies dos filmes finos de PEI (Heparina/Polication)₅ terminados em QT, DMC e TMC.

Os objetivos específicos buscados neste Capítulo 5 da Tese foram:

- Obter filmes finos de DMC/HEP e TMC/HEP, por meio de diferentes técnicas de deposição e comparar suas propriedades com filmes finos de QT/HEP;

- Caracterizar os filmes formados utilizando técnicas de elipsometria, ângulo de contato, microscopia de força atômica (AFM) e microbalança de cristal de quartzo (QCM-D);
- Avaliar a citotoxicidade dos materiais obtidos;
- Realizar ensaios celulares e avaliar a viabilidade celular dos filmes formados frente aos fibroblastos NIH/3T3.

5.2. Parte Experimental

5.2.1. Materiais

Quitosana (Golden-Shell Biochemical, China) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a $8,7 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; N,N-dimetilquitosana (GQ = 86%) e N,N,N-trimetilquitosana (GD = 25%). Meio de cultura de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), solução de estreptomicina-penicilina, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) e Heparina sódica foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Lâminas de silício foram obtidas da WaferNet Inc. (São Jose, EUA). Outros reagentes, tais como etanol, acetona, isopropanol, hidróxido de sódio, ácido acético e clorídrico foram utilizados como adquiridos, sem prévia purificação.

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Medidas de Potencial Zeta

O Potencial Zeta das soluções dos polieletrólitos foi medido utilizando o equipamento Malvern Zetasizer 3000 HS. Para essas análises, soluções dos polieletrólitos foram preparadas nas mesmas concentrações que as utilizadas para a construção dos filmes finos de multicamadas. As soluções foram colocadas em cubetas

de poliestireno apropriadas e lidas no equipamento. Um laser foi usado como fonte de luz, iluminando as partículas dentro da amostra, incidindo na célula e sendo espalhados pelas partículas, no ângulo de 17° . Quando um campo elétrico foi aplicado através da amostra, as partículas afetaram a quantidade de luz espalhada, e esse espalhamento foi detectado e convertido em um valor numérico [42].

5.2.2.2. Preparação dos filmes finos tipo LbL

Os substratos utilizados para a deposição das multicamadas foram lâminas de silício (orientação $\langle 100 \rangle$ e espessura 700-775 micra, fornecida pela WaferNet Inc., São Jose, EUA). Primeiramente esses substratos foram lavados com etanol para remover as impurezas presentes na superfície e, então, lavados exaustivamente com água Milli-Q e secos com jatos de ar comprimido. Em seguida, foram submetidos a um tratamento com plasma (Harrick Plasma, Ithaca NY), durante 3 min, em potência média. O tratamento com plasma é realizado para ativar a superfície do substrato e deixá-la homogeneamente com cargas negativas. Para a preparação das multicamadas foram utilizados três métodos de deposição: imersão, *spray* e *spin-coating*. Para os três métodos a concentração das soluções dos polieletrólitos utilizadas foi mantida constante ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a força iônica do meio foi variada, sendo os polieletrólitos solubilizados em quatro diferentes soluções: solução tampão (0,14M NaCl; 0,082M HAc; 0,018M NaAc); 0,0 M NaCl, 0,15 M NaCl e 0,5 M NaCl. Nessas três últimas soluções foi adicionada solução de HAc (2% v/v), exceto para o polieletrólito de HEP.

Para o método de imersão o substrato ativado foi primeiramente mergulhado em uma solução aquosa de poli(etileno imina) (PEI, $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 15 minutos e, em seguida, imerso em água Milli-Q durante 3 minutos. O processo de lavagem com água Milli-Q foi realizado em triplicata e em frascos distintos. Logo após, o substrato foi

seco com jato de ar comprimido. A primeira camada de PEI é utilizada para deixar a superfície do substrato mais homogênea. Em seguida, o substrato obtido, carregado positivamente, foi imerso na solução do poliânion (heparina) por 15 minutos e lavado três vezes com água Milli-Q, antes de ser seco com ar comprimido. Na sequência, foi realizada a deposição do polycation (QT, DMC ou TMC), de maneira idêntica. Essa série de deposições foi cuidadosamente reproduzida até que fosse alcançado o número desejado de pares de camadas. Ao final do processo foram obtidos filmes finos de PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅.

Para o método de *spray*, soluções dos polieletrólitos foram preparadas e colocadas em garrafas comerciais de *spray* AirBoy (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha). O substrato limpo foi colocado verticalmente em um anteparo e uma solução de PEI foi, primeiramente, borrifada sobre o substrato durante 10 s. O substrato foi então lavado com água Milli-Q por mais 10 s e seco com jato de ar comprimido. O tempo de espera entre as etapas de deposição do polieletrólito e lavagem foi de 10 s. A sequência de deposição (*spraying*) dos polieletrólitos foi idêntica ao método de imersão: (poliânion, lavagem e secagem) seguido de (polycation, lavagem e secagem). Essa sequência de ciclos foi cuidadosamente repetida até obter o número de pares de camadas desejadas: PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅.

Por fim, para a deposição das camadas utilizando o método de *spin-coating*, o substrato limpo foi colocado sobre o anteparo do equipamento *spin-coater* (modelo WS-650-15 da Laurell Technologies Corporation, EUA) e submetido à rotação de 3.000 rpm. As soluções de polieletrólitos e lavagem (água Milli-Q) foram colocadas no substrato parado, sendo utilizada uma quantidade específica de 300 µl para cada etapa. A metodologia (tempo de vaporização, adsorção e ordem da deposição dos polieletrólitos durante o procedimento) foi a mesma descrita para o método de *spray*. A

primeira camada depositada foi PEI, seguida da lavagem do substrato e secagem com jato de ar comprimido. Os tempos de vaporização das soluções de polieletrólito foram de 10 s, seguido de espera 10 s e lavagem 10 s. Esse ciclo foi repetido até se obter o número de camadas desejadas. No final, foram obtidos filmes de PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅. A Fig. 5.1 mostra a representação esquemática dos filmes de multicamadas formados para os diferentes sistemas, independentemente do método de deposição.

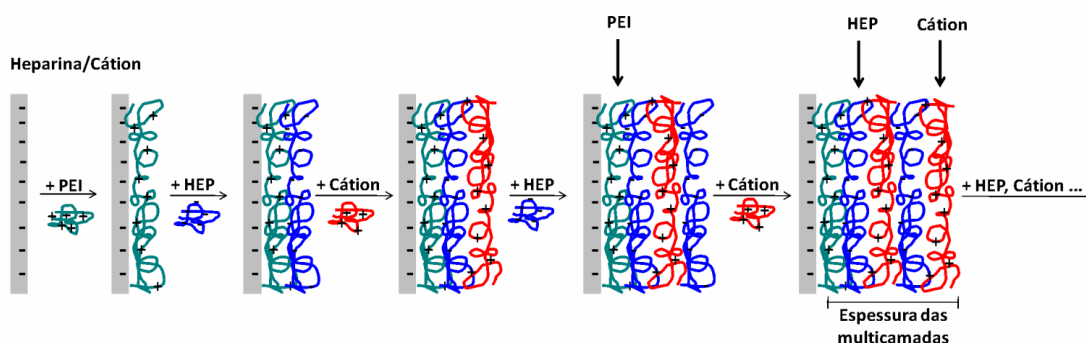


Figura 5.1. Representação esquemática dos filmes de multicamadas.

5.2.3. Análise da superfície

5.2.3.1. Elipsometria

As espessuras dos filmes finos foram medidas utilizando-se um elipsômetro modelo PLASMOS SD 2300 (Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 400$ nm) e ângulo de incidência ajustado em 70° . O índice de refração dos filmes foi assumido como sendo constante ($\eta = 1,465$), considerando estes filmes uniformes e isotrópicos. As medidas elipsométricas foram feitas em dez campos diferentes na amostra.

5.2.3.2. Ângulo de contato

O ângulo de contato da gota de água (Milli-Q[®]) formada sobre os filmes de multicamadas depositadas sobre o substrato de silício foi determinado usando método de gota sésil padrão (Digidropmeter, GBX). As medidas foram obtidas de maneira aleatória em três diferentes regiões na amostra.

5.2.3.3. AFM

As imagens topográficas foram realizadas a temperatura ambiente (~20°C) usando um microscópio de força atômica (AFM) da Brucker operando no modo contato, equipado com ponteiros de nitreto de silício (força constante de 0,4 N/m e um raio terminal menor do que 5 nm).

5.2.3.4. QCM-D

O acompanhamento do crescimento dos filmes foi também monitorado pela técnica da dissipação e frequência em microbalança de cristal de quartzo (QCM-D), modelo Q-Sense 4 (Göteborg, Suécia). O substrato utilizado foi um cristal de quartzo (recoberto com ouro) pré-tratado de modo semelhante ao substrato de silício (vide item 5.2.2.2) e as soluções de polieletrólitos foram solubilizadas nas mesmas concentrações usadas para crescer os filmes finos de multicamadas. Para todos os filmes analisados, a primeira camada foi formada injetando uma solução de PEI (700 µL). Após o equilíbrio do sistema, foi realizado o procedimento de lavagem, em triplicata, injetando em cada lavagem 700 µL de água Milli-Q, com intervalo de 2 minutos. Em seguida, foi injetada uma solução de polieletrólito aniônico (HEP), seguido do procedimento de lavagem, injetada uma solução de polieletrólito catiônico (QT, DMC ou TMC), seguido da etapa de lavagem. As injeções foram feitas apenas após a estabilização dos sinais de

frequência e de dissipação, mantendo o volume de injeção constante (700 µL). As soluções de lavagem para cada camada foram as mesmas usadas para preparar as soluções de polieletrólitos. O ciclo foi repetido até alcançar o número de camadas desejadas: PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅.

5.2.4. Ensaio de proliferação celular

Os filmes finos foram preparados em *slides* de vidro, seguindo mesma metodologia descrita no item 5.2.2.2, e colocados em placas de cultura de 24 poços. O meio de cultura utilizado foi DMEM suplementado com 10% de soro de vitelo recém-nascido (NCS) e 0,5 % de antibiótico (10.000 unidades·mL⁻¹ de penicilina e 10.000 µg·mL⁻¹ de estreptomicina). Foram adicionados 500 µL de meio de cultura nas amostras juntamente com uma suspensão de 1x10⁴ células·mL⁻¹ (fibroblastos NIH/3T3 de rato). As amostras foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A viabilidade celular foi determinada nos dias 1 e 7 por meio de metodologia MTT [169, 170] ou Azul de Tripiano 0,3% em câmara de Neubauer [169].

5.2.4.1. Medida da viabilidade celular usando Azul de Tripiano

Após 7 dias de incubação, 100 µL da suspensão celular foram adicionados a 900 µL de Azul de Tripiano (0,3%). Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem celular. A viabilidade celular foi obtida de acordo com a seguinte equação:

$$\text{n}^\circ \text{ de células} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad \text{Eq. 5.1}$$

As medidas foram realizadas três vezes em triplicata.

5.2.4.2. Medida da viabilidade celular usando o Teste de MTT

O meio de cultura foi removido nos dias 1 e 7 e, para cada caso, foram adicionados 100 μL de azul de tetrazólio (MTT) a uma concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 400 μL de DMEM. As microplacas foram incubadas por 3 h a 37°C , para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Após a remoção do meio de cultura, os cristais foram solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol (95%). A análise espectrofotométrica foi medida em leitor Safas-Xenius (Mônaco), com software SP2000-Xenius 5990 (lumi-Emi), a uma absorbância de 570 nm. As medidas foram realizadas três vezes em sextuplicata.

5.2.5. Estabilidade dos filmes em DMEM

Foram adicionados 500 μL de meio de cultura sobre as multicamadas de filmes finos preparados sobre substratos de silício (pré-tratado). As amostras foram colocadas na incubadora a 37°C e 5% de CO_2 . Nos dias 1, 3, 5 e 7 as provas foram removidas do meio de cultura, lavadas com água Milli-Q e a espessura desses materiais determinada por elipsometria (vide item 5.2.3.1). Em paralelo, foi realizado o ensaio de estabilidade utilizando a QCM-D. No entanto, esse experimento foi realizado apenas para os filmes preparados com TMC nas diferentes concentrações de NaCl. Foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 5.2.3.4 e ao final da construção das multicamadas a temperatura do sistema foi aumentada para 37°C . Quando o sistema entrou em equilíbrio, a temperatura foi diminuída para 21°C . Em seguida, foram injetados 700 μL de NaCl (0,15 ou 0,5 M) esperando, novamente, a etapa de equilíbrio para então realizar o procedimento de lavagem com água purificada. Após, a temperatura foi aumentada

para 37 °C e foram realizados os procedimentos de injeção de sal e lavagem. Estes procedimentos foram realizados em duplicata. Na sequência, foram injetados 700 µl de meio de cultura. Para os filmes construídos sem a presença de sal, ao invés da injeção de solução de NaCl, foi injetado o mesmo volume de água Milli-Q.

5.2.6. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com as soluções de QT, DMC e TMC, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas em pH 6,0. Foram colocadas 100 µL da solução de cada polieletrólito em placas de cultura de 24 poços juntamente com 500 µL de DMEM e uma suspensão de 1×10^4 células·mL⁻¹ (fibroblastos NIH/3T3 de rato). As amostras foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas, foi determinada a viabilidade celular por meio da metodologia MTT (vide item 5.2.4.2).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Medidas de Potencial Zeta

O Potencial Zeta (PZ) é uma medida do potencial elétrico de superfície, propriedade física que pode ser utilizada para caracterizar eletricamente partículas que se encontram em solução (colóides). A superfície de partículas coloidais possui carga elétrica que atrai uma fina camada de íons de carga oposta à superfície da partícula, formando uma dupla camada elétrica. Esta dupla camada de íons diminui exponencialmente com a distância a partir da superfície e desloca-se com a partícula. O PZ é o potencial elétrico na dupla camada no local do plano de deslizamento contra um ponto na massa de fluido fixado a uma distância a partir da interface. Em outras palavras, o PZ é a diferença de potencial entre o meio de dispersão (líquido, *bulk*) e a fase estacionária de fluido ligado (ou que se movimenta junto com) à partícula dispersa.

O PZ possui valores que podem variar entre +100 mV até -100 mV. A medida do PZ é uma ferramenta importante para a compreensão do estado da superfície em termos de carga elétrica que nela prevaleçam e da estabilidade das partículas [171]. Na obtenção de filmes LbL, medidas de PZ em soluções de polieletrólitos são realizadas para confirmar se a quantidade de cargas presentes no meio é suficiente (ou não) para que ocorra a adsorção dos polieletrólitos (formação de complexos polieletrólíticos) sobre o substrato. Essa medida também pode ser utilizada para monitorar o crescimento de filmes poliméricos constituídos de multicamadas determinando se a superfície, em um determinado estágio do crescimento, está carregada positiva ou negativamente [42, 172].

Na Tabela 5.1 são mostrados os valores do PZ para as soluções de polieletrólitos utilizadas na construção dos filmes multicamadas. Analisando-se a tabela, pode-se verificar que todas as soluções de polycation apresentam valores positivos de PZ e próximos entre si, bem como verificar que as soluções de poliânion apresentam valores negativos e próximos entre si. Assim, a ocorrência de deposição e crescimento dos filmes multicamadas se dá por meio de interações eletrostáticas entre os polieletrólitos opostamente carregados. A pequena diferença existente entre os valores de PZ das soluções preparadas em meio tampão e em 0,15 M NaCl pode ser explicada pelo efeito da concentração de salina. Em soluções de polieletrólito com baixa concentração de sal, as cadeias de polieletrólitos apresentam conformação prolongada e rígida. Com o aumento na concentração de sal, as cadeias do polieletrólito adotam conformações de glóbulos densas, devido à blindagem da carga [172], fazendo com que ocorra a variação nos valores de PZ.

Quando apresentam PZ muito positivo, +30 mV ou maior, ou muito negativo, -30 mV ou menor, as partículas, em solução, repelem-se e a solução torna-se estável.

Entretanto, quando os valores de PZ são muito baixos (em valores absolutos) ocorre a agregação das partículas. Pode-se ainda dizer que quando os valores de PZ das partículas, obtidas da mistura de duas soluções de polieletrólitos de cargas opostas, forem pequenos ocorrerá a adsorção dos polieletrólitos sobre a superfície do substrato e haverá interação principalmente por meio de ligações de hidrogênio. Após misturadas as soluções polieletrólíticas, se as partículas formadas apresentarem valor de PZ fora do intervalo de -30 mV a + 30 mV, a complexação ocorre, possivelmente, por interação eletrostática [76, 173].

Tabela 5.1. Valores de Potencial Zeta (PZ) para as soluções de polieletrólitos utilizadas para a fabricação dos filmes multicamadas.

Material	Solução	PZ (mV)
QT	Sol. Tampão	24,9 ± 2,44
QT	NaCl	28,7 ± 0,70
DMC	Sol. Tampão	19,6 ± 1,40
DMC	NaCl	23,1 ± 1,10
TMC	Sol. Tampão	23,8 ± 0,44
TMC	NaCl	22,0 ± 1,36
Heparina	Sol. Tampão	-6,0 ± 1,60
Heparina	NaCl	-9,7 ± 0,50

5.3.2. Caracterização físico-química dos filmes finos de multicamadas

Buscando a obtenção de filmes LbL que possuam boas propriedades para o uso como biomateriais, foram explorados alguns métodos de deposição (imersão, *spray*, *spin-coating*) onde foi avaliada a influência destes métodos na formação dos filmes multicamadas. As propriedades físico-químicas dos filmes foram avaliadas por elipsometria, ângulo de contato, microscopia de força atômica (AFM) e microbalança

de cristal de quartzo (QCM-D). A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos desta caracterização.

5.3.2.1. Elipsometria

A espessura das multicamadas dos filmes finos de PEI(HEP/Cátion)_n ($1 \leq n \leq 5$) foi determinada pela técnica de elipsometria. Para um mesmo número de camadas depositadas, o método de imersão (para o sistema preparado em solução tampão) foi o que resultou na obtenção de um filme mais espesso (Fig. 5.2a). Considerando 5 pares de camadas depositadas sobre os substratos de silício pré-tratado ($n = 5$), os filmes obtidos por este método apresentaram para o sistema PEI(HEP/TMC)₅ uma espessura de $21,14 \pm 0,54$ nm. Em contrapartida, os filmes obtidos por *spray* (Fig. 5.2b) e *spin-coating* (Fig. 5.2c), para esse mesmo sistema, possuem espessura de $14,4 \pm 2,7$ nm e $3,6 \pm 0,13$ nm, respectivamente. Todos os filmes preparados em solução tampão pelo método *spray* apresentaram uma média na espessura de c.a 14 nm (Fig. 5.2b). No entanto, esses filmes mostraram-se menos homogêneos quando comparados aos filmes preparados por imersão (Fig. 5.2a) e *spin-coating* (Fig. 5.2c), com exceção do filme PEI(HEP/DMC)₅ (Fig. 5.2c). Foi verificado que os filmes preparados em solução tampão (Fig. 5.2a,b,c), para todos os métodos em estudo, apresentaram-se mais espessos que os filmes preparados em 0,15 M NaCl (Fig. 5.2d,e,f).

Os maiores valores de espessura observados para os filmes preparados em solução tampão, pelo método de imersão, estão relacionados ao aumento da concentração de sal no meio e ao maior tempo de contato entre as espécies de cargas opostas. A quantidade adsorvida aumenta com o aumento na concentração de sal na solução de imersão do polieletrólito. Devido à blindagem da carga em condição de alta

força iônica, existem, nesta condição, menos sítios de ligação por cadeia e, portanto, mais polieletrólitos podem ser adsorvidos [10, 42].

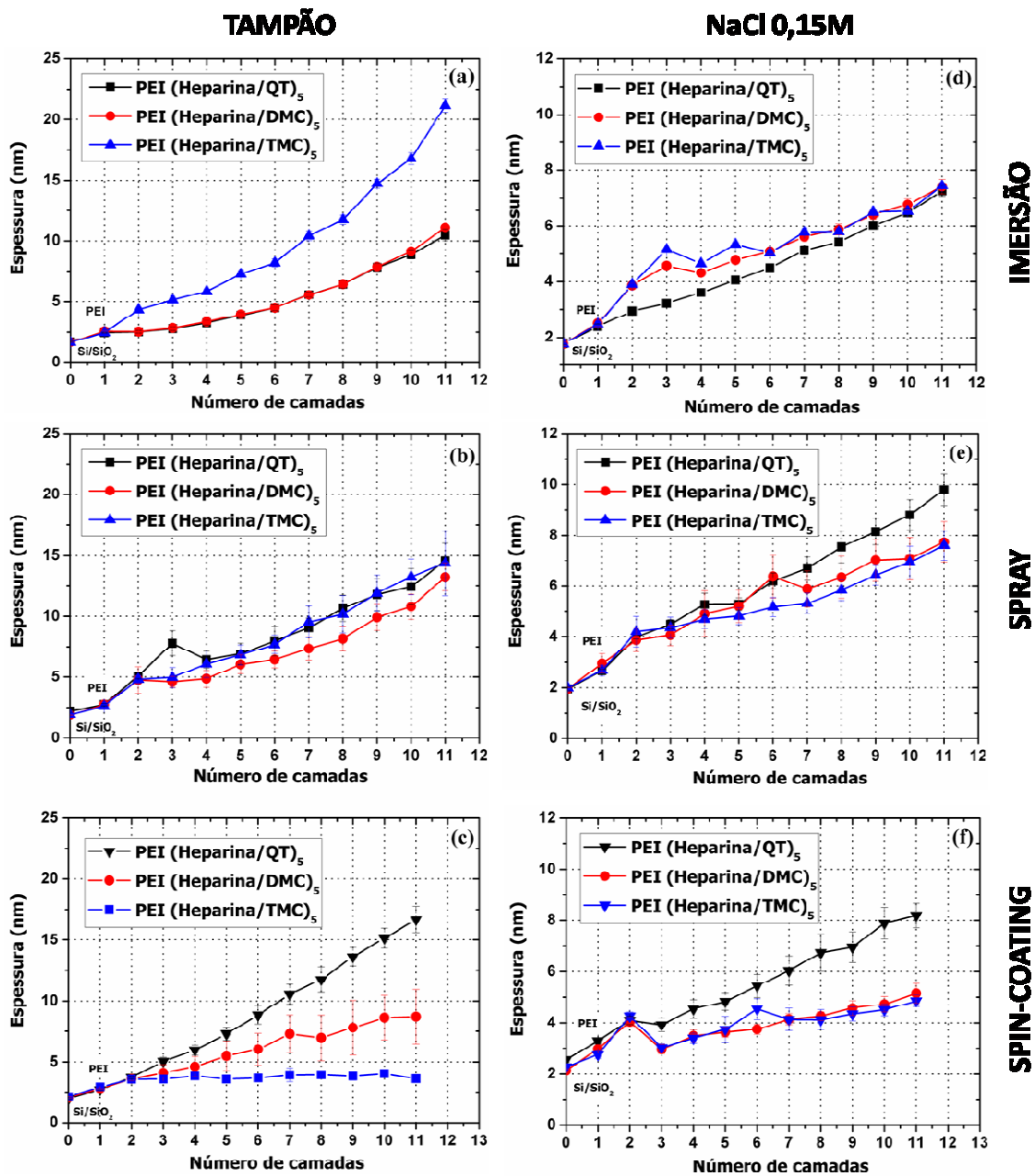


Figura 5.2. Espessura média obtida por elipsometria dos filmes preparados em solução tampão pelo método de imersão (a), *spray* (b), *spin-coating* (c) e dos filmes preparados em 0,15 M NaCl pelo método de imersão (d), *spray* (e), *spin-coating* (f). Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas.

Em outras palavras, a presença de sal nas soluções de polieletrólito afeta drasticamente a configuração da cadeia no *bulk* da solução. Sem a presença de sal nas soluções dos polieletrólitos, as cargas presentes em uma única cadeia do polímero se repelem, de modo que a configuração da cadeia é do tipo bastonete quase que totalmente estendida. Na presença de sal, os contra-íons blindam algumas cargas, permitindo a cadeia do polieletrólito dobrar numa configuração espiral randômica. Se as cadeias mantiverem sua configuração em solução quando adsorvidas ao substrato, então os detalhes estruturais e a espessura dos filmes serão fortemente influenciados pela concentração do sal. Tem sido reportado que filmes produzidos sob alta concentração salina são mais espessos e tem uma rugosidade superficial maior [174]. Ladam et al. [28] revelaram que a concentração de sal afeta o nível de sobrecompensação de cargas e as conformações de polieletrólitos da camada mais externa. Em altas concentrações salinas os polieletrólitos adotam conformações espiralares aleatórias e formam um número de *loops* e caudas que levam a um alto nível de sobrecompensação de cargas e, portanto, a um filme mais espesso. Entretanto, o efeito da concentração de sal ainda não é bem compreendido.

Para os outros dois métodos analisados (*spray* e *spin-coating*), a diminuição nos valores de espessura medidos (para alguns filmes) está relacionada a efeitos físicos externos. No método por *spray* o substrato é colocado verticalmente em um anteparo e quando a solução é borrifada, grande parte desta é drenada da superfície por gravidade. Já para os filmes preparados por *spin-coating* (condicionado à alta rotação, 3.000 rpm), existe a ação da força centrífuga que expulsa rapidamente grande parte da solução colocada sobre o substrato. Vale ainda ressaltar que para ambos os métodos (*spray* e *spin-coating*) o tempo de contato entre a solução do polieletrólito e o substrato é menor [10, 42]. Além da influência da força iônica sobre a espessura da camada de poliânion

adsorvida, a arquitetura molecular do polieletrólito também pode afetar na adsorção das camadas. Estudos mostram que polímeros ramificados tem um forte efeito na conformação e estrutura dos polieletrólitos em solução, afetando a espessura das multicamadas [10]. Outros estudos demonstram que a deposição LbL é influenciada pela temperatura. Por exemplo, Buscher et al. [175] demonstraram que a espessura das multicamadas de polieletrólitos aumenta continuamente com a temperatura de adsorção. Uma explicação é que mais cadeias são depositadas devido ao fato das interações entre as partes hidrofóbicas das cadeias dos polieletrólitos aumentarem com o aumento da temperatura. Neste sentido, Tan et al. [176] sugeriram que os filmes de multicamadas estão mais intumescidos a uma temperatura elevada e que mais cadeias poliméricas são presas nas camadas depositadas, levando a um aumento da espessura.

No que diz respeito ao pH, alguns estudos mostram que a deposição de polieletrólitos fracos é influenciada pela conformação e densidade de cargas de superfície [177]. Outros estudos revelam que a combinação de densidade de cargas entre os dois polieletrólitos desempenham papel crucial no crescimento das camadas [178, 179]. A variação da densidade de cargas ao longo da cadeia polimérica resulta na mudança da força das interações eletrostáticas intra e intermoleculares. As interações intramoleculares afetam a conformação de polieletrólito em solução, bem como a quantidade adsorvida e a camada de estrutura. A diminuição da densidade de cargas leva a uma conformação em espiral mais compacta. As interações intermoleculares estão relacionadas aos fenômenos de associação e complexação tanto no *bulk* da solução quanto na interface [178, 179].

5.3.2.2. Ângulo de contato

Na Figura 5.3 são mostrados os valores de ângulo de contato obtidos em função do número de camadas para todos os sistemas estudados. Pelas alterações do ângulo de contato, pode-se verificar que os filmes são progressivamente construídos pela deposição alternada dos polieletrólitos QT (ou DMC ou TMC) e HEP e que os menores valores de ângulo de contato são obtidos para as camadas de heparina que é mais hidrofílica.

Na Figura 5.3 é demonstrado, ainda, que menores valores de ângulo de contato são observados para os sistemas de filmes automontados com quitosana. Com exceção do sistema depositado pelo método de *spin-coating* (Sol. tampão), verifica-se que não há diferenças significativas nos ângulos de contato dos filmes automontados com DMC/HEP e TMC/HEP, quando comparados entre si para um determinado número de camadas. Isso pode ser explicado pelo fato de que em menores valores de pH as cadeias de quitosana adotam estruturas mais planas. Assim, uma camada mais fina de quitosana é depositada em cima de uma camada mais espessa de heparina, e a razão entre a espessura da camada de heparina para a da quitosana é maior. Um grande número de segmentos subjacentes da camada de heparina penetram na camada da superfície. As superfícies dos filmes de multicamadas tornam-se mais hidrofílicos devido ao alto nível de penetração das cadeias de heparina, provenientes da camada de heparina subjacente, para a camada mais externa de quitosana [13]. Os derivados da quitosana (DMC e TMC) apresentam grupos laterais volumosos, o que dificulta o empacotamento regular das cadeias. Nesses dois casos, os grupos ácido carboxílico e hidroxila estão, provavelmente, orientados para a superfície do Si/SiO₂, enquanto os grupos metila estão predominantemente orientados para o ar [159].

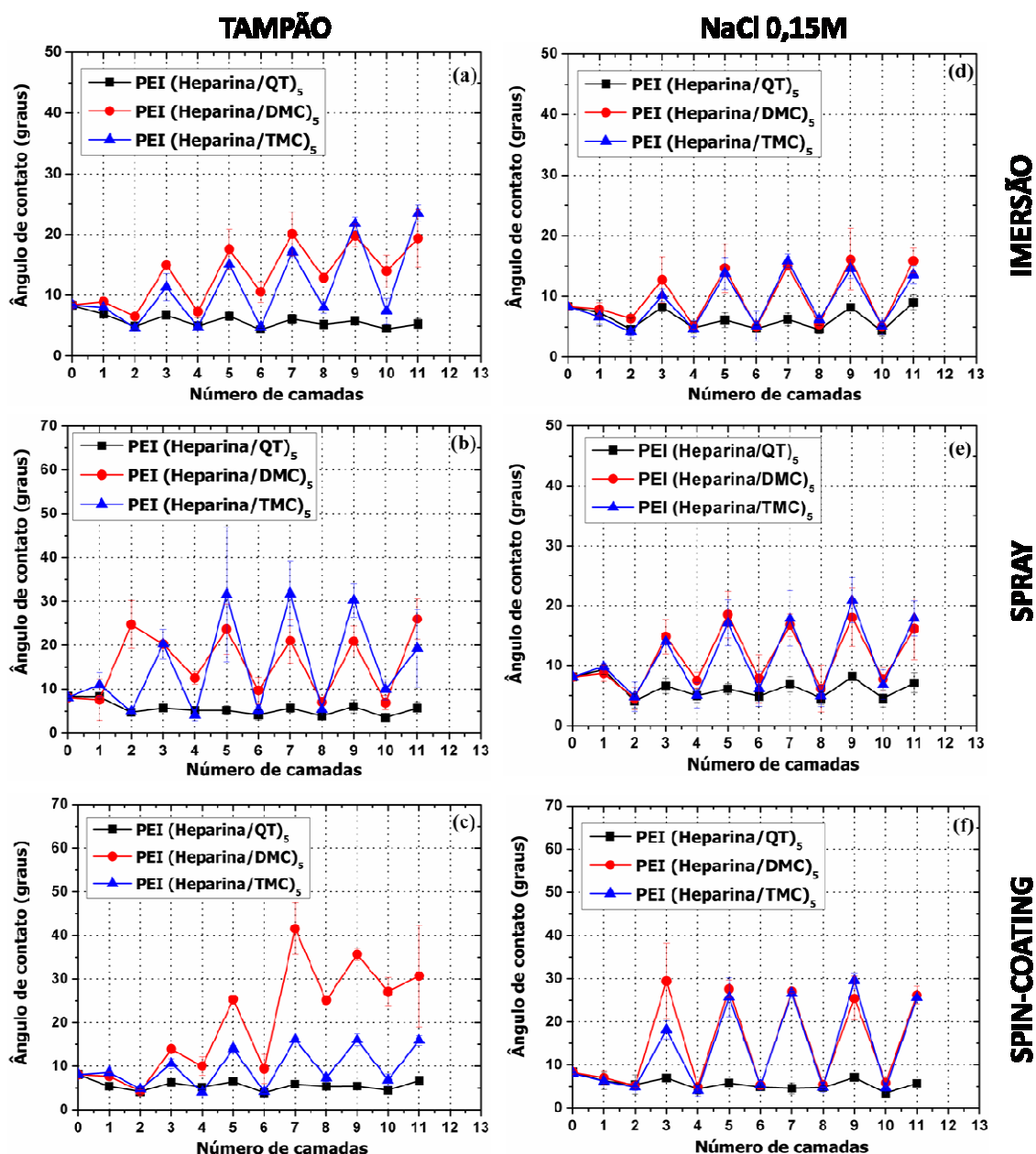


Figura 5.3. Ângulo de contato para os filmes preparados em solução tampão pelo método de imersão (a), *spray* (b), *spin-coating* (c) e para os filmes preparados em 0,15 M NaCl pelo método de imersão (d), *spray* (e); *spin-coating* (f). Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas. A 1ª camada é PEI. Números pares se referem a deposição da HEP.

Yoo et al. [180] investigaram a influência do pH das soluções de imersão sobre a molhabilidade da superfície dos filmes multicamadas, com dois polieletrólitos fracos (PAA e PAH). Em seu trabalho, Yoo et al. [180] reportou que no caso dos polieletrólitos fracos, as cadeias dos polímeros altamente carregados tendem ser adsorvidas como camadas finas com conformações de cadeia plana, enquanto que as cadeias de polímeros menos carregadas tendem a ser adsorvidas como estruturas mais espessas do tipo *loopier*. Além disso, eles encontraram que a molhabilidade da superfície dos filmes multicamadas é determinada pela espessura relativa dessas camadas sequencialmente adsorvidas. Tipicamente, sempre que uma camada fina é depositada na camada mais espessa, um grande número de segmentos de cadeia da camada subjacente mais espessa penetra na camada da superfície. Quando a camada mais espessa é a camada mais externa, as propriedades superficiais são dominadas por esta camada, indicando que poucos segmentos da cadeia da camada fina, subjacente, penetram na superfície da camada mais espessa. Quando ambas as camadas são finas, é encontrado um alto nível de interpenetração entre ambas as camadas superficiais de PAH e PAA. Para as combinações de espessuras intermediárias, a penetração dos segmentos de cadeia da camada subjacente ocorre em ambas camadas superficiais (PAH e PAA), sendo a intensidade de penetração determinada pelas espessuras relativas das duas camadas. Os autores também concluíram que a contribuição da espessura de uma camada adsorvida depende principalmente da densidade de cargas relativas ao adsorvente anterior. Assim, o polímero adsorvido não é influenciado, em grande extensão, pela distribuição segmental dos *loops* e nem pelo número de sítios de ligações iônicas "livres" capazes de criar contatos com pares iônicos [13, 180].

5.3.2.3. AFM

Considerando a importância da morfologia das superfícies dos filmes de acordo com a aplicação visada, onde é notório que a rugosidade bem como a hidrofilicidade são fatores que aumentam a adesão e proliferação celular [165], foram avaliadas a rugosidade da superfície topográfica dos filmes multicamadas. Na Figura 5.4 (A,B,C) são mostradas imagens de AFM dos filmes contendo polication como camada mais externa. Para a maioria dos filmes, foi observada que a morfologia da superfície é nitidamente influenciada pela força iônica e pelo método de preparação dos filmes.

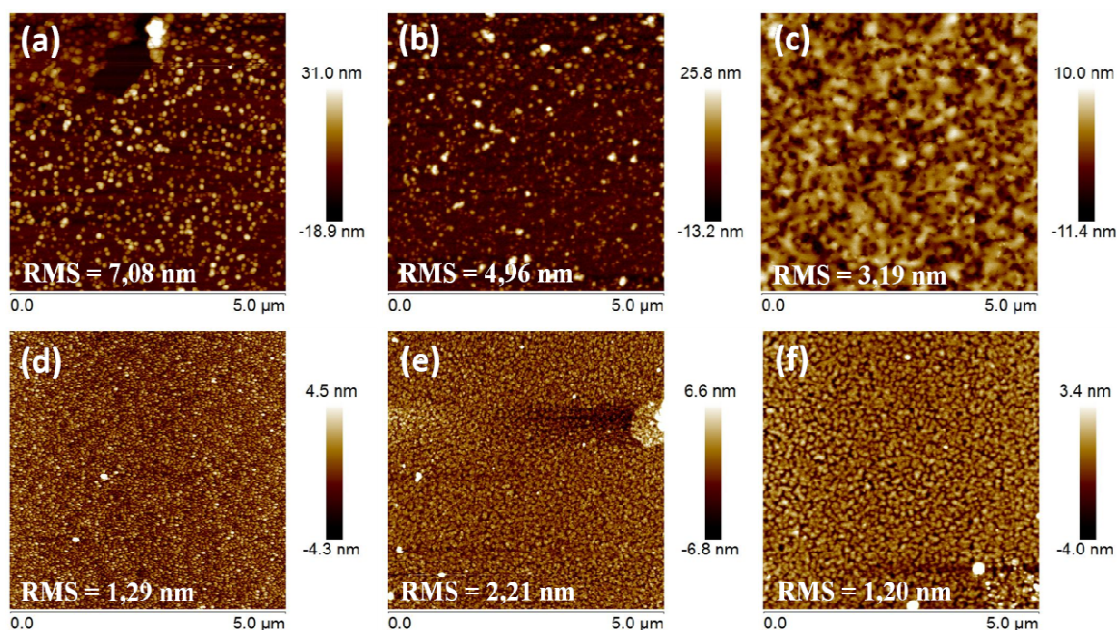


Figura 5.4A. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por imersão: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em 0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 de pares camadas depositadas.

Pela análise das imagens foi verificado que os filmes obtidos pelo método de imersão e em solução tampão (maior força iônica) apresentaram maior rugosidade superficial e morfologia granular quando comparados aos filmes preparados pelo mesmo método em 0,15 M NaCl. Quando se compara a morfologia superficial dos filmes construídos sob mesma força iônica, mas terminados em diferentes materiais (QT, DMC e TMC), em princípio, foi verificado que as diferenças topológicas são pequenas. No entanto, foi nítida a presença de estruturas granulares maiores nos filmes terminados em TMC, devido à maior heterogeneidade das cadeias de TMC e também à menor hidrofiliabilidade de superfície, como verificado por meio das análises de ângulo de contato (Fig. 5.3).

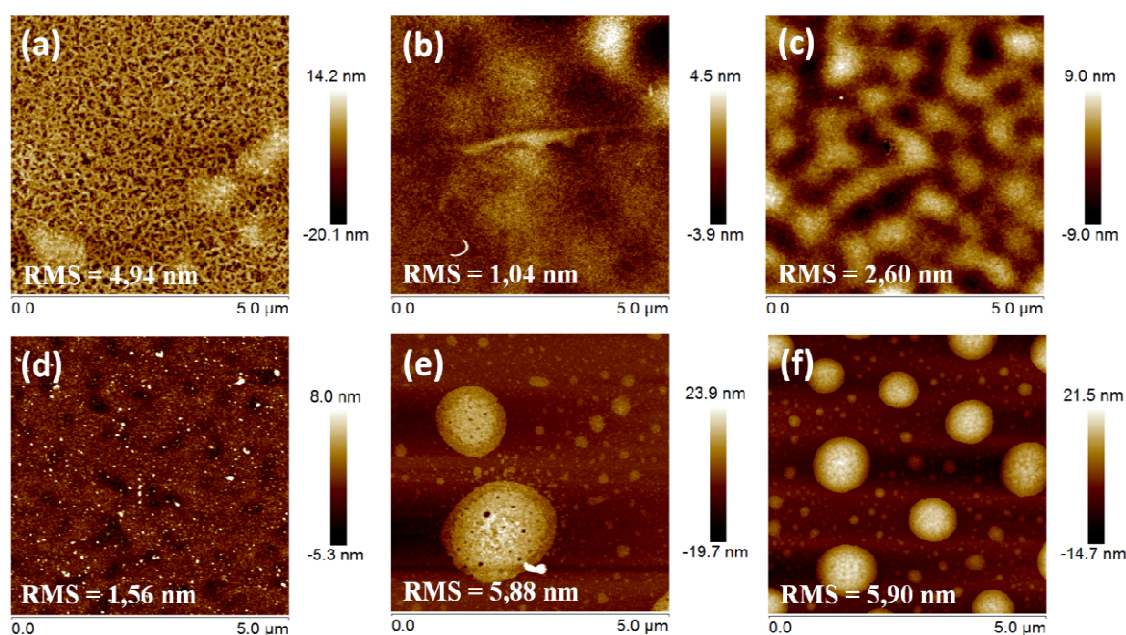


Figura 5.4B. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por *spray*: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em 0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas.

A influência da força iônica na deposição consecutiva das multicamadas pode também ser observada para os outros dois métodos, *spray* (Fig. 5.4B) e *spin-coating* (Fig. 5.4C). Conforme já mencionado, a força iônica do meio altera a conformação das cadeias dos polieletrólitos e, conseqüentemente, a morfologia dos complexos formados. Um aumento na força iônica conduz à neutralização de uma maior quantidade das cargas presentes na estrutura do polieletrólito diminuindo a repulsão entre as cadeias. Isso pode causar o colapso e precipitação de algumas das cadeias individuais do polímero na forma de pequenos grânulos [42, 181].

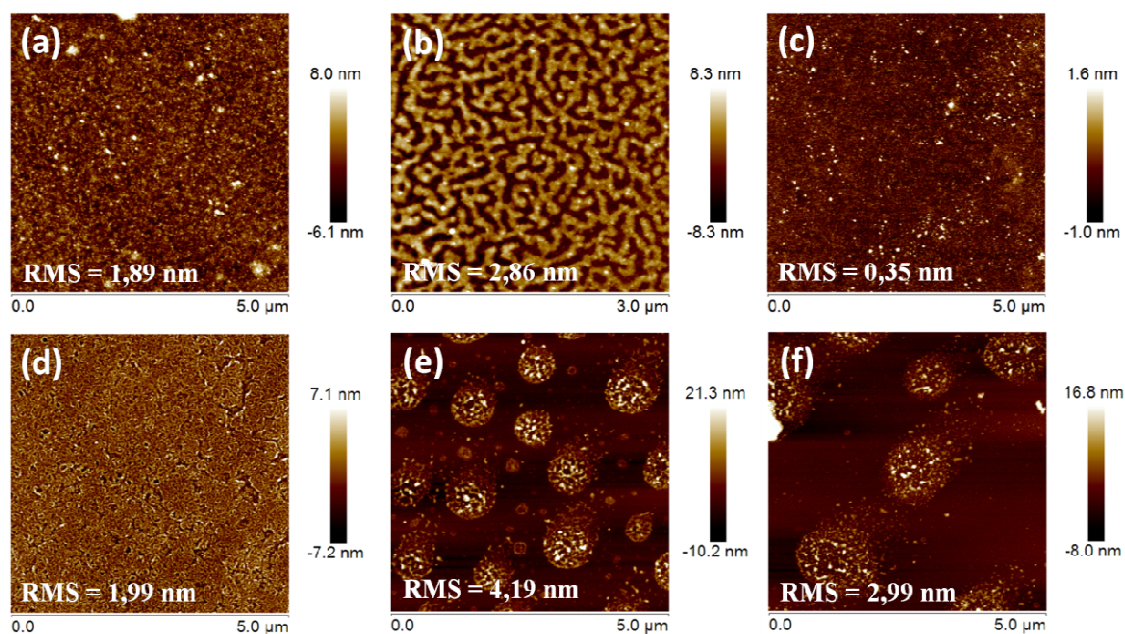


Figura 5.4C. Imagens de AFM das superfícies dos filmes LbL por *spin-coating*: PEI(HEP/QT)₅ (a), PEI(HEP/DMC)₅ (b), PEI(HEP/TMC)₅ (c) preparados em solução tampão; e PEI(HEP/QT)₅ (d), PEI(HEP/DMC)₅ (e), PEI(HEP/TMC)₅ (f) preparados em 0,15 M NaCl. Notação: PEI (Heparina/Cátion)₅ indica que o filme contém até 5 pares de camadas depositadas.

Quando se compara a rugosidade dos filmes obtidos por meio do método *spray* (Fig. 5.4B), verifica-se uma maior rugosidade para os sistemas PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅ preparados em 0,15 M NaCl. O mesmo ocorre para os filmes preparados por meio do método *spin-coating* (Fig. 5.4C), estando isto relacionado à heterogeneidade das cadeias de DMC e TMC e aos efeitos físicos externos (força centrípeta), como discutido anteriormente. Dessa forma, fica evidente que os efeitos físicos externos prevalecem em relação à força iônica. Vale ressaltar que a diferença da força iônica entre os dois sistemas não é muito grande. Os diferentes valores de rugosidade encontrados para os sistemas de filmes LbL podem, também, estar relacionados com a sua espessura. Estudos relatam que quanto maior a espessura do filme, maior a sua rugosidade superficial [182]. O filme mais espesso (Fig. 5.2a) apresentou rugosidade superficial de 3,19 nm (Fig. 5.4A (c)). Enquanto que o filme menos espesso (Fig. 5.2c) apresentou rugosidade superficial de 0,35 nm (Fig. 5.4C(c)).

5.3.2.4. QCM-D

O crescimento e deposição das multicamadas de HEP e derivados da QT foram também monitorados pela técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM-D). A QCM-D é uma técnica *in situ*, sensível, que permite a análise da adsorção de camadas de polieletrólitos em tempo real, em meio líquido, onde as alterações dos valores de massa são detectadas por meio da oscilação do cristal de quartzo [10, 183, 184]. Na Figura 5.5 é mostrada a variação dos valores de frequência e de dissipação ao longo do processo de deposição das multicamadas dos filmes PEI(HEP/TMC)₅, preparados em 0,15 M NaCl. Foi verificado que quando a solução de TMC entrou em contato com o substrato (cristal de quartzo), o sinal da frequência diminuiu, indicando que o polieletrólito foi adsorvido na superfície do cristal. Após a estabilização do sinal foi

injetada a solução de lavagem, ocorrendo um pequeno aumento no valor da frequência, indicando que o material que estava fracamente adsorvido, sobre a superfície do substrato foi removido. Na deposição da camada seguinte (HEP), foi observado comportamento semelhante. *A priori*, quando a HEP é adsorvida, há uma diminuição nos valores de frequência, seguida de um pequeno aumento com o processo de lavagem.

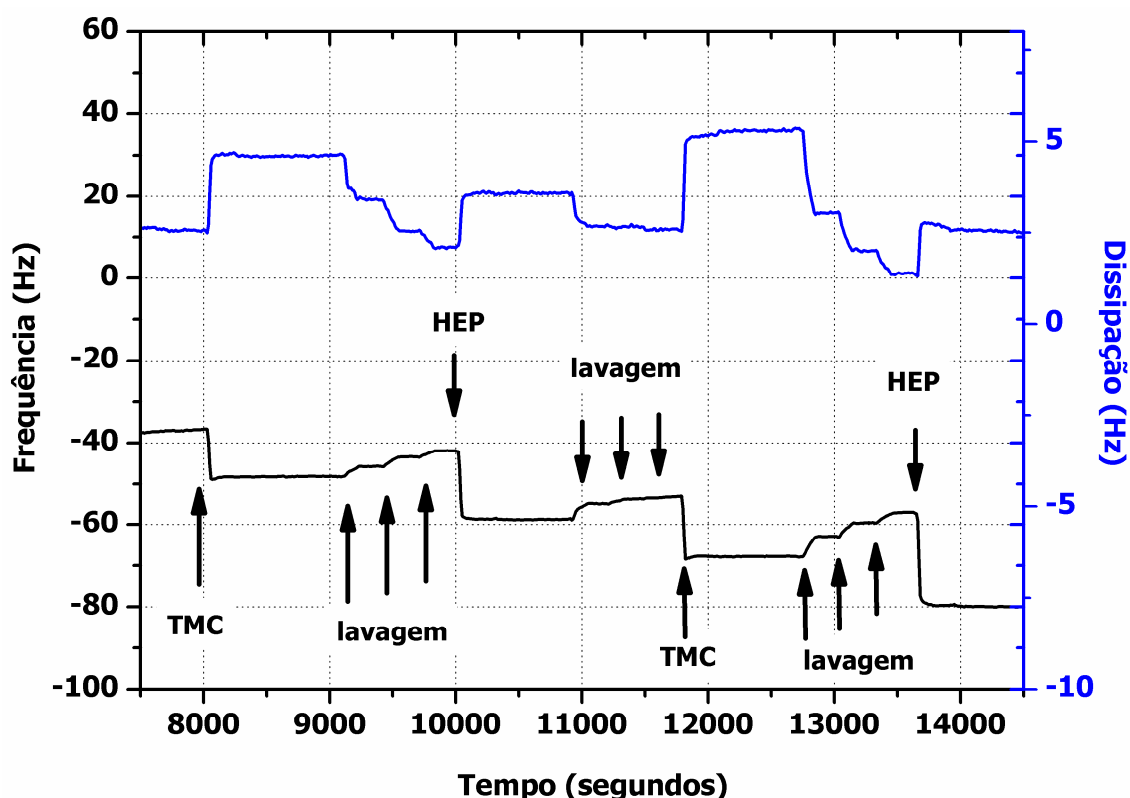


Figura 5.5. Variação dos valores de frequência e dissipação durante a etapa de deposição das camadas de TMC e HEP, preparadas em 0,15 M NaCl. As setas indicam o início do processo de deposição do polieletrólito (TMC ou HEP) e de lavagem.

A variação dos valores de frequência está relacionada com a massa de material depositado, que varia de acordo com a natureza do polieletrólito e das condições do meio (pH, força iônica, efeito da temperatura, etc.). Geralmente, a amplitude de frequência aumenta com o aumento da concentração de sal. Uma vez que as

multicamadas com maior concentração de sal tornam-se mais intumescidas, as cadeias de polieletrólitos de carga oposta difundem-se para o interior da multicamada. Consequentemente, mais polieletrólitos são aprisionados nas multicamadas e a intensidade de penetração da carga aumenta refletindo em aumento da espessura da camada [42, 184].

A variação nos valores de dissipação acompanha os valores de frequência para cada etapa do processo de deposição e de lavagem, e o seu deslocamento fornece informações sobre a rigidez do filme. Quanto maior o valor de dissipação, menos rígido é o filme [42, 185]. Pelo gráfico de dissipação (Fig. 5.5), foi verificado que durante a deposição há um aumento na amplitude dos valores de dissipação, como resultado da adsorção do polieletrólito sobre a superfície do substrato. Após a etapa de lavagem há pequena diminuição devido a remoção de material fracamente adsorvido. Ainda, foi verificado que a variação dos valores de dissipação não ultrapassou a faixa de ± 6 Hz. Esse valor permite considerar o comportamento do filme PEI(HEP/TMC)₅ como um sistema rígido [42, 185]. Para os demais sistemas foi observado comportamento semelhante, sendo que os filmes preparados em maiores concentrações salinas apresentaram maiores valores de dissipação, como esperado, indicando um aumento na interpenetração, como anteriormente discutido [184].

Ao final do processo de deposição, foi obtido o perfil do crescimento dos filmes (Fig. 5.6) construídos sobre o substrato (cristal de quartzo), pela diferença dos valores de frequência de cada camada depositada, após o processo de lavagem (Fig. 5.5). O perfil da variação dos valores de frequência apresentou crescimento linear, estando de acordo com o observado para o procedimento de imersão (Fig. 5.2d). A variação nos valores de frequência pode ainda fornecer dados sobre a quantidade de massa adsorvida após cada etapa de deposição, por meio da equação descrita por Sauerbrey [186].

Sauerbrey [186] propôs um modelo de proporcionalidade entre a mudança na massa em um eletrodo oscilador de quartzo e a mudança nos valores de frequência (Equação 5.2).

$$-\Delta f = C \times \frac{\Delta m}{v} \quad \text{Eq. 5.2}$$

A equação de Sauerbrey [183, 187] é utilizada apenas para sistemas rígidos, onde Δf é a variação da frequência (em Hz), C é a constante de sensibilidade mássica ($C \sim 17.7 \text{ ng.cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ a $f = 5 \text{ MHz}$ em ar), Δm é a variação da massa (em ng.cm^{-2}) e v é o número do harmônico.

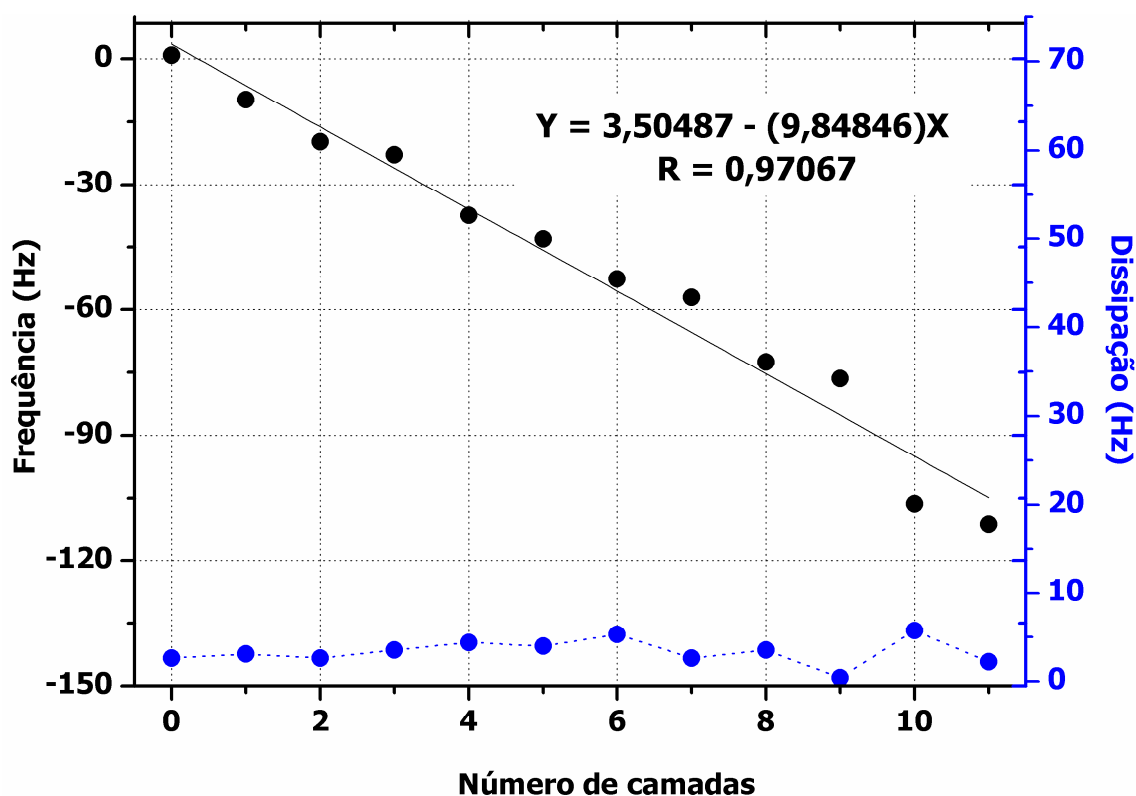


Figura 5.6. Variação dos valores de frequência e dissipação, em função do número de camadas, durante a deposição das camadas do filme PEI(HEP/TMC)₅ em 0,15 M NaCl. Cada ponto no gráfico corresponde a deposição de uma camada de polieletrólito (TMC ou HEP).

Dessa forma, por meio da equação de Sauerbrey [186] foi possível calcular os valores relativos à deposição de cada camada, para todos os sistemas em estudo, conforme apresentado na Tabela 5.2 (sistemas preparados em 0,15 M NaCl) e Tabela 5.3 (sistemas preparados em solução tampão).

Tabela 5.2. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para os sistemas preparados com 0,15 M NaCl.

Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey ($\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey ($\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$)
PEI(HEP/QT)₅					
PEI _{1a}	-9,26	2,61	QT _{7a}	-14,76	4,19
Heparina _{2a}	-8,26	2,33	Heparina _{8a}	2,95	-0,83
QT _{3a}	1,01	-0,28	QT _{9a}	-22,54	6,37
Heparina _{4a}	-9,19	2,59	Heparina _{10a}	-3,21	0,91
QT _{5a}	0,88	-0,25	QT _{11a}	-15,29	4,32
Heparina _{6a}	5,90	-1,67			
PEI(HEP/DMC)₅					
PEI _{1a}	-17,25	4,87	DMC _{7a}	-5,12	1,45
Heparina _{2a}	-10,55	2,98	Heparina _{8a}	-13,91	3,93
DMC _{3a}	2,86	-0,81	DMC _{9a}	-6,59	1,86
Heparina _{4a}	-13,53	3,82	Heparina _{10a}	-13,17	3,72
DMC _{5a}	-4,02	1,14	DMC _{11a}	-9,14	2,58
Heparina _{6a}	-15,38	4,34			
PEI(HEP/TMC)₅					
PEI _{1a}	-9,34	2,64	TMC _{7a}	-4,15	1,17
Heparina _{2a}	-9,82	2,77	Heparina _{8a}	-14,52	4,10
TMC _{3a}	-4,70	1,33	TMC _{9a}	-3,29	0,93
Heparina _{4a}	-13,28	3,75	Heparina _{10a}	-24,91	7,04
TMC _{5a}	-5,37	1,52	TMC _{11a}	-10,77	3,04
Heparina _{6a}	-10,79	3,05			

Da Tabela 5.2 é possível observar, em geral, que os maiores valores de massa depositada por camada ocorrem após a interação da superfície do filme com o

polieletrólito de HEP, alcançando maiores valores para o filme de PEI(HEP/TMC)₅, c.a 7,04 ng·cm⁻². A massa total das camadas depositadas para os filmes de PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅, foi 20,29; 29,88 e 28,29 ng·cm⁻², respectivamente.

Tabela 5.3. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para os sistemas preparados em solução tampão.

Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey (ng·cm ⁻²)	Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey (ng·cm ⁻²)
PEI(HEP/QT)₅					
PEI _{1a}	-10,63	3,00	QT _{7a}	-22,00	6,21
Heparina _{2a}	-20,95	5,92	Heparina _{8a}	-9,12	2,57
QT _{3a}	-11,25	3,18	QT _{9a}	-23,59	6,66
Heparina _{4a}	-6,46	1,82	Heparina _{10a}	-15,59	4,40
QT _{5a}	-18,23	5,15	QT _{11a}	-26,29	7,43
Heparina _{6a}	-8,07	2,28			
PEI(HEP/DMC)₅					
PEI _{1a}	-25,73	7,27	DMC _{7a}	-25,73	7,27
Heparina _{2a}	-26,56	7,50	Heparina _{8a}	-20,95	5,92
DMC _{3a}	-7,28	2,05	DMC _{9a}	-31,38	8,86
Heparina _{4a}	-19,33	5,46	Heparina _{10a}	-20,12	5,68
DMC _{5a}	-17,71	5,00	DMC _{11a}	-42,69	12,06
Heparina _{6a}	-28,18	7,96			
PEI(HEP/TMC)₅					
PEI _{1a}	-15,75	4,45	TMC _{7a}	-24,07	6,80
Heparina _{2a}	-24,13	6,81	Heparina _{8a}	-38,00	10,73
TMC _{3a}	-18,52	5,23	TMC _{9a}	-34,32	9,69
Heparina _{4a}	-5,55	1,57	Heparina _{10a}	-46,33	13,08
TMC _{5a}	-17,18	4,85	TMC _{11a}	-47,94	13,36
Heparina _{6a}	-21,78	6,15			

Para os filmes preparados em solução tampão (Tab. 5.3) foi verificada uma maior deposição por camada logo após a interação da superfície com o polieletrólito catiônico. A massa total de cada filme foi de 48,62; 75,03 e 82,72 ng·cm⁻² para os

sistemas de filmes contendo QT, DMC e TMC, respectivamente. Nota-se que o filme contendo TMC preparado em solução tampão foi o que apresentou maior massa de material depositado. Este resultado está de acordo com o obtido por elipsometria (Fig. 5.2a). Os valores negativos observados após a deposição de algumas camadas podem estar relacionados à reorganização das cadeias macromoleculares que formam os complexos na superfície do filme, a remoção de material fracamente adsorvido na superfície ou, ainda, devido à perda de água ou íons presentes na estrutura interna do filme, durante o processo de complexação [181].

5.3.3. Ensaio de viabilidade celular

Devido à grande dificuldade em se obter materiais que permitam, principalmente rápida adesão e proliferação celular, são numerosos os estudos que procuram obter filmes multicamadas que possam ser utilizados para esse fim [10, 74, 165]. Dessa forma, o presente estudo foi realizado para verificar a influência da atividade biológica dos filmes PEI(HEP/policación)₅ sobre a adesão e proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3. A Figura 5.7 (a,b,c) representa a viabilidade celular, por meio da contagem com azul de Tripiano, para todos os sistemas em estudo no tempo de 7 dias. Analisando-se os resultados, pode-se verificar que, para os sistemas obtidos por meio do método de imersão (Fig. 5.7a), a viabilidade celular dos filmes de PEI(HEP/QT)₅ e PEI(HEP/TMC)₅ em ambas condições de força iônica (solução tampão e 0,15 M NaCl) foi a mesma. Entretanto, para as amostras de PEI(HEP/DMC)₅ verificou-se uma maior viabilidade para os filmes preparados em 0,15 M NaCl ($75,31 \pm 10,47\%$) frente aos filmes preparados em solução tampão ($42,5 \pm 6,09\%$). Para os ensaios empregando os filmes multicamadas pela técnica *spray* (Fig. 5.7b), verificou-se um alto valor porcentual de viabilidade para as amostras de PEI(HEP/QT)₅ e PEI(HEP/DMC)₅, sendo

que as mesmas não diferenciaram-se do controle, já que as diferenças encontram-se dentro do intervalo do desvio, em ambas condições de força iônica. Entretanto, para os ensaios celulares com o sistema PEI(HEP/TMC)₅ foi verificado uma baixa viabilidade celular quando comparados com o controle; 32±22,5% e 48,3±23% para os filmes preparados em solução tampão e 0,15 M NaCl, respectivamente. Para os ensaios utilizando os filmes por meio do método *spin-coating* (Fig. 5.7c) verificou-se uma baixa viabilidade celular para todos os sistemas quando comparados ao controle, embora os sistemas não tenham diferenciado entre si neste aspecto.

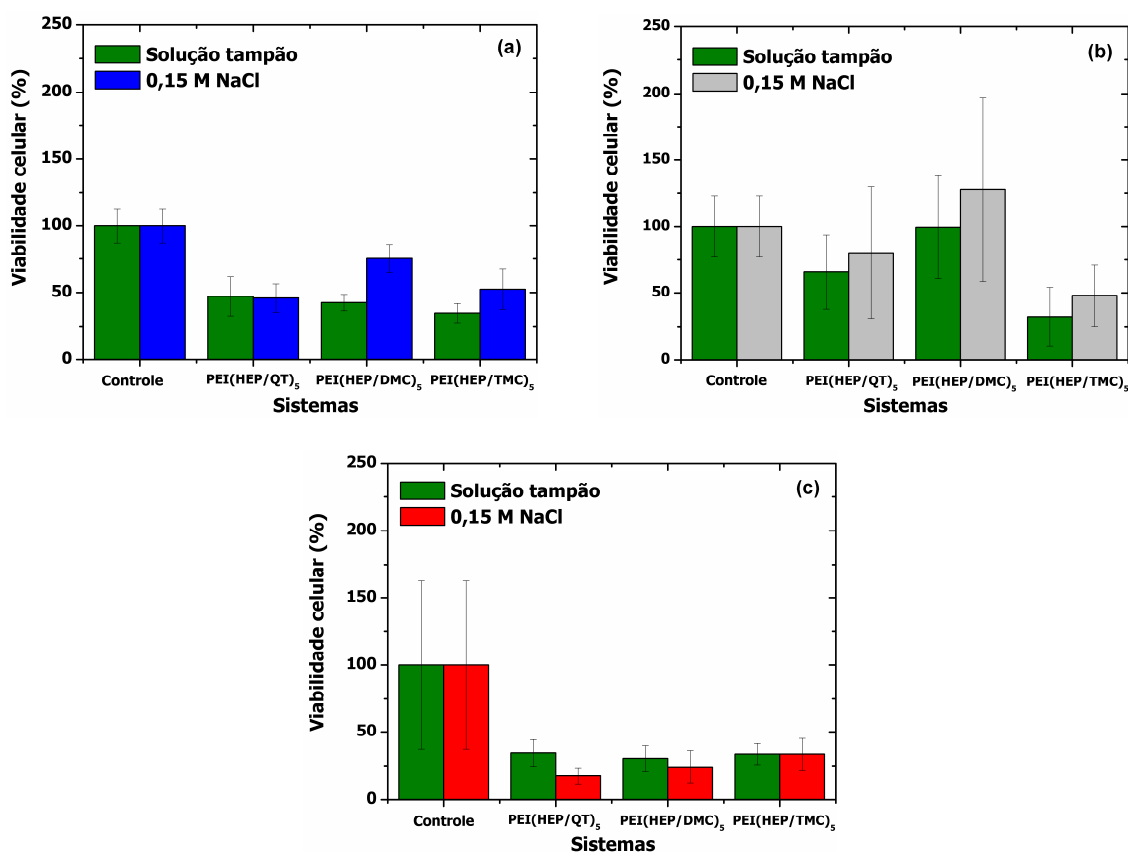


Figura 5.7. Proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 analisada no período de 7 dias para os filmes preparados pelo método de imersão (a), *spray* (b) e *spin-coating* (c).

Um balanço adequado da hidrofiliicidade/hidrofobocidade é um dos principais fatores que afetam a adesão celular e é influenciado pela carga elétrica, morfologia de

superfície e pelos grupos funcionais presentes na superfície dos biomateriais. Comportamentos celulares são principalmente mediados por interações das cargas positivas dos materiais com as membranas celulares ou por captação celular e subsequente ativação de vias de transdução de sinal intracelular. O Potencial Zeta (PZ) da superfície da heparina é negativo em pH 3.0. Já, os valores de PZ da superfície da quitosana e de seus derivados nesse mesmo pH são positivos, o que indica a presença de sítios catiônicos na superfície da quitosana [165]. Devido ao efeito de blindagem dos grupos metila, a força repulsiva entre os grupos $-N(CH_3)_3^+$ é mais fraca do que entre os grupos $-NH_3^+$. Assim, comparados com as cadeias de quitosana, as cadeias de TMC e DMC são mais flexíveis e interagem mais facilmente com o envelope celular. Em baixos valores de pH pode-se beneficiar da protonação dos grupos $-NH_2$, mas reprimir a dissociação dos grupos $-N(CH_3)_3^+Cl^-$. Com a presença de mais grupos $-N(CH_3)_3^+Cl^-$, a cadeia de TMC torna-se mais flexível do que as de QT em maiores valores de pH. No entanto, devido as forças repulsivas entre os grupos $-N(CH_3)_3^+$ e H^+ em pHs menores, a cadeia de TMC se enovela e torna-se mais densa e rígida do que a cadeia da quitosana e suas interações com o envelope celular reduzem. Além disso, os grupos $-N(CH_3)_3^+Cl^-$ não podem interagir com os sítios de carga negativa no envelope celular [87]. Devido a isso, quase não se verificou diferença na viabilidade celular da QT e seus derivados em meio ácido. Deve-se também levar em consideração a rugosidade e hidrofiliicidade da superfície dos materiais. As superfícies contendo QT como camada mais externa apresentou-se mais hidrofílica que os filmes terminados em TMC e DMC. É bem sabido que as células preferem se ancorar em superfícies hidrofílicas [188, 189]. Os materiais preparados pelo método de imersão apresentaram superfícies mais lisas.

Na Figura 5.8 (A,B,C) são mostradas imagens obtidas por microscopia óptica de uma população típica de fibroblastos 3T3 cultivados sobre a superfície de filmes finos

de quitosana e seus derivados, preparados pelos métodos de imersão (Fig. 5.8A), *spray* (Fig. 5.8B) e *spin-coating* (Fig. 5.8C) em 0,15 M NaCl e em solução tampão, depois de um período de 7 dias, após a semeadura à 37 °C. Analisando-se a Figura 5.8A foi possível verificar que após um período de 7 dias as células crescem e espalham-se aleatoriamente com morfologia de fuso sobre a superfície dos filmes em ambas as condições de força iônica. É nítida uma maior proliferação celular nos filmes de PEI(HEP/TMC)₅, preparados em ambas as condições de força iônica (Fig. 5.8A (c,g)). Para os filmes preparados pelo método de *spray* em solução tampão (Fig. 5.8B (e,f,g)) e para o sistema contendo QT em 0,15 M NaCl (Fig. 5.8B (a)), não foi observada proliferação celular. As células apresentaram geometria esférica e compacta. Contudo, os filmes não são tóxicos, fato este comprovado pelo teste de viabilidade celular, células NIH/3T3 (Fig. 5.7b). O mesmo fato foi observado para os filmes de PEI(HEP/QT)₅, em ambas as condições de força iônica, preparados pelo método de *spin-coating* (Fig. 5.8C). Para os demais, verificou-se adesão e proliferação celular sem a ocorrência de mudanças na morfologia das células quando comparados ao controle. Acredita-se que o comportamento dos fibroblastos sobre a superfície dos filmes, tais como migração e espalhamento com morfologia de fuso, estão correlacionados com o forte contato celular [165]. Mediante os resultados apresentados verificou-se que os filmes preparados pelo método de imersão em concentrações salinas de 0,15 M NaCl apresentaram melhor viabilidade celular frente aos fibroblastos 3T3. Assim, este método foi o escolhido para realizar os demais experimentos cujos resultados são apresentados na sequência.

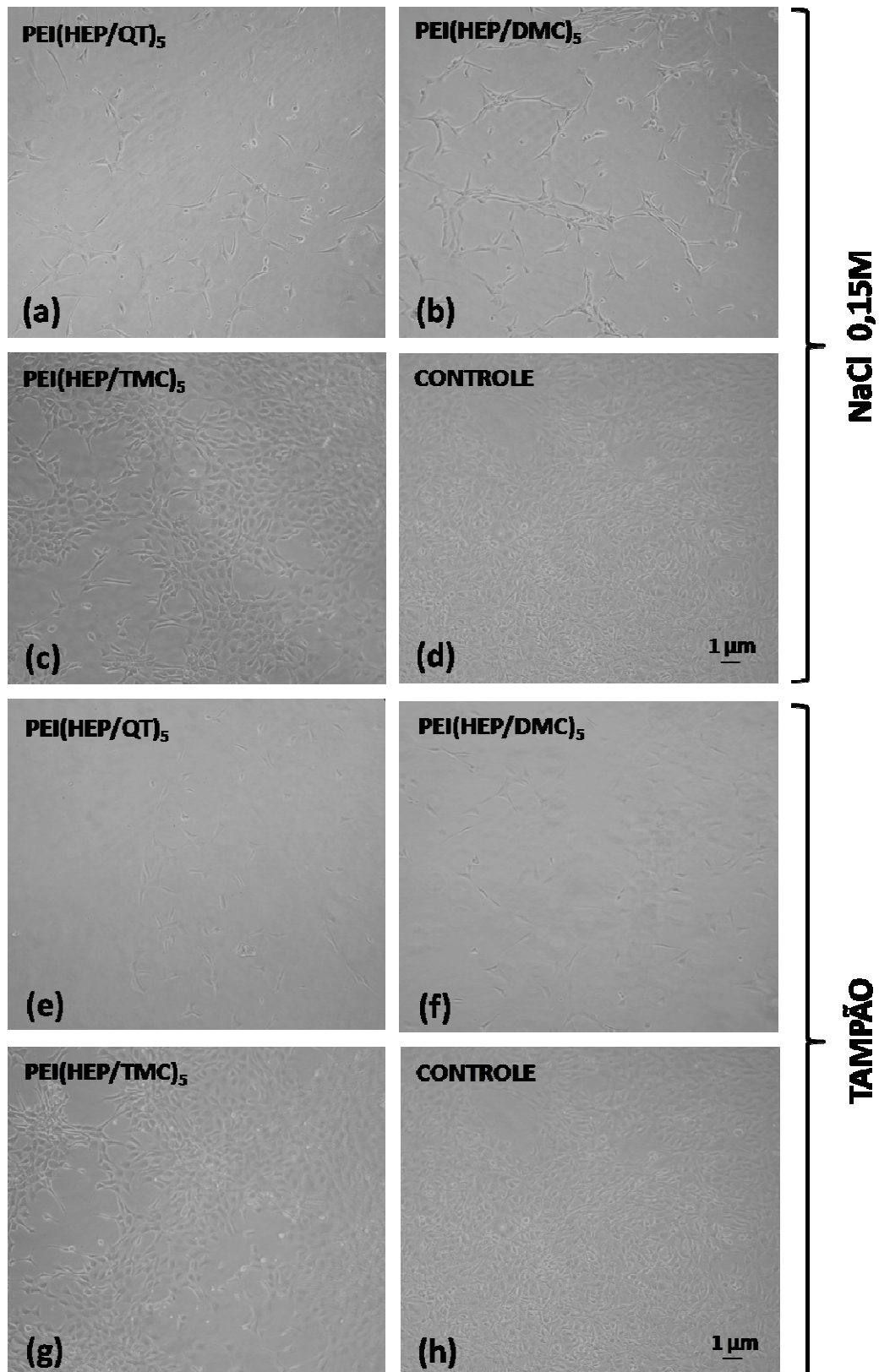


Figura 5.8A. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por imersão em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

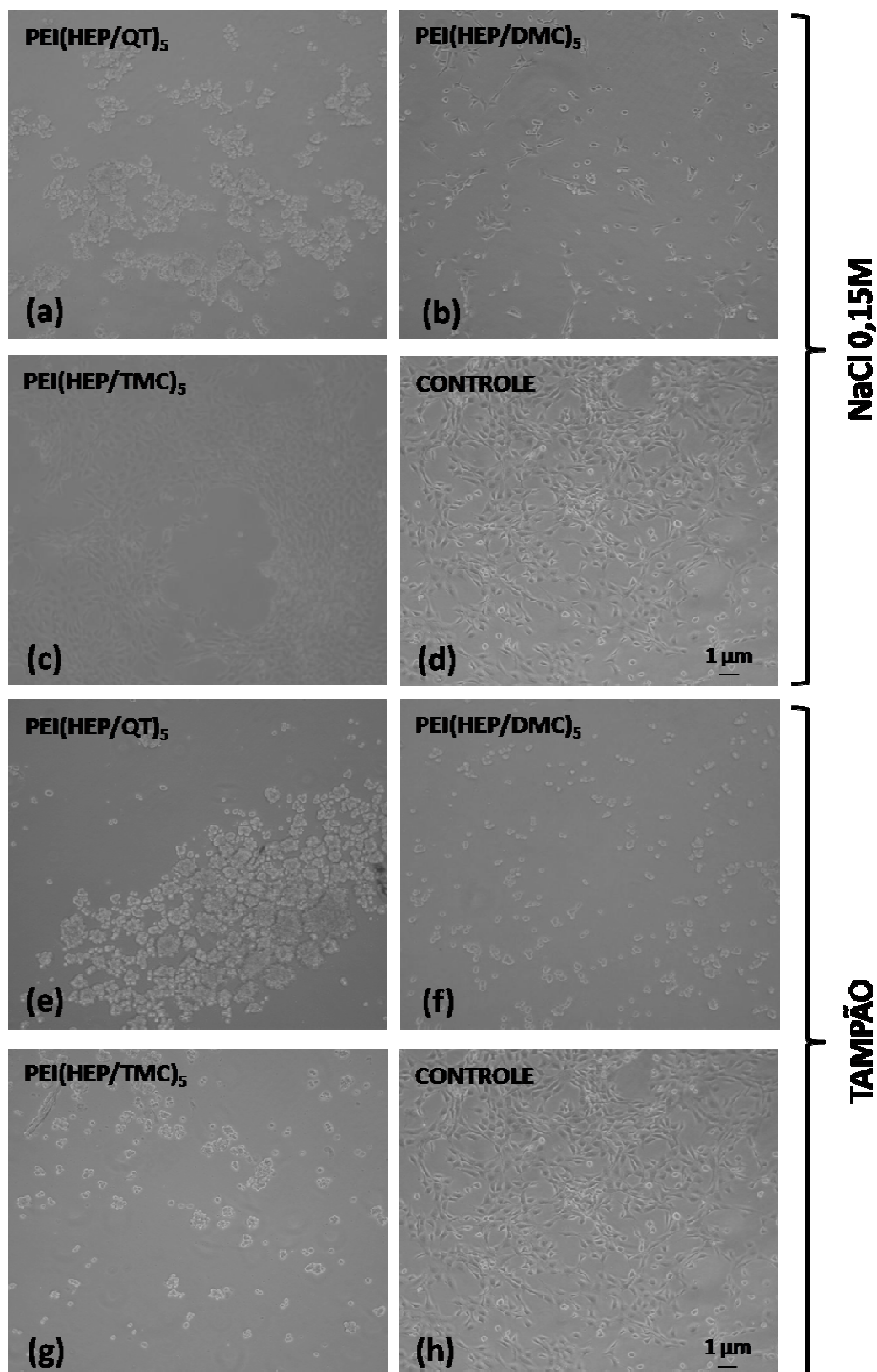


Figura 5.8B. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por *spray* em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

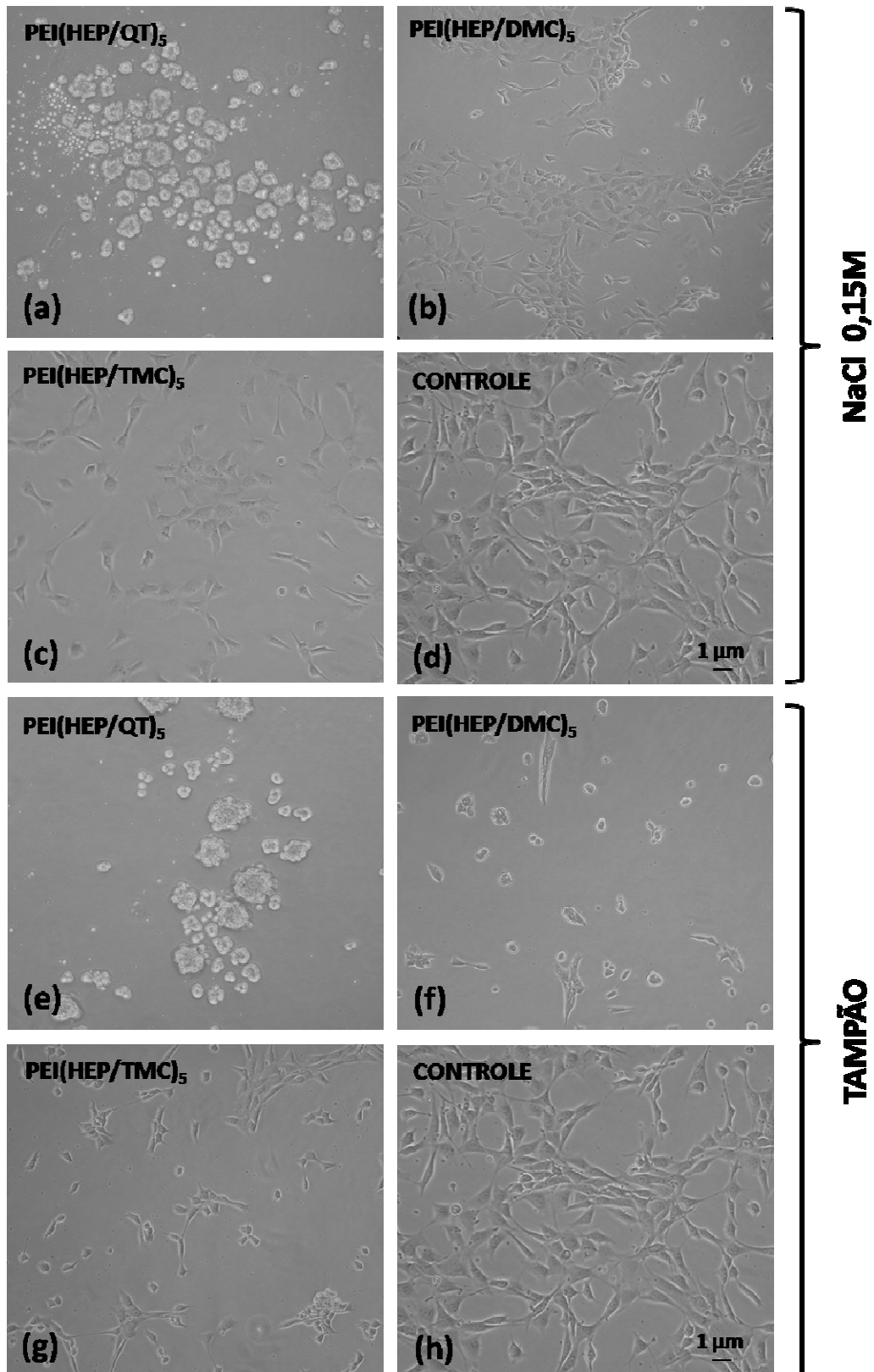


Figura 5.8C. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3, após 7 dias para os filmes preparados por *spin-coating* em solução de 0,15 M NaCl (a, b, c, d) e solução tampão (e, f, g, h). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

5.3.4. Efeito da concentração de NaCl na proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 sobre filmes LbL obtidos por imersão

Após realizar o teste de contagem celular e verificar que os melhores resultados foram obtidos com os filmes preparados pelo método de imersão em 0,15 M NaCl, resolveu-se estudar o efeito da concentração salina frente a proliferação celular. Dessa forma, foram obtidos filmes de PEI(HEP/QT)₅, PEI(HEP/DMC)₅ e PEI(HEP/TMC)₅ em diferentes concentrações salinas: 0; 0,15 e 0,5 M de NaCl. Os filmes foram caracterizados fisicamente pelas técnicas de elipsometria, QCM-D e ângulo de contato. O teste MTT foi utilizado para determinar o efeito da concentração salina sobre a atividade metabólica das células, realizando a contagem celular nos dias 1 e 7 (onde foi observada a confluência celular para o controle).

5.3.4.1. Caracterização dos filmes finos de multicamadas

A Tabela 5.4 mostra os valores de massa depositada para cada camada dos filmes preparados em 0,0 e 0,5 M de NaCl. Os valores de massa para as camadas dos filmes preparados em 0,15 M de NaCl encontram-se na Tabela 5.2 (item 5.3.2.4). De maneira semelhante aos resultados discutidos na secção 5.3.2.4 para os filmes preparados em 0,15 M NaCl, os maiores valores de massa depositada por camada foram observados após a interação da superfície do filme com o polieletrólito aniônico (HEP). Para um mesmo número de camadas os filmes de PEI(HEP/QT)₅ preparados em 0,5 M de NaCl apresentaram quantidade consideravelmente maior de material adsorvido na superfície do eletrodo, c.a $75,84 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$, quando comparado aos demais. Ainda, pela análise da Tabela 5.4, foi possível verificar que com o aumento da força iônica ocorreu um aumento nos valores de massa para todos os filmes analisados.

Tabela 5.4. Valores de Δf e de massa de Sauerbrey calculados para cada camada de polieletrólito depositado para a obtenção dos filmes finos.

Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey (ng·cm ⁻²)	Camada	Δf (Hz)	Massa Sauerbrey (ng·cm ⁻²)
Sistemas preparados em 0,0 M NaCl					
PEI(HEP/QT)₅					
PEI _{1a}	-19,81	5,60	QT _{7a}	-0,28	0,08
Heparina _{2a}	-1,16	0,33	Heparina _{8a}	-3,59	1,02
QT _{3a}	2,02	-0,57	QT _{9a}	0,29	-0,08
Heparina _{4a}	-4,18	1,18	Heparina _{10a}	-2,88	0,81
QT _{5a}	-0,28	0,08	QT _{11a}	-0,17	0,05
Heparina _{6a}	-2,31	0,65			
PEI(HEP/DMC)₅					
PEI _{1a}	-13,29	3,75	DMC _{7a}	-0,54	0,15
Heparina _{2a}	-0,52	0,15	Heparina _{8a}	-2,89	0,82
DMC _{3a}	-0,27	0,08	DMC _{9a}	-1,05	0,30
Heparina _{4a}	-5,26	1,49	Heparina _{10a}	-2,24	0,64
DMC _{5a}	-0,52	0,15	DMC _{11a}	-0,15	0,04
Heparina _{6a}	-2,23	0,63			
PEI(HEP/TMC)₅					
PEI _{1a}	-25,64	7,24	TMC _{7a}	-0,13	0,04
Heparina _{2a}	-1,29	0,36	Heparina _{8a}	-3,02	0,85
TMC _{3a}	-1,14	0,32	TMC _{9a}	-0,42	0,12
Heparina _{4a}	-4,58	1,29	Heparina _{10a}	-2,16	0,61
TMC _{5a}	0,71	-0,20	TMC _{11a}	-0,11	0,03
Heparina _{6a}	-2,72	0,77			
Sistemas preparados em 0,5 M NaCl					
PEI(HEP/QT)₅					
PEI _{1a}	-23,81	6,73	QT _{7a}	8,63	-2,44
Heparina _{2a}	-59,00	16,67	Heparina _{8a}	-37,27	10,53
QT _{3a}	10,08	-2,85	QT _{9a}	-11,49	3,25
Heparina _{4a}	-65,93	18,63	Heparina _{10a}	-29,23	8,26
QT _{5a}	14,99	-4,23	QT _{11a}	-22,59	6,38
Heparina _{6a}	-52,79	14,91			
PEI(HEP/DMC)₅					
PEI _{1a}	-19,06	5,38	DMC _{7a}	-17,1	4,83
Heparina _{2a}	-34,83	9,84	Heparina _{8a}	-29,8	8,42
DMC _{3a}	10,58	-2,99	DMC _{9a}	-21,1	5,96
Heparina _{4a}	-29,8	8,42	Heparina _{10a}	-26,48	7,48
DMC _{5a}	-9,90	2,80	DMC _{11a}	-22,06	6,23
Heparina _{6a}	-26,4	7,46			
PEI(HEP/TMC)₅					
PEI _{1a}	-15,33	4,33	TMC _{7a}	-11,27	3,18
Heparina _{2a}	-22,09	6,24	Heparina _{8a}	-25,68	7,25
TMC _{3a}	0,87	-0,25	TMC _{9a}	-16,2	4,58
Heparina _{4a}	-17,5	4,94	Heparina _{10a}	-36,9	10,42
TMC _{5a}	-9,35	2,64	TMC _{11a}	-25,54	7,22
Heparina _{6a}	-17,56	4,96			

Por exemplo, o filme PEI(HEP/TMC)₅ apresentou os seguintes valores de Δm : 11,43 ng·cm⁻² (0,0 M NaCl); 28,29 ng·cm⁻² (0,15 M NaCl) e 55,51 ng·cm⁻² (0,5 M NaCl), indicando que com o aumento da força iônica, tem-se um aumento nos valores de massa depositada, sobre a superfície do substrato (cristal de quartzo). Isto pode ser explicado pelo fato de que com o aumento da força iônica, as cargas presentes nas cadeias polieletrólíticas são neutralizadas, consequentemente a repulsão entre as cadeias adjacentes, que é, responsável por manter as cadeias do polímero na forma esticada, diminuem. O encolhimento das cadeias deixa o filme mais compacto, diminuindo a energia dissipada pelo cristal [42, 190]. Foram observados novamente valores negativos após a deposição de algumas camadas, os quais podem estar relacionados à remoção de material fracamente adsorvido e perda de água (ou íons) durante o processo de complexação, conforme discutido anteriormente. Os resultados obtidos por QCM estão de acordo com os obtidos por elipsometria (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Espessura média obtida por elipsometria dos filmes preparados em diferentes concentrações salinas.

Força iônica	PEI(HEP/QT) ₅ (nm)	PEI(HEP/DMC) ₅ (nm)	PEI(HEP/TMC) ₅ (nm)
0,0 mol·L ⁻¹	9,97±1,10	8,87±0,97	10,05±0,92
0,15 mol·L ⁻¹	7,26±0,20	7,42±0,27	7,44±0,06
0,50 mol·L ⁻¹	16,45±1,48	16,40±0,95	12,88±0,94

No entanto, os filmes preparados em 0,15 M de NaCl apresentaram espessura menor que os filmes preparados na ausência de NaCl (Tab. 5.5). O mesmo fato é observado quando se analisa hidrofilicidade da última camada desses filmes (Tab. 5.6). Vale a pena ressaltar que ambas as técnicas são qualitativas, diferentemente da técnica QCM-D que é uma técnica quantitativa e extremamente sensível. Pode-se, ainda,

associar esses resultados às mudanças nas condições ambientais, visto que os sistemas de cada condição de força iônica foram preparados em dias diferentes.

Tabela 5.6. Valores médios obtidos de ângulo de contato da superfície dos filmes preparados em diferentes concentrações salinas.

Força iônica	PEI(HEP/QT) ₅ (graus)	PEI(HEP/DMC) ₅ (graus)	PEI(HEP/TMC) ₅ (graus)
0,0 mol·L ⁻¹	48,65±0,35	41,85±0,35	37,55±0,35
0,15 mol·L ⁻¹	8,99±1,22	15,90±2,05	13,54±1,46
0,50 mol·L ⁻¹	60,50±3,25	37,95±3,05	40,85±1,65

5.3.4.2. Ensaio de MTT

Na Figura 5.9 é mostrada a viabilidade celular para todos os filmes multicamadas preparados nas concentrações de 0,0; 0,15 e 0,5 M de NaCl, nos dias 1 e 7, Figuras 5.9a e 5.9b, respectivamente. Analisando-se o gráfico foi observado que ao final do dia 1 (um) todas as amostras nas diferentes concentrações salinas apresentaram iguais valores de viabilidade celular, ou com viabilidade celular superior ao controle, sugerindo uma boa adesão e proliferação celular para o período de 24 h. Ainda assim, foi possível verificar que a viabilidade celular foi maior em todas as amostras preparadas sem NaCl. Isto ocorre devido a ausência de Cl⁻, deixando as cargas positivas da quitosana e seus derivados livres para interagir com o envelope celular [87]. Martins, A. F. [162] estudou o efeito da blindagem do Cl⁻ sobre a TMC em ensaios bactericidas frente a *E.Coli*. Ele verificou que a TMC dissociada interage melhor com o envelope celular da *E.Coli*. Esse efeito também pode ser verificado, embora menor, nas concentrações de 0,15 e 0,5 M de NaCl. Em maiores concentrações salinas, a viabilidade celular é menor devido à maior percentagem de íons cloreto [87].

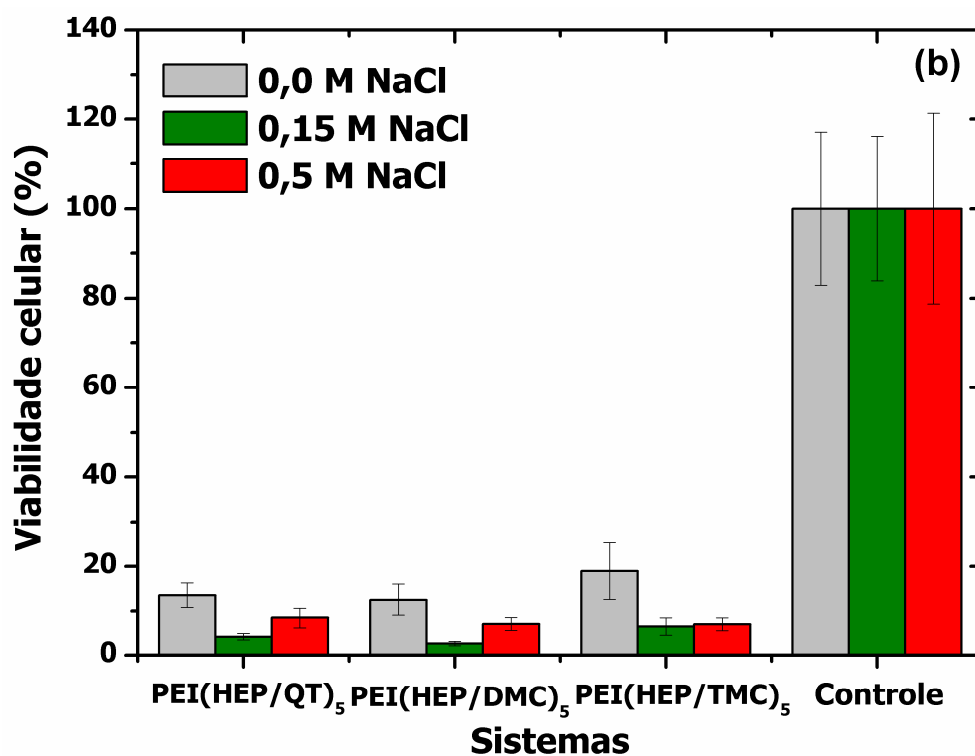
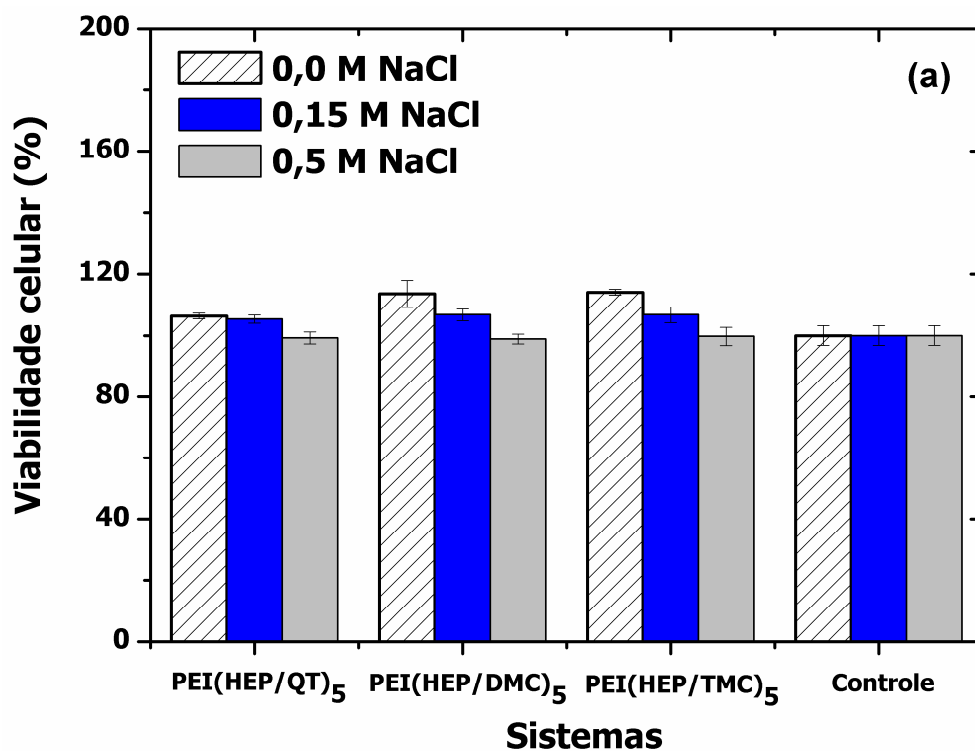


Figura 5.9. Proliferação celular de fibroblastos NIH/3T3 analisada nos dias 1 (a) e 7 (b), para os sistemas em estudo.

No dia 7 (Fig. 5.9b) foi verificada uma baixa viabilidade celular em todas as amostras para todos os sistemas quando comparadas ao branco. Entretanto, o número de células ligadas em cada filme foi muito maior (aproximadamente 10 vezes) em relação ao número inicial de células (1×10^4 células/poço). Ainda, foi possível verificar que as amostras preparadas sem NaCl apresentaram uma maior viabilidade celular no período de 7 dias frente aos outros sistemas. A maior viabilidade celular observada para o controle pode estar associada à sua maior hidroflicidade e menor rugosidade [188, 189].

Na Figura 5.10 (A,B,C) são mostradas imagens obtidas por microscopia óptica de uma população típica de fibroblastos 3T3 cultivada sobre a superfície de filmes finos de quitosana e seus derivados, preparados pelo método de imersão em diferentes concentrações de NaCl, depois de um período de 3h (Figs. (a)-(d)), 24h (Figs. (e)-(h)) e 7 dias (Figs. (i)-(l)), respectivamente, após a semeadura à 37 °C. Verifica-se que para os filmes preparados na ausência de NaCl (Fig. 5.10A), 3 horas após a semeadura, as células aderiram e espalharam-se sobre os filmes com morfologia de fuso. Com tempos de incubação mais longos (1 e 7 dias), verifica-se um aumento significativo na proliferação celular sem a ocorrência de mudanças na morfologia das células. Para os filmes preparados em 0,15 e 0,5 M de NaCl, Figs. 5.10B e 5.10C, respectivamente, a geometria inicial das células (3 horas após a semeadura) é esférica e compacta. Após 24 horas, pode-se verificar que as células crescem e espalham-se aleatoriamente com morfologia de fuso sobre a superfície dos filmes. Com tempos de incubação mais longos (7 dias), verifica-se um aumento significativo na proliferação celular sem a ocorrência de mudanças na morfologia das células.

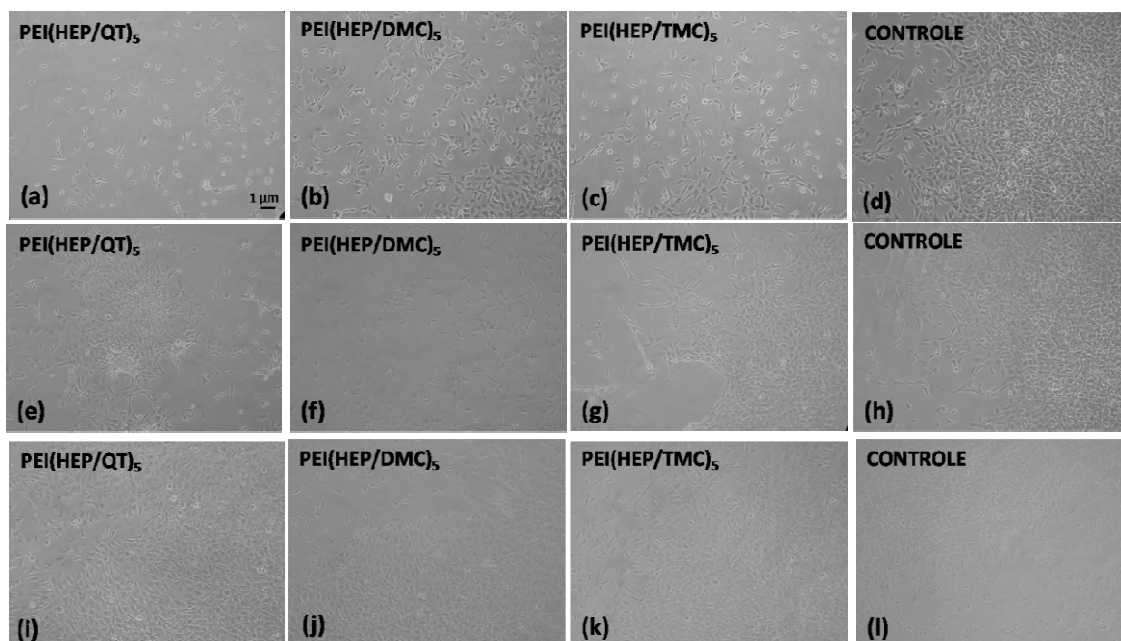


Figura 5.10A. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,0 M NaCl, após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

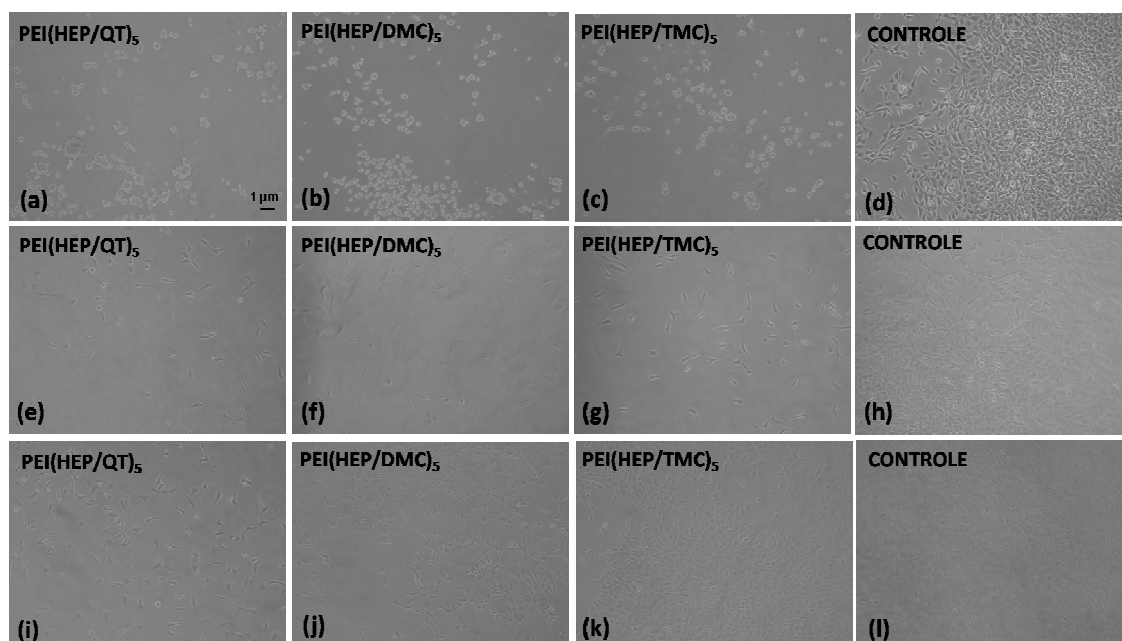


Figura 5.10B. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,15 M NaCl, após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

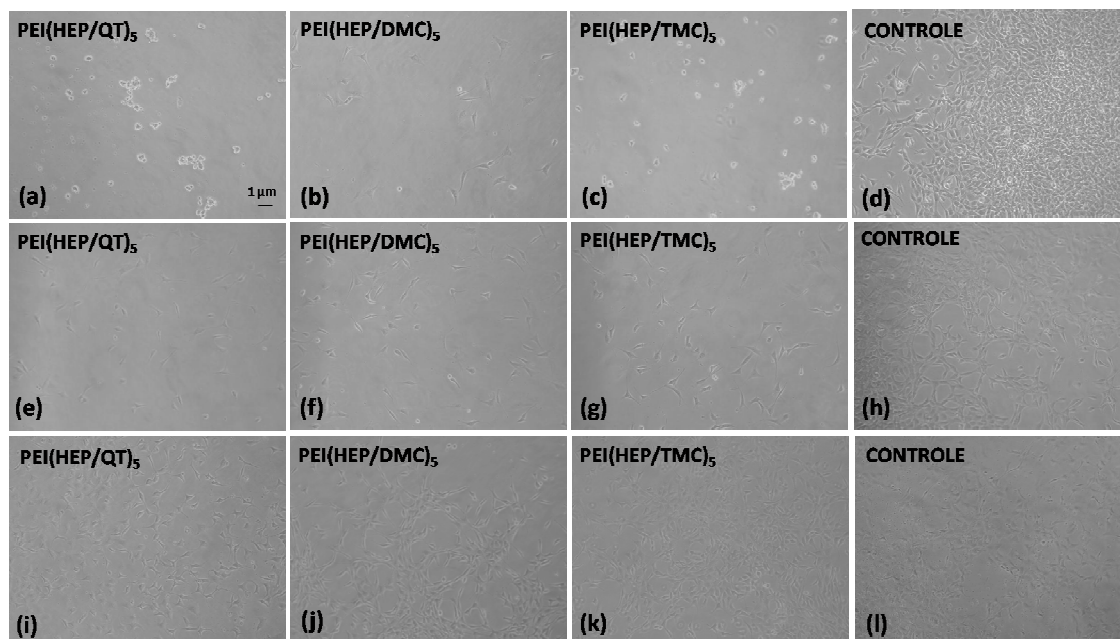


Figura 5.10C. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 sobre os filmes preparados em 0,5 M NaCl , após 3h (a, b, c, d), 24h (e, f, g, h) e 7 dias (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

5.3.5. Estabilidade dos filmes multicamadas em DMEM

Este teste foi realizado para verificar a estabilidade *in vitro* dos filmes multicamadas frente ao meio de cultura (DMEM) nos experimentos celulares. Todas as amostras apresentaram, com passar do tempo, um aumento na espessura como mostrado na Figura 5.11, indicando com isso que o DMEM é adsorvido pelos filmes. DMEM é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular [169]. Desta forma, mesmo após os filmes terem sido lavados com água e secos, os componentes presentes no meio (DMEM) podem ter sido adsorvidos no filme, por meio de interações físicas e/ou químicas. Um dos principais componentes deste meio e que pode ser adsorvido é a albumina. Uma molécula de albumina mede aproximadamente 3,4 nm [191].

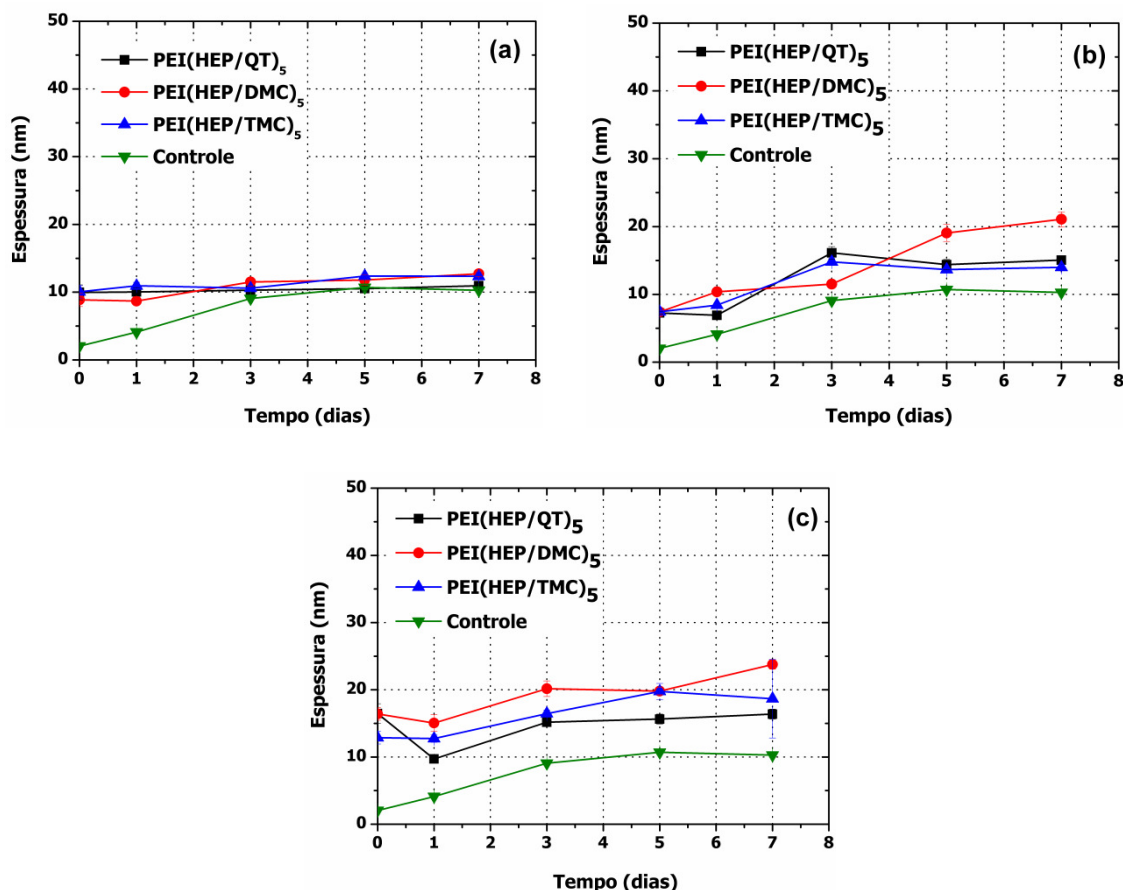


Figura 5.11. Estudo da estabilidade *in vitro* dos filmes multicamadas frente ao DMEM para os filmes preparados pelo método de imersão nas concentrações de: 0,0 M (a); 0,15 M (b) e 0,5 M (c) de NaCl. As espessuras dos filmes foram obtidas em elipsômetro.

Para baixas concentrações de albumina, não ocorre estruturação (Fig. 5.12a). Porém, para altas concentrações de albumina as moléculas adsorvem imediatamente em configurações "end-on" sobre os filmes de polieletrólitos (Fig. 5.12b). Uma camada densa e organizada de proteínas adsorvidas sobre os filmes terminando com polieletrólito positivo deve levar a uma rede de cargas positivas na superfície que atrai novas moléculas de albumina. Este processo de acumulação pode se repetir e, assim, dar origem a uma camada espessa de proteína. Como a espessura da camada aumenta, o

ordenamento entre as moléculas adsorvidas diminui levando também a uma redução das cargas positivas na superfície de modo que depois de várias camadas de proteínas o processo de adsorção finalmente para [191].

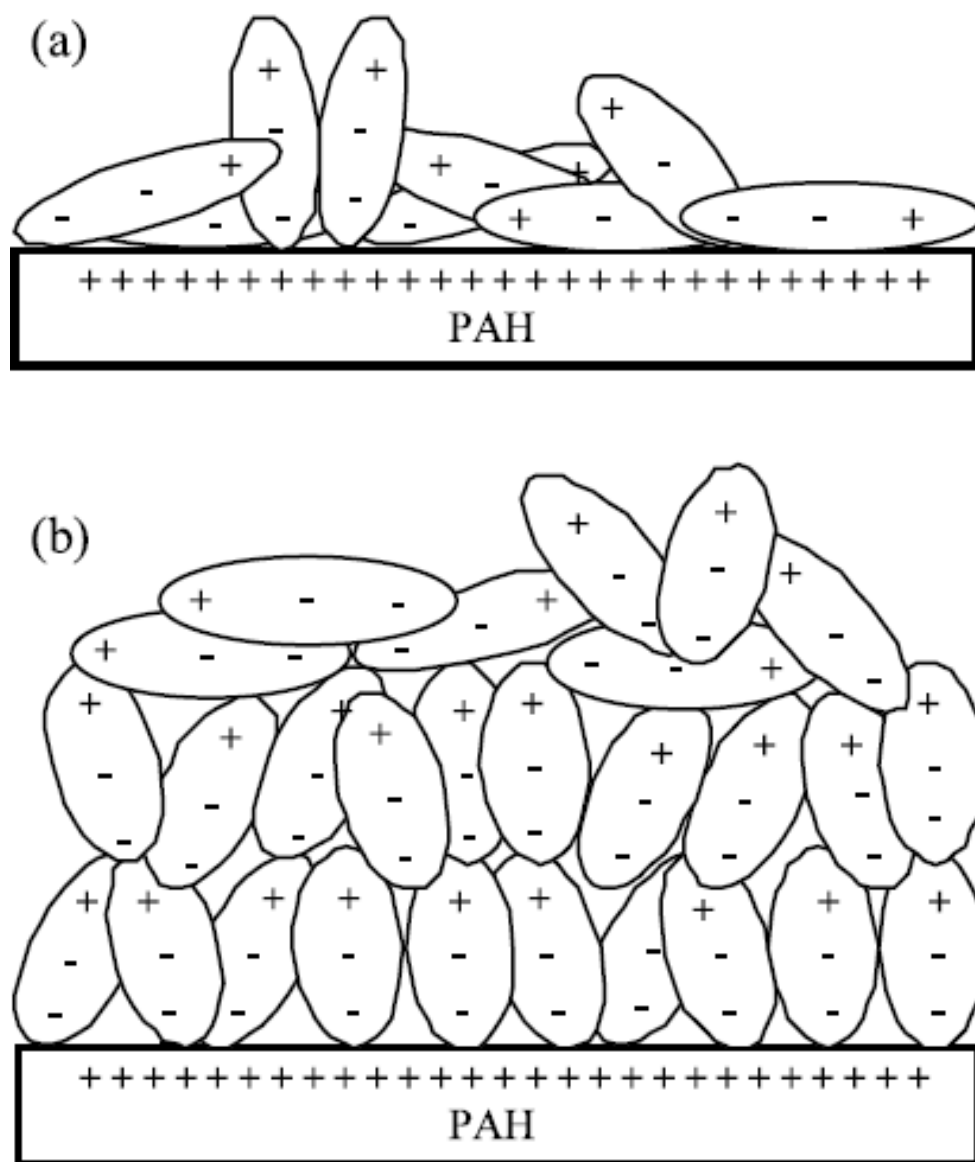


Figura 5.12. Representação esquemática do primeiro processo de construção de camadas de albumina sobre filmes terminando com PAH. (a) Para baixas concentrações de albumina: não ocorre estruturação; (b) para altas concentrações de albumina: as moléculas de albumina adsorvem imediatamente e principalmente na configuração "end-on" nos filmes de polieletrólito. Fonte: Ladam e colaboradores (2002) [191].

Além da técnica de elipsometria a estabilidade dos filmes PEI (HEP/TMC)₅ foi, também, investigada por meio da técnica de QCM-D (Fig. 5.13(A,B,C)). Para isso, após a obtenção dos filmes na microbalança de quartzo à 21 °C, verificou-se a estabilidade dos filmes alternando três variáveis: temperatura, adição de sal e DMEM para os sistemas contendo NaCl. Para os sistemas sem a adição de sal (filmes preparados na ausência de NaCl) foram considerados somente duas variáveis: temperatura e DMEM. Com o aumento da temperatura (37 °C) foi possível verificar um aumento na variação da frequência (Fig. 5.13A-C), sendo o mesmo quase que proporcional quando o sistema é resfriado (21°C). A temperatura do sistema também é um dos fatores que afetam a frequência de ressonância da microbalança de cristal de quartzo. O efeito da temperatura na variação da frequência para medidas em solução pode ser dividido em duas categorias: o primeiro é o efeito da temperatura sobre a frequência de oscilação do cristal; o segundo é o efeito da temperatura na viscosidade do meio [10, 192]. A frequência varia devido ao efeito da temperatura sobre as propriedades do próprio cristal.

Ryu e Free [192], verificaram que a frequência de ressonância aumentou de 12.549,7 para 12.635,3 Hz quando a temperatura foi alterada (24,3 °C para 70,5 °C). Esse aumento de 85,6Hz é equivalente a uma média de 1,85 Hz·°C⁻¹, devido a uma relação linear na faixa entre 24,3 °C e 70,5°C. Este teste foi conduzido sem solução. Dessa forma, o resultado indica que 1,85 Hz·°C⁻¹ é devido ao efeito intrínseco da temperatura sobre a frequência de oscilação do cristal. Avaliando a mudança de temperatura sobre a viscosidade do meio (água pura), os autores observaram que a frequência aumentou 64,2 Hz quando a temperatura foi variada de 23,9 °C para 31,2 °C. Este valor (64,3 Hz) é equivalente a 8,79 Hz·°C⁻¹, que diz respeito à variação natural da frequência de oscilação e à mudança na viscosidade, ambas associadas a mudança da

temperatura. Em suma, a variação na frequência observada em nossos experimentos é devido à oscilação do cristal de quartzo e à mudança de viscosidade do meio com o aumento da temperatura.

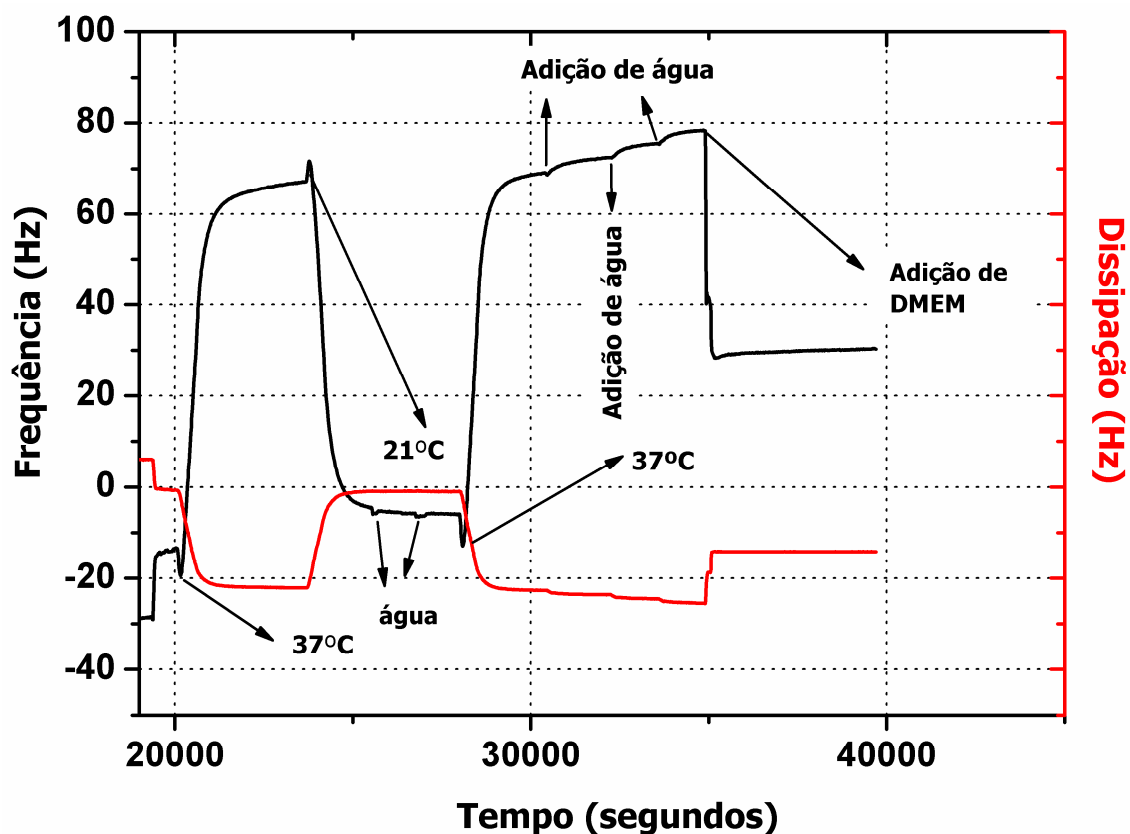


Figura 5.13A. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,0 M NaCl frente ao DMEM.

Após a estabilização do sistema, foi injetada solução salina (Fig. 5.13B-C), verificando um pequeno decréscimo no valor da frequência, o que sugere uma pequena adsorção de sal nos filmes. Após a lavagem foi possível verificar leve aumento nos valores da frequência indicando pequena dessorção de material dos filmes, provavelmente, devido à remoção de sais. Novamente, a temperatura foi aumentada e

com isso ocorreu um aumento nos valores de frequência máxima (devido à frequência de oscilação do cristal e a mudança da viscosidade).

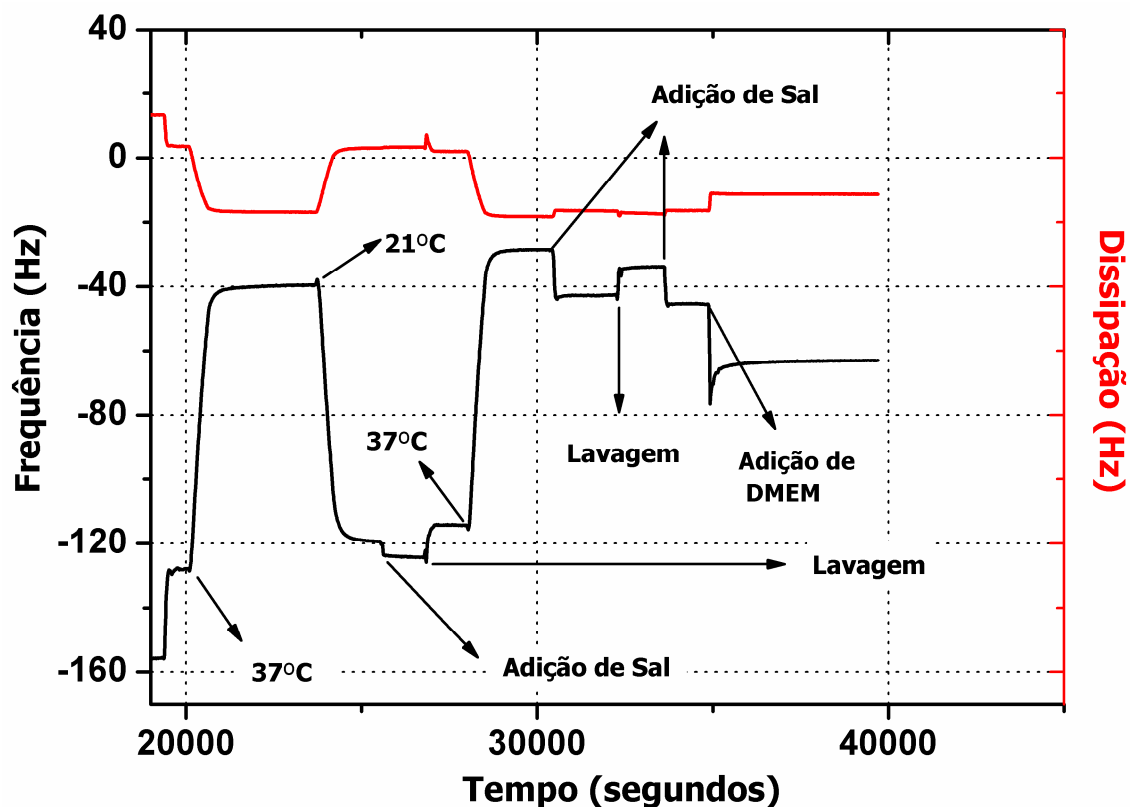


Figura 5.13B. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,15 M NaCl frente ao DMEM.

Com a adição de solução salina há diminuição na variação da frequência, indicando, novamente, que o filme adsorveu NaCl. Após a lavagem, há pequeno aumento na frequência (diminuição de massa), indicando mais uma vez a remoção de sal. Esse procedimento foi realizado mais uma vez, apresentando o mesmo perfil para todos os sistemas. Após este procedimento foi adicionado o DMEM, onde foi possível verificar uma diminuição nos valores de frequência (aumento da massa), sugerindo a adsorção dos componentes do DMEM no filme. Para os filmes de PEI(HEP/TMC)₅ obtidos sem sal (Fig. 5.13A), foi verificada maior adsorção de DMEM sobre a

superfície do filme. Pela análise dos três gráficos verifica-se que a quantidade adsorvida de DMEM aumenta com a diminuição da força iônica.

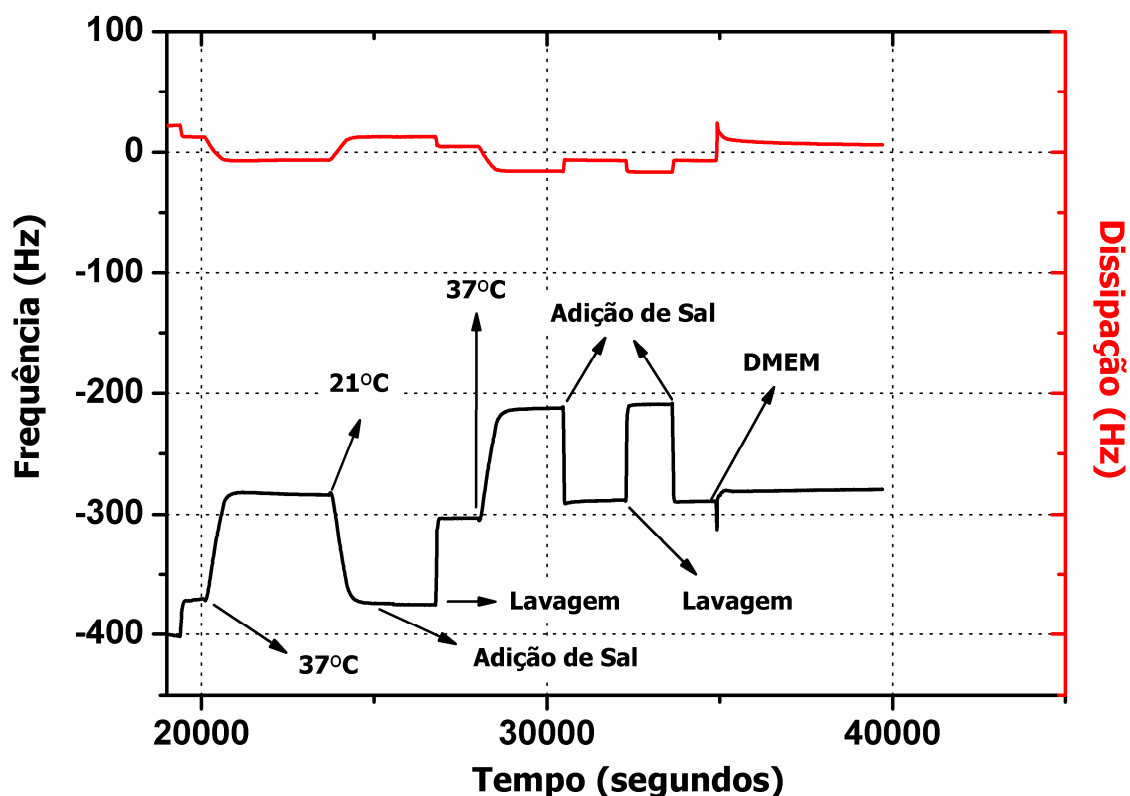


Figura 5.13C. Estudo da estabilidade do sistema PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,5 M NaCl frente ao DMEM.

Isto pode ser explicado pelo efeito da blindagem. Em maiores concentrações de íons cloreto as interações entre os componentes presentes no meio de cultura e o substrato diminuem. Para confirmar que a albumina foi adsorvida sobre os filmes LbL, foi realizado, em paralelo, um experimento em que primeiramente o filme de PEI(HEP/TMC)₅ preparado em 0,15 M de NaCl foi construído sobre o cristal de quartzo e após foi injetada uma solução de albumina (1mg·mL⁻¹, pH 7.4). Após a lavagem e estabilização do sistema foi injetada uma outra solução de albumina (1mg·mL⁻¹, pH 7.4)

contendo 30mM NaCl. Em ambos os casos, os resultados confirmaram a adsorção da proteína sobre o filme LbL.

5.3.6. Ensaio de citotoxicidade

Na Figura 5.14 são apresentadas imagens obtidas por microscopia óptica de uma população de fibroblastos 3T3 em contato com soluções de QT, DMC e TMC, preparadas em pH 6,0 na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, após 24 horas.

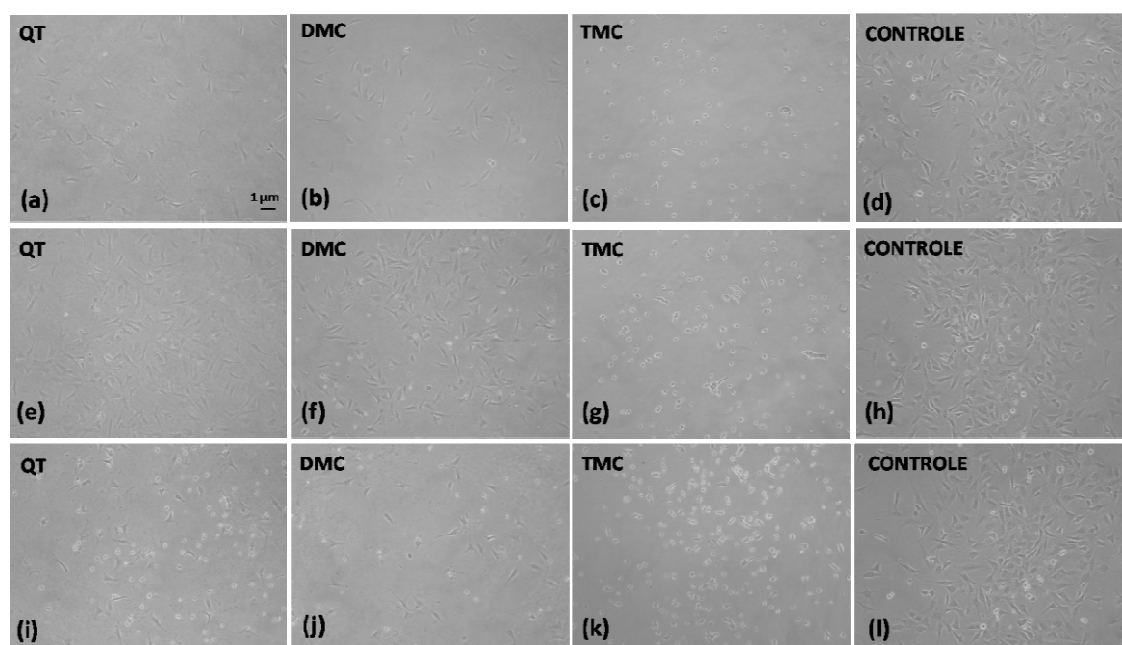


Figura 5.14. Imagens de microscopia óptica dos fibroblastos NIH/3T3 em 0,0 M NaCl (a, b, c, d), 0,15 M NaCl (e, f, g, h) e 0,5 M NaCl (i, j, k, l). Aumento de 100 vezes com filtro azul.

Analisando-se as imagens, pode-se observar que as células não apresentaram mudanças morfológicas quando comparadas ao controle negativo. Isso mostra que os materiais em estudo não exercem efeito citotóxico sobre as células e não liberaram substâncias citotóxicas para o meio de cultura. Todos os materiais, com exceção da

TMC em todas as diferentes concentrações de NaCl, permitiram adesão celular e consequente proliferação, fato este também confirmado pelo ensaio de MTT como mostrado na Figura 5.15, onde a viabilidade celular para as amostras foi maior ou aproximadamente igual ao número inicial de células (1×10^4 células/poço).

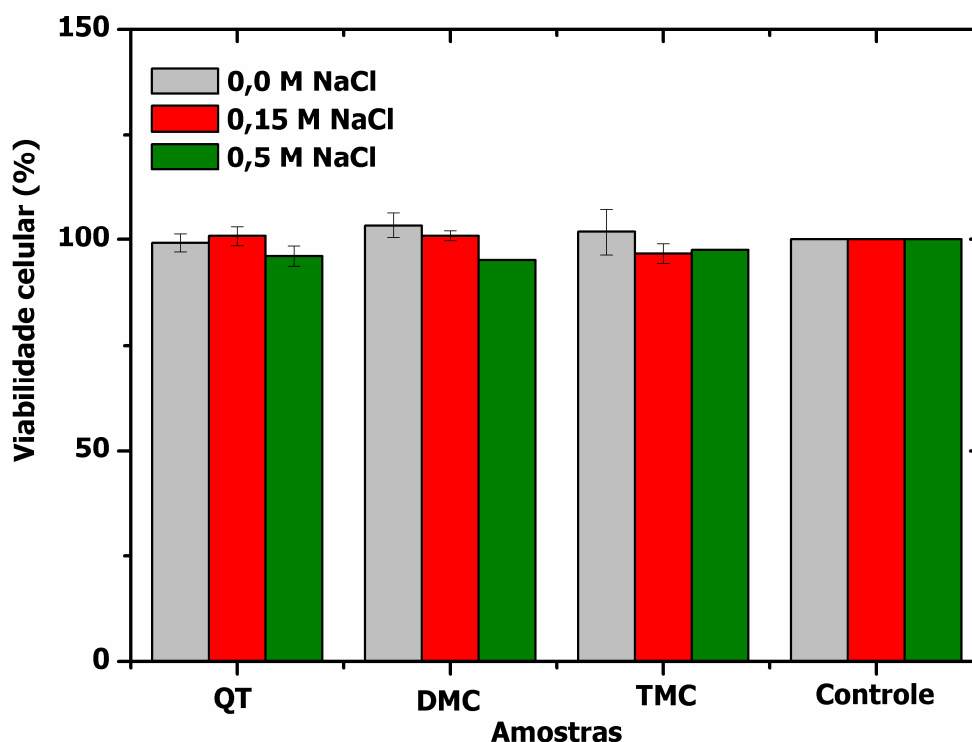


Figura 5.15. Ensaio de citotoxicidade dos materiais em estudo preparados em diferentes concentrações de NaCl.

Ferruti et al. [193] notaram que macromoléculas com grupos amino terciários exibiram menor toxicidade do que aqueles com resíduos primários e secundários. Assim, não apenas o tipo de grupo químico (função amino) mas também a densidade de cargas, resultante do número e do arranjo tridimensional dos resíduos catiônicos, são importantes fatores que determinam a existência ou não de citotoxicidade. Ryser et al. [194] sugeriram ser necessária uma ligação de três pontos para induzir resposta

biológica da superfície sobre as membranas celulares e concluíram que a atividade biológica do polímero diminui quando o espaço entre grupos amino é aumentado. A mudança do arranjo catiônico depende da estrutura tridimensional e da flexibilidade das macromoléculas para determinar a acessibilidade das suas cargas sobre a superfície celular. Moléculas ramificadas são mais eficientes na neutralização das cargas da superfície celular do que polímeros com estruturas lineares ou globulares [195]. Moléculas rígidas têm mais dificuldades de se ligar em membranas se comparadas a moléculas flexíveis [195]. Assim, altas densidades de cargas catiônicas e polímeros altamente flexíveis devem causar maior efeito citotóxico do que aqueles com menor densidade de cargas catiônicas [195].

5.4. Conclusões

A adsorção das multicamadas dos polieletrólitos na superfície do silício pré-tratado foi confirmada pelas técnicas de elipsometria, ângulo de contato, AFM e QCM-Q. A força iônica do meio influenciou nas características finais dos filmes formados (rugosidade, espessura e hidrofiliabilidade). Os sistemas em estudo apresentaram boas propriedades de adesão e proliferação para células NIH/3T3, verificando-se uma maior preferência dessas células pela interface dos filmes preparados pelo método de imersão e sem a adição de NaCl. Foi verificado que a composição, rugosidade e molhabilidade representaram importante influência na adesão e proliferação celular. Os fibroblastos 3T3 exibiram morfologia de fuso e crescimento aleatório sobre a superfície dos materiais. O forte contato celular formado sobre a quitosana e seus derivados é conduzido pela atração eletrostática e alta adsorção de proteína. Os resultados obtidos sugerem que os sistemas em estudo são bons candidatos para uso como dispositivos biomédicos.

Capítulo 6

Considerações Finais

No decorrer da Tese foi mostrada a importância de revestimentos biomédicos preparados com o intuito de melhorar a aplicabilidade e a superfície de resposta de materiais empregados nas áreas clínicas. A técnica "*Layer-by-Layer*" (LbL) de adsorção de polieletrólitos de cargas opostas é um método simples, barato e conveniente para este fim. Quitosana (QT) e seus derivados quando associados à Heparina (HEP), permitem a obtenção de filmes finos biocompatíveis que apresentam propriedades antimicrobianas, antiadesivas, anticoagulantes e capacidade de regeneração tecidual melhoradas, visto que as propriedades individuais de cada polieletrólito são somadas, o que pode ampliar a possibilidade de utilização desses materiais.

Derivados quaternários da QT, as TMCs, foram preparados e purificados a partir de diferentes metodologias. Atualmente, a TMC tem atraído bastante atenção e sendo foco de inúmeras patentes e estudos científicos, pois possui e mesmo supera algumas das boas propriedades observadas na QT. Nesta Tese foram obtidos filmes finos de QT/HEP, DMC/HEP e TMC/HEP onde as propriedades físicas, químicas e biológicas presentes nos sistemas LbL foram investigadas e discutidas. No Capítulo 4 foi verificado que tanto o pH em que os filmes foram preparados quanto o grau de quaternização (GQ) são fatores decisivos para a obtenção de sistemas com características antibacterianas e antiadesivas. Os sistemas estudados neste Capítulo de Tese (Capítulo 4) são bons candidatos para a utilização em revestimentos de dispositivos biomédicos, com o objetivo de evitar a contaminação por microorganismos que aderem a superfície dos dispositivos. No Capítulo 5 o enfoque principal foi verificar

o efeito da N-trimetilação da quitosana sobre a viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3. Os filmes contendo DMC e TMC apresentaram boa adesão e proliferação celular frente aos fibroblastos, ratificando o fato que a N-trimetilação pode melhorar a capacidade de regeneração celular e mostrando mais uma vez que a TMC supera algumas propriedades da QT. Assim, a TMC pode ser usada em implantes biomédicos onde a regeneração tecidual é desejada.

Além das aplicações já citadas, os filmes finos obtidos nesta Tese também apresentam atividade anticoagulante, por sua associação com a HEP. Os ensaios para a avaliação das propriedades anticoagulantes dos filmes de multicamadas LbL (TMC/HEP) estão sendo realizados no Hospital de Genebra (Suíça) pela equipe do Prof. Waltpoth Beat em parceria com o Prof. Gero Decher (Estrasburgo, França). Além dos ensaios com filmes de TMC/HEP, estão sendo realizados testes com filmes finos de TMC/Sulfato de Dextrana. Os resultados tem se mostrado promissores e ambos os tipos de filmes apresentam efeito anticoagulante maior que os filmes contendo QT. Dessa forma, o uso de filmes finos baseados em TMC/HEP ou TMC/Sulfato de Dextrana, apresentam propriedades que os habilitam para serem aplicados para diversos fins biomédicos, tornado-se bons candidatos para o uso em revestimentos de biomateriais. Outra aplicação de sistemas de filmes finos contendo TMC seria a produção de novos curativos para a cura/cicatrização de feridas. Vale ainda ressaltar que o emprego da TMC em sistemas automontados por meio da técnica LbL, pode ser considerado um método "verde" e de baixo custo. De fato, o revestimento de materiais com filmes de derivados da QT pode ajudar a solucionar dois problemas: o primeiro associado à regeneração e cicatrização tecidual no local do trauma onde o material é implantado e, o segundo, associado à contaminação por microorganismos nas superfícies dos biomateriais, durante os procedimentos cirúrgicos.

Capítulo 7

Referências

- [1] Fajardo AR, Piai JF, Rubira AF, Muniz EC. Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80:934-43.
- [2] Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2005;26:7038-45.
- [3] Bairo F, Perero S, Ferraris S, Miola M, Balagna C, Verné E, et al. Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: Overview and future prospects. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:1064-87.
- [4] Kurtz SM, Devine JN. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*. 2007;28:4845-69.
- [5] Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28:5068-73.
- [6] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013;49:780-92.
- [7] Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 2007;8:2533-41.
- [8] Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*. 1997;277:1232-7.

- [9] Channasanon S, Graisuwan W, Kiatkamjornwong S, Hoven VP. Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;316:331-43.
- [10] Decher G, Schlenoff, J.B. *Multilayer Thin Films, Sequential Assembly of Nanocomposite Material*. Alemanha: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co,2002.
- [11] Benediktsdottir BE, Sorensen KK, Thygesen MB, Jensen KJ, Gudjonsson T, Baldursson O, et al. Regioselective fluorescent labeling of N,N,N-trimethyl chitosan via oxime formation. *Carbohydrate Polymers*. 2012;90:1273-80.
- [12] Novello WP, Arruda AC, Santana MH, Moraes AM, Pinho SC. Characterization of coatings for open-heart surgery tubing with heparin and lipid. *Journal of materials science: Materials in medicine*. 1998;9:793-6.
- [13] Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*. 2005;26:6684-92.
- [14] Walenga JM, Bick RL. Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other side effects of heparin therapy. *The Medical clinics of North America*. 1998;82:635-58.
- [15] Badr IH, Gouda M, Abdel-Sattar R, Sayour HE. Reduction of thrombogenicity of PVC-based sodium selective membrane electrodes using heparin-modified chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2014;99:783-90.
- [16] Sun F, Pang X, Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite–chitosan–heparin coatings. *Journal of Materials Processing Technology*. 2009;209:1597-606.

- [17] Ruan Q, Zhu Y, Li F, Xiao J, Zeng Y, Xu F. Investigation of layer-by-layer assembled heparin and chitosan multilayer films via electrochemical spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009;333:725-33.
- [18] Meng S, Liu Z, Shen L, Guo Z, Chou LL, Zhong W, et al. The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials*. 2009;30:2276-83.
- [19] Porcel CH, Izquierdo A, Ball V, Decher G, Voegel JC, Schaaf P. Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying. *Langmuir*. 2005;21:800-2.
- [20] Schönhoff M. Layered polyelectrolyte complexes: physics of formation and molecular properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2003;15:R1781.
- [21] Decher G, Hong J-D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie Macromolecular Symposia*. 1991;46:321-7.
- [22] Sagiv J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1980;102:92-8.
- [23] Picart C, Lavallo P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, et al. Buildup Mechanism for Poly(l-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir*. 2001;17:7414-24.
- [24] Hübsch E, Ball V, Senger B, Decher G, Voegel J-C, Schaaf P. Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures. *Langmuir*. 2004;20:1980-5.

- [25] Salomäki M, Vinokurov IA, Kankare J. Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2005;21:11232-40.
- [26] Yoo PJ, Zacharia NS, Doh J, Nam KT, Belcher AM, Hammond PT. Controlling Surface Mobility in Interdiffusing Polyelectrolyte Multilayers. *ACS Nano*. 2008;2:561-71.
- [27] Salomäki M, Kankare J. Modeling the Growth Processes of Polyelectrolyte Multilayers Using a Quartz Crystal Resonator†. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111:8509-19.
- [28] Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 1999;16:1249-55.
- [29] Laschewsky A, Wischerhoff E, Kauranen M, Persoons A. Polyelectrolyte Multilayer Assemblies Containing Nonlinear Optical Dyes. *Macromolecules*. 1997;30:8304-9.
- [30] He Y, Gong S, Hattori R, Kanicki J. High performance organic polymer light-emitting heterostructure devices. *Applied Physics Letters*. 1999;74:2265-7.
- [31] Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM, Rubner MF. Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2000;16:5017-23.
- [32] Zhang X, Shen J. Self-Assembled Ultrathin Films: From Layered Nanoarchitectures to Functional Assemblies. *Advanced Materials*. 1999;11:1139-43.
- [33] Cho J, Char K, Hong JD, Lee KB. Fabrication of Highly Ordered Multilayer Films Using a Spin Self-Assembly Method. *Advanced Materials*. 2001;13:1076-8.
- [34] de Mesquita JP, Patricio PS, Donnici CL, Petri DFS, de Oliveira LCA, Pereira FV. Hybrid layer-by-layer assembly based on animal and vegetable structural materials:

multilayered films of collagen and cellulose nanowhiskers. *Journal of Soft Matter*. 2011;7:4405-13.

[35] Davi CP, Galdino LFMD, Borelli P, Oliveira ON, Ferreira M. Natural rubber latex LbL films: Characterization and growth of fibroblasts. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;125:2137-47.

[36] Geraldo VP, Moraes ML, Zucolotto V, Oliveira ON. Immobilization of ibuprofen-containing nanospheres in layer-by-layer films. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2011;11:1167-74.

[37] Follmann HD, Martins AF, Gerola AP, Burgo TA, Nakamura CV, Rubira AF, et al. Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes. *Biomacromolecules*. 2012;13:3711-22.

[38] Schlenoff JB, Dubas ST, Farhat T. Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2000;16:9968-9.

[39] Izquierdo A, Ono SS, Voegel JC, Schaaf P, Decher G. Dipping versus Spraying: Exploring the Deposition Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir*. 2005;21:7558-67.

[40] Félix O, Zheng Z, Cousin F, Decher G. Are sprayed LbL-films stratified? A first assessment of the nanostructure of spray-assembled multilayers by neutron reflectometry. *Comptes Rendus Chimie*. 2009;12:225-34.

[41] Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Ball V, Ogier J, Senger B, Picart C, et al. Polyelectrolyte Multilayer Films – A General Approach to (Bio)functional Coatings. *Macromolecular Engineering: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2007. p. 1249-305.

- [42] Witt MA. Obtenção e caracterização de filmes finos de multicamadas de polieletrólitos naturais depositados por Layer-by-Layer. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); 2012.
- [43] Chiarelli PA, Johal MS, Casson JL, Roberts JB, Robinson JM, Wang HL. Controlled Fabrication of Polyelectrolyte Multilayer Thin Films Using Spin-Assembly. *Advanced Materials*. 2001;13:1167-71.
- [44] Lee S-S, Hong J-D, Kim CH, Kim K, Koo JP, Lee K-B. Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method. *Macromolecules*. 2001;34:5358-60.
- [45] Kosaka PM. Aplicações e caracterização de esteres de cellulose. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP); 2007.
- [46] Yang P-F, Lee C-K. Hyaluronic acid interaction with chitosan-conjugated magnetite particles and its purification. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;33:284-9.
- [47] Li X, Xie H, Lin J, Xie W, Ma X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*. 2009;94:1-6.
- [48] Rosca C, Popa MI, Lisa G, Chitanu GC. Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan–carboxymethylcellulose complex. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62:35-41.
- [49] Sandford PA. Chitosan: commercial uses and potential application. In: G Skajah, T Anthonsen, P Sandford (editors), *chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, pages 51-69 Elsevier, New York, . 1988.
- [50] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications.

European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2004;57:35-52.

[51] Argin-Soysal S, Kofinas P, Lo YM. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. Food Hydrocolloids. 2009;23:202-9.

[52] Pavinatto FJ, Caseli L, Oliveira ON. Chitosan in Nanostructured Thin Films. Biomacromolecules. 2010;11:1897-908.

[53] Zhao Q-Q, Chen J-L, Lv T-F, He C-X, Tang G-P, Liang W-Q, et al. N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2009;32:706-10.

[54] Toh EK-W, Chen H-Y, Lo Y-L, Huang S-J, Wang L-F. Succinated chitosan as a gene carrier for improved chitosan solubility and gene transfection. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2011;7:174-83.

[55] Alatorre-Meda M, Taboada P, Hartl F, Wagner T, Freis M, Rodríguez JR. The influence of chitosan valence on the complexation and transfection of DNA: The weaker the DNA–chitosan binding the higher the transfection efficiency. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011;82:54-62.

[56] Kim I-Y, Seo S-J, Moon H-S, Yoo M-K, Park I-Y, Kim B-C, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnology Advances. 2008;26:1-21.

[57] Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydrate Polymers. 2009;76:167-82.

[58] Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. Chemical Reviews. 2004;104:6017-84.

- [59] Siqueira Jr JR, Caseli L, Crespilho FN, Zucolotto V, Oliveira Jr ON. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;25:1254-63.
- [60] Denuziere A, Ferrier D, Damour O, Domard A. Chitosan–chondroitin sulfate and chitosan–hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*. 1998;19:1275-85.
- [61] Yang Y, He Q, Duan L, Cui Y, Li J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*. 2007;28:3083-90.
- [62] Ito H, Shibata T, Miyamoto T, Noishiki Y, Inagaki H. Formation of polyelectrolyte complexes between cellulose derivatives and their blood compatibility. *Journal of Applied Polymer Science*. 1986;31:2491-500.
- [63] Dutkiewicz J, Tuora, M. New forms of chitosan polyelectrolyte complexes, *Advances in Chitin and Chitosan*. In: Proc of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan, held in Princeton, NJ, USA, Elsevier Applied Science, London (October 1992):496.
- [64] Mireles CM, M.; Bouzas, J.; Tortes, J.A. Complex formation of chitosan and naturally occurring polyanions, *Advances in Chitin and Chitosan*. In: Proc of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan, held in Princeton, NJ, USA, Elsevier Applied Science, London (October 1992):506.
- [65] Piai JF, Rubira AF, Muniz EC. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:2601-9.
- [66] Fajardo AR. Caracterização de complexos polietrolíticos de quitosana /sulfato de condroitina em diferentes condições de pH e tempo de imersão. Maringá: Universidade Estadual de Maringá (UEM); 2009.

- [67] Fajardo AR, Lopes LC, Caleare AO, Britta EA, Nakamura CV, Rubira AF, et al. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33:588-95.
- [68] Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, et al. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;35:435-41.
- [69] Zemaitaitiene RJ, Zliobaite E, Klimaviciute R, Zemaitaitis A. The role of anionic substances in removal of textile dyes from solutions using cationic flocculant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003;214:37-47.
- [70] Nyström RS, Rosenholm JB, Nurmi K. Flocculation of Semidilute Calcite Dispersions Induced by Anionic Sodium Polyacrylate–Cationic Starch Complexes. *Langmuir*. 2003;19:3981-6.
- [71] Petzold G, Nebel A, Buchhammer HM, Lunkwitz K. Preparation and characterization of different polyelectrolyte complexes and their application as flocculants. *Colloid and Polymer Science*. 1998;276:125-30.
- [72] Serizawa T, Yamaguchi M, Kishida A, Akashi M. Alternating gene expression in fibroblasts adhering to multilayers of chitosan and dextran sulfate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;67A:1060-3.
- [73] Zhu AP, Ming Z, Jian S. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft. *Applied Surface Science*. 2005;241:485-92.
- [74] Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*. 2005;26:6684-92.

- [75] Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Tabrizian M. Nanocoatings onto Arteries via Layer-by-Layer Deposition: Toward the in Vivo Repair of Damaged Blood Vessels. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125:7494-5.
- [76] Richert L, Lavalle P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz J-F, et al. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir*. 2003;20:448-58.
- [77] Zhu Y, Gao C, He T, Liu X, Shen J. Layer-by-Layer Assembly To Modify Poly(l-lactic acid) Surface toward Improving Its Cytocompatibility to Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules*. 2003;4:446-52.
- [78] Liu Y, He T, Gao C. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005;46:117-26.
- [79] Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*. 2005;26:5960-71.
- [80] Chen Q, Han J, Shi H, Wu B, Xu X, Osa T. Use of Chitosan for Developing Layer-by-Layer Multilayer Thin Films Containing Glucose Oxidase for Biosensor Applications. *Sensor Letters*. 2004;2:102-5.
- [81] Martins AF, Pereira AGB, Fajardo AR, Rubira AF, Muniz EC. Characterization of polyelectrolytes complexes based on N,N,N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86:1266-72.
- [82] Sieval AB, Thanou M, Kotze' AF, Verhoef JC, Brussee J, Junginger HE. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*. 1998;36:157-65.

- [83] Kim C, Choi J, Chun H, Choi K. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polymer Bulletin*. 1997;38:387-93.
- [84] Domard A, Rinaudo M, Terrassin C. New method for the quaternization of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1986;8:105-7.
- [85] de Britto D, Assis OBG. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2007;69:305-10.
- [86] Rúnarsson ÖV, Holappa J, Jónsdóttir S, Steinsson H, Másson M. N-selective 'one pot' synthesis of highly N-substituted trimethyl chitosan (TMC). *Carbohydrate Polymers*. 2008;74:740-4.
- [87] Xu T, Xin M, Li M, Huang H, Zhou S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 2010;81:931-6.
- [88] Verheul RJ, Amidi M, van der Wal S, van Riet E, Jiskoot W, Hennink WE. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. *Biomaterials*. 2008;29:3642-9.
- [89] Muzzarelli RAA, Tanfani F. The N-permethylation of chitosan and the preparation of N-trimethyl chitosan iodide. *Carbohydrate Polymers*. 1985;5:297-307.
- [90] Jia Z, shen D, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*. 2001;333:1-6.
- [91] Guo Z, Xing R, Liu S, Zhong Z, Ji X, Wang L, et al. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*. 2007;342:1329-32.
- [92] Rúnarsson ÖV, Holappa J, Nevalainen T, Hjálmarsdóttir M, Järvinen T, Loftsson T, et al. Antibacterial activity of methylated chitosan and chito oligomer derivatives:

Synthesis and structure activity relationships. *European Polymer Journal*. 2007;43:2660-71.

[93] Sayin B, Somavarapu S, Li XW, Thanou M, Sesardic D, Alpar HO, et al. Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2008;363:139-48.

[94] Kotze AF, Luessen HL, de Leeuw BJ, de Boer BG, Verhoef JC, Junginger HE. N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical research*. 1997;14:1197-202.

[95] Polnok A, Borchard G, Verhoef JC, Sarisuta N, Junginger HE. Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57:77-83.

[96] Snyman D, Hamman JH, Kotze AF. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of N-Trimethyl Chitosan Chloride. *Drug development and industrial pharmacy*. 2003;29:61-9.

[97] Sandri G, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Zambito Y, Colo GD, et al. Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule. *International journal of pharmaceutics*. 2005;297:146-55.

[98] Thanou MM, Verhoef JC, Romeijn SG, Nagelkerke JF, Merkus FWHM, Junginger HE. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International journal of pharmaceutics*. 1999;185:73-82.

- [99] Amidi M, Romeijn SG, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*. 2006;111:107-16.
- [100] Florea BI, Thanou M, Junginger HE, Borchard G. Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *Journal of Controlled Release*. 2006;110:353-61.
- [101] Mao S, Shuai X, Unger F, Wittmar M, Xie X, Kissel T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials*. 2005;26:6343-56.
- [102] Kean T, Roth S, Thanou M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 2005;103:643-53.
- [103] Jintapattanakit A, Mao S, Kissel T, Junyaprasert VB. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70:563-71.
- [104] Dung PI, Milas M, Rinaudo M, Desbrières J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 1994;24:209-14.
- [105] Hamman JH, Stander M, Kotzé AF. Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. *International journal of pharmaceutics*. 2002;232:235-42.
- [106] Di Colo G, Burgalassi S, Zambito Y, Monti D, Chetoni P. Effects of different N-trimethyl chitosans on in vitro/in vivo ofloxacin transcorneal permeation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93:2851-62.

- [107] Boonyo W, Junginger HE, Waranuch N, Polnok A, Pitaksuteepong T. Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. *Journal of Controlled Release*. 2007;121:168-75.
- [108] Linhardt RJ. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46:2551-64.
- [109] Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2002;41:391-412.
- [110] Freedman MD. Pharmacodynamics, clinical indications, and adverse effects of heparin. *Journal of clinical pharmacology*. 1992;32:584-96.
- [111] Xu Y, Masuko S, Takieddin M, Xu H, Liu R, Jing J, et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins. *Science*. 2011;334:498-501.
- [112] Sasisekharan R SZ, Venkataraman G, Narayanasami U. . Roles of heparan–sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:521-8.
- [113] Norrby K, Ostergaard P. Basic-fibroblast-growth-factor-mediated de novo angiogenesis is more effectively suppressed by low-molecular-weight than by high-molecular-weight heparin. *International journal of microcirculation, clinical and experimental/sponsored by the European Society for Microcirculation*. 1996;16:8-15.
- [114] Lee JH, Lee H, Joung YK, Jung KH, Choi JH, Lee DH, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Biomaterials*. 2011;32:1438-45.
- [115] Liang Y, Kiick KL. Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*. 2013.

- [116] Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U. Heparan sulfate: a piece of information. The FASEB Journal. 1996;10:1270-9.
- [117] Ishihara M, Ono K, author_in_Japanese, author_in_Japanese. Structure and Function of Heparin and Heparan Sulfate; Heparinoid Library and Modification of FGF-Activities. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 1998;10:223-33.
- [118] Boddohi S, Moore N, Johnson PA, Kipper MJ. Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Chitosan, Heparin, and Hyaluronan. Biomacromolecules. 2009;10:1402-9.
- [119] Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. Journal of cellular physiology. 1986;128:475-84.
- [120] Kharkar PM, Kiick KL, Kloxin AM. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. Chemical Society reviews. 2013;42:7335-72.
- [121] Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. Chest. 2001;119:64s-94s.
- [122] Oyarzun-Ampuero FA, Brea J, Loza MI, Torres D, Alonso MJ. Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. International journal of pharmaceutics. 2009;381:122-9.
- [123] Lin Y-H, Chang C-H, Wu Y-S, Hsu Y-M, Chiou S-F, Chen Y-J. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy. Biomaterials. 2009;30:3332-42.
- [124] Baldwin AD, Robinson KG, Militar JL, Derby CD, Kiick KL, Akins RE, Jr. In situ crosslinkable heparin-containing poly(ethylene glycol) hydrogels for sustained

anticoagulant release. Journal of biomedical materials research Part A. 2012;100:2106-18.

[125] Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. Biomaterials. 2007;28:1123-31.

[126] Fujita M, Ishihara M, Simizu M, Obara K, Ishizuka T, Saito Y, et al. Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel. Biomaterials. 2004;25:699-706.

[127] Li J, Lin F, Li L, Li J, Liu S. Surface Engineering of Poly(ethylene terephthalate) for Durable Hemocompatibility via a Surface Interpenetrating Network Technique. Macromolecular Chemistry and Physics. 2012;213:2120-9.

[128] Hudalla GA, Koepsel JT, Murphy WL. Surfaces That Sequester Serum-Borne Heparin Amplify Growth Factor Activity. Advanced Materials. 2011;23:5415-8.

[129] Martins A, Piai J, Schuquel IA, Rubira A, Muniz E. Polyelectrolyte complexes of chitosan/heparin and N,N,N-trimethyl chitosan/heparin obtained at different pH: I. Preparation, characterization, and controlled release of heparin. Colloid and Polymer Science. 2011;289:1133-44.

[130] Schroeck F, Arroyo de Prada N, Sperl S, Schmitt M, Viktor M. Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn. Biological chemistry. 2002;383:1143-9.

[131] Gibson AD, Lamerdin JA, Zhuang P, Baburaj K, Serpersu EH, Peterson CB. Orientation of heparin-binding sites in native vitronectin. Analyses of ligand binding to the primary glycosaminoglycan-binding site indicate that putative secondary sites are not functional. Journal of Biological Chemistry. 1999;274:6432-42.

- [132] Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, Ehrhardt J, Greinacher A, Zygmunt M. The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 2011;17:354-9.
- [133] Oliviero O, Ventre M, Netti PA. Functional porous hydrogels to study angiogenesis under the effect of controlled release of vascular endothelial growth factor. *Acta Biomaterialia*. 2012;8:3294-301.
- [134] Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Enzymatic Hydrolysis of a Layer-by-Layer Assembly Prepared from Chitosan and Dextran Sulfate. *Macromolecules*. 2002;35:8656-8.
- [135] Subbiah R, Ramalingam P, Ramasundaram S, Kim DY, Park K, Ramasamy MK, et al. N,N,N-Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89:1289-97.
- [136] Martins AF, Bueno PVA, Almeida EAMS, Rodrigues FHA, Rubira AF, Muniz EC. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;57:174-84.
- [137] Hamman JH, Kotze AF. Effect of the type of base and number of reaction steps on the degree of quaternization and molecular weight of N-trimethyl chitosan chloride. *Drug development and industrial pharmacy*. 2001;27:373-80.
- [138] de Britto D, Forato LA, Assis OBG. Determination of the average degree of quaternization of N,N,N-trimethylchitosan by solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers*. 2008;74:86-91.
- [139] Curti E, Campana-Filho SP. Viscosity Behavior of Chitosan and N, N, N-Trimethylchitosan Chloride Salts in Acid-Free Aqueous Solution. *Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2006;43:555-72.

- [140] Xu T, Xin M, Li M, Huang H, Zhou S, Liu J. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2011;346:2445-50.
- [141] Yen M-T, Mau J-L. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology*. 2007;40:472-9.
- [142] Harish Prashanth KV, Kittur FS, Tharanathan RN. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2002;50:27-33.
- [143] Nazar H, Fatouros DG, van der Merwe SM, Bouropoulos N, Avgouropoulos G, Tsibouklis J, et al. Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2011;77:225-32.
- [144] Martins AF, Bueno PV, Almeida EA, Rodrigues FH, Rubira AF, Muniz EC. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;57:174-84.
- [145] van der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JHM, Kotzé AF, Junginger HE. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;58:225-35.
- [146] Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:1640-65.
- [147] Sahni JK, Chopra S, Ahmad FJ, Khar RK. Potential prospects of chitosan derivative trimethyl chitosan chloride (TMC) as a polymeric absorption enhancer:

synthesis, characterization and applications. The Journal of pharmacy and pharmacology. 2008;60:1111-9.

[148] Sajomsang W, Gonil P, Ruktanonchai UR, Pimpha N, Sramala I, Nuchuchua O, et al. Self-aggregates formation and mucoadhesive property of water-soluble beta-cyclodextrin grafted with chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 2011;48:589-95.

[149] Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. Carbohydrate Polymers. 2008;74:813-21.

[150] Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001;52:117-26.

[151] Jintapattanakit A, Junyaprasert VB, Mao S, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: a comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. International journal of pharmaceutics. 2007;342:240-9.

[152] Kweon DK, Song SB, Park YY. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. Biomaterials. 2003;24:1595-601.

[153] Cavallaro G, Cucina A, Randone B, Polistena A, Mosiello G, Coluccia P, et al. TIMP-2 modulates neointimal formation in experimental ePTFE arterial grafts. The Journal of surgical research. 2007;137:122-9.

[154] Almodovar J, Place LW, Gogolski J, Erickson K, Kipper MJ. Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers: a spectroscopic study of hydrophilicity, composition, and ion pairing. Biomacromolecules. 2011;12:2755-65.

- [155] Lvov Y, Decher G, Moehwald H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir*. 1993;9:481-6.
- [156] Curti PS, De Moura MR, Radovanovic E, Rubira AF, Muniz EC, Moliterno RA. Surface modification of polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of materials science Materials in medicine*. 2002;13:1175-80.
- [157] SOUZA W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica 1998.
- [158] Botan R, Nogueira TR, Lona LMF, Wypych F. Síntese e caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno: Hidróxido Duplo Lamelar via polimerização in situ. *Polímeros*. 2011;21:34-8.
- [159] Adamsom AW. *Physical Chemistry of Surfaces*. Canada: Copyright, 6 edição 1997.
- [160] Burgo TA, Silva CA, Balestrin LB, Galembeck F. Friction coefficient dependence on electrostatic tribocharging. *Scientific reports*. 2013;3:2384.
- [161] Kenawy E-R, Worley SD, Broughton R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules*. 2007;8:1359-84.
- [162] Martins AF. Preparo, caracterização e aplicação de materiais poliméricos a base de quitosana e N,N,N-trimetilquitosana. . Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2012.
- [163] Sadeghi AMM, Amini M, Avadi MR, Siedi F, Rafiee-Tehrani M, Junginger HE. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Effects of Trimethylated and Triethylated

6-NH2-6-Deoxy Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2008;23:262-75.

[164] Zhou ZD, Li GY, Li YJ. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47:21-6.

[165] Zhu AP, Fang N. Adhesion dynamics, morphology, and organization of 3T3 fibroblast on chitosan and its derivative: the effect of O-carboxymethylation. *Biomacromolecules*. 2005;6:2607-14.

[166] Mourya VK, Inamdar NN. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2009;20:1057-79.

[167] Mi F-L, Wu Y-Y, Lin Y-H, Sonaje K, Ho Y-C, Chen C-T, et al. Oral Delivery of Peptide Drugs Using Nanoparticles Self-Assembled by Poly(γ -glutamic acid) and a Chitosan Derivative Functionalized by Trimethylation. *Bioconjugate Chemistry*. 2008;19:1248-55.

[168] Mao Z, Ma L, Jiang Y, Yan M, Gao C, Shen J. N,N,N-Trimethylchitosan Chloride as a Gene Vector: Synthesis and Application. *Macromolecular bioscience*. 2007;7:855-63.

[169] Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications. Canada, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

[170] Casarano R, Bentini R, Bueno VB, Iacovella T, Monteiro FBF, Iha FAS, et al. Enhanced fibroblast adhesion and proliferation on electrospun fibers obtained from poly(isosorbide succinate-b-l-lactide) block copolymers. *Polymer*. 2009;50:6218-27.

[171] Leroy P, Devau N, Revil A, Bizi M. Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of amorphous silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013;410:81-93.

- [172] Zhu JH, Zhang B, Fang WW, Lao XJ, Yu H. Characterization of amphoteric multilayered thin films by means of zeta potential measurements. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2005;43:1-6.
- [173] Carneiro-da-Cunha MG, Cerqueira MA, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*. 2011;85:522-8.
- [174] McAloney RA, Sinyor M, Dudnik V, Goh MC. Atomic Force Microscopy Studies of Salt Effects on Polyelectrolyte Multilayer Film Morphology. *Langmuir*. 2001;17:6655-63.
- [175] Büscher K, Graf K, Ahrens H, Helm CA. Influence of Adsorption Conditions on the Structure of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2002;18:3585-91.
- [176] Tan HL, McMurdo MJ, Pan G, Van Patten PG. Temperature Dependence of Polyelectrolyte Multilayer Assembly. *Langmuir*. 2003;19:9311-4.
- [177] Shiratori SS, Rubner MF. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*. 2000;33:4213-9.
- [178] Schoeler B, Poptoshev E, Caruso F. Growth of Multilayer Films of Fixed and Variable Charge Density Polyelectrolytes: Effect of Mutual Charge and Secondary Interactions. *Macromolecules*. 2003;36:5258-64.
- [179] Schoeler B, Kumaraswamy G, Caruso F. Investigation of the Influence of Polyelectrolyte Charge Density on the Growth of Multilayer Thin Films Prepared by the Layer-by-Layer Technique. *Macromolecules*. 2001;35:889-97.
- [180] Yoo D, Shiratori SS, Rubner MF. Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*. 1998;31:4309-18.

- [181] Witt MA, Valenga F, Blell R, Dotto ME, Bechtold IH, Felix O, et al. Layer-by-layer assembled films composed of "charge matched" and "length matched" polysaccharides: self-patterning and unexpected effects of the degree of polymerization. *Biointerphases*. 2012;7:64.
- [182] Piovesan E, Hidalgo ÁA, Marletta A, Vega ML, Ruggiero R. Influência da espessura nas propriedades de absorção e emissão e na morfologia de filmes automontados de poli(p-fenileno vinileno). *Química Nova*. 2006;29:916-21.
- [183] Fogel R, Mashazi P, Nyokong T, Limson J. Critical assessment of the Quartz Crystal Microbalance with Dissipation as an analytical tool for biosensor development and fundamental studies: Metallophthalocyanine-glucose oxidase biocomposite sensors. *Biosensors & bioelectronics*. 2007;23:95-101.
- [184] Liu G, Zhao J, Sun Q, Zhang G. Role of chain interpenetration in layer-by-layer deposition of polyelectrolytes. *The journal of physical chemistry B*. 2008;112:3333-8.
- [185] Nilsson S, Björefors F, Robinson ND. Electrochemical quartz crystal microbalance study of polyelectrolyte film growth under anodic conditions. *Applied Surface Science*. 2013;280:783-90.
- [186] SAUERBREY G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys. A – Hadron. Nucl., New York.* 206-222Fev. 1959.
- [187] Boujday S, Methivier C, Beccard B, Pradier CM. Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: comparing the efficiency of Fourier transform-surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation-reflection absorption infrared spectroscopy. *Analytical biochemistry*. 2009;387:194-201.

- [188] Tezcaner A, Bugra K, Hasirci V. Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. *Biomaterials*. 2003;24:4573-83.
- [189] Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. *Biomaterials*. 2003;24:3725-30.
- [190] Schlenoff JB, Dubas ST. Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution. *Macromolecules*. 2001;34:592-8.
- [191] Ladam G, Schaaf P, Decher G, Voegel J-C, Cuisinier FJG. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Biomolecular Engineering*. 2002;19:273-80.
- [192] Ryu DY, Free ML. The importance of temperature and viscosity effects for surfactant adsorption measurements made using the electrochemical quartz crystal microbalance. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003;264:402-6.
- [193] Ferruti PK, S.; Ranucci, E.; Gianasi, E. A novel chemical modification of poly-L-lysine reducing toxicity while preserving cationic properties. *ProcIntSymp Controlled Release of Bioactive Materials*. 1997;24:45-6.
- [194] Ryser HJ. A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. *Nature*. 1967;215:934-6.
- [195] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 2003;24:1121-31.