



Desenvolvimento de recobrimentos via *Layer-by-Layer spin coating* a base de polímeros visando a captura de células tumorais.

Autores: Bruno S. Leão, João B. M. R. Neto e Rogério A. Bataglioli.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu.

Introdução

Nas últimas décadas, a técnica *Layer-by-layer* (LbL) vem se consolidando, em virtude de sua simplicidade e versatilidade, como uma eficiente ferramenta de funcionalização de superfícies de tamanho e geometria variadas [1, 2]. Depositando alternadamente camadas de polieletrólitos de cargas opostas, como exibido na Figura 1, é possível a obtenção de um controle rigoroso sobre a funcionalidade, composição e propriedades dos materiais produzidos [2, 3], o que é de fundamental importância no desenvolvimento de recobrimentos nanoestruturados. Nesse contexto, o Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Unicamp possui vasta experiência na utilização da técnica LbL para produção de recobrimentos poliméricos multicamadas.

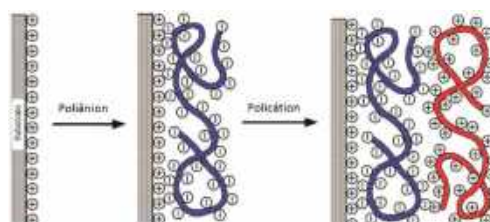


Figura 1: Etapas para a formação de 1 bicamada no processo de *Layer-by-Layer*. Adaptado de Decher (1997).

A versatilidade da técnica LbL incentivou o desenvolvimento de diferentes metodologias para sua realização, que resultam em diferentes características e propriedades nos recobrimentos formados. Em todos os casos, o substrato é repetidamente exposto a meios contendo as espécies que se deseja adsorver, o que torna a técnica demorada e exaustiva caso feita manualmente [4]. Dessa forma, nos últimos anos, a introdução de sistemas automatizados nesta área passou a ser cada vez mais frequente, como as contribuições feitas por Vozar et al. (2009) e Krogman et al. (2007). Assim, os pesquisadores são dispensados de realizarem tarefas repetitivas, podendo monitorar os experimentos e tratar os dados obtidos, o que vem se tornando cada vez mais comum desde que a robótica foi introduzida nos laboratórios clínicos em 1980 [6].

Portanto, optou-se por direcionar o presente projeto para a construção de um sistema automatizado voltado à realização do LbL no LEQUIP, promovendo maiores benefícios ao grupo. O intuito é diminuir o tempo de formação dos filmes, possibilitar maior volume de produção de recobrimentos com características diferentes de forma paralela, bem como aumentar a reprodutibilidade dos filmes.

Com o aparelho utilizado neste projeto, é possível construir recobrimentos em placas de poços, sendo cada um deles formado em uma condição diferente. Isso aumenta exponencialmente a capacidade de se realizar *screening* de materiais para inúmeras aplicações. Como comparação, a atual técnica de LbL *dipping* utilizada no LEQUIP é capaz de desenvolver somente 4 filmes por batelada, com as mesmas condições para



todos os casos. Por outro lado, através do desenvolvimento da técnica aqui proposta, é possível formar 96 filmes em condições diferentes, em uma placa de 96 poços, em um intervalo de tempo semelhante. Um possível exemplo do ganho desta técnica seria a maior facilidade e enorme economia de tempo durante o *screening* para definir as melhores condições de adesão celular em uma superfície recoberta.

É importante ressaltar que o presente projeto foi cancelado no dia 29/02/2020 para, então, migrar para uma bolsa FAPESP. Portanto, as atividades aqui descritas compreendem o período até esta data, que foi suficiente para desenvolver um sistema que produz 8 filmes diferentes simultaneamente.

Materiais e Métodos

Para promover a automação da técnica de LbL, foi realizada a compra do pipetador automático OT-2 da empresa Opentrons, que é comandado por scripts em Python. Este robô conta com 2 pipetas, uma com espaço para 1 ponteira e a outra com espaço para 8, que são acionadas e movimentadas por um braço mecânico, assim como mostrado na Figura 2.

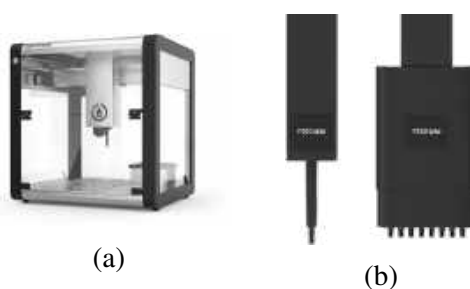


Figura 2: Imagens do pipetador automático (a) e das pipetas de 1 e 8 canais (b) da marca Opentrons.

Os recobrimentos foram produzidos em uma coluna de uma placa de 96 poços de poliestireno cristal virgem (GPPS) da marca Kasvi, estabelecendo um gradiente de bicamadas. As placas que abrigaram as soluções e as que serviram de descarte são de 12 poços. Primeiramente, o fundo dos poços foi recoberto com uma solução de poli(etilenoimina) (PEI, 1 g/L) em pH $4,0 \pm 0,1$ e 0,1 M de NaCl e, então, foram construídos os filmes de quitosana (CHI, 1 g/L) e ácido hialurônico (HA, 1 g/L), ambas em pH $3,0 \pm 0,1$. Posteriormente, uma espectroscopia de UV-visível foi realizada para confirmar a existência de filme em um leitor de placas Varioskan LUX Multimode Microplate Reader. Para tal, foi feita a incorporação de Azul de Alciano a 0,001 M e pH $7,0 \pm 0,1$.

Para iniciar a escrita do código, foi importado o módulo Opentrons, que contém todas as funções que controlam o robô e que declaram os materiais laboratoriais. Em seguida, foram nomeadas as colunas que abrigariam a solução de PEI, sua respectiva água de lavagem, a solução de ácido hialurônico, a solução de quitosana, a água de lavagem do ácido hialurônico e a água de lavagem da quitosana como, respectivamente, PEI, Water_PEI, Poly1, Poly2, Water1 e Water2. O volume de solução polimérica a ser adicionado em cada pipetada (vol_pol), o volume de água (vol_wash), o tempo de adsorção dos polímeros (ads_time), o tempo de lavagem (wash_time) e o número de bicamadas (n_bilayers) receberam, respectivamente, os valores de 50 μL , 200 μL , 300 s, 60 s e 8 (e 16).

A Figura 3 mostra a função desenvolvida para comandar a formação de uma monocamada, junto de suas lavagens, onde são passados a localização do polímero e de sua respectiva água de lavagem, os volumes de polímero e de água e os tempos de adsorção e lavagem. O robô, então, pega as ponteiros (linha 3) e, em seguida, transfere a solução polimérica para a primeira coluna da placa que contem os filmes (linha 6). É esperado o tempo de adsorção (linha 8) para, assim, aspirar a solução despejada anteriormente e descartá-la



na placa de descarte (linhas 9 e 10). Posteriormente, passa-se para a etapa de lavagem, que consiste na repetição de dois ciclos dos mesmos comandos executados para os polímeros, porém utilizando somente água.

Para a construção dos recobrimentos, essa função é executada passando-se o PEI como parâmetro e, depois, alternando-se entre a quitosana e o ácido hialurônico. Para cada uma dessas execuções, o código realiza um *loop* que itera *n_bilayers* vezes. A Figura 4 mostra essas ações, enquanto a Figura 5 mostra como as ponteiros tiveram que ser arranjadas em seu reservatório para criar o gradiente de bicamadas variando de 1 a 8.

```

1 def monolayer(Polymer, Water, vol_pol, vol_wash, ads_time, wash_time):
2
3     p300m.pick_up_tip()
4
5     # Monolayer
6     p300m.transfer(vol_pol, Polymer.bottom(5), Film_plate.cols(0).bottom(5), new_tip=
7     'never', blow_out=True, touch_tip=False)
8     p300m.move_to(Film_plate.cols(0).top())
9     p300m.delay(seconds=ads_time)
10    p300m.aspirate(vol_pol*3, Film_plate.cols(0).bottom(1))
11    p300m.blow_out(Trash_bin.cols(0))
12
13    # 2 washing steps
14    for i in range(2):
15        p300m.transfer(vol_wash, Water.bottom(5), Film_plate.cols(0).bottom(5),
16        new_tip='never', blow_out=True, touch_tip=False)
17        p300m.move_to(Film_plate.cols(0).top())
18        p300m.delay(seconds=wash_time)
19        p300m.aspirate(vol_wash*1.5, Film_plate.cols(0).bottom(1))
20        p300m.blow_out(Trash_bin.cols(0))
21
22    p300m.drop_tip()

```

Figura 3: Função que executa a formação de uma monocamada e suas lavagens.

```

1 #PEI Depn
2 monolayer(PEI, Water_PEI, vol_pol, vol_wash, ads_time, wash_time)
3
4 # Building up bilayers
5 for bilayer in range(n_bilayers):
6     monolayer(Poly1, Water1, vol_pol, vol_wash, ads_time, wash_time)
7     monolayer(Poly2, Water2, vol_pol, vol_wash, ads_time, wash_time)
8
9 robot.home()
10 robot.disconnect()

```

Figura 4: Estrutura do código que promove a formação das bicamadas.



Figura 5: Arranjo das ponteiros empregadas para a deposição dos recobrimentos no pipetador automático. Essa configuração permite a criação de um gradiente de bicamadas variando de 1 a 8.

Resultados

Com o sistema criado, foi possível construir 8 filmes com o número de bicamadas variando de 1 a 8 ao longo de uma coluna da placa de 96 poços. Com um arranjo de ponteiros semelhante, também foram produzidos 8 filmes com 2 a 16 bicamadas.

Houve, ainda, a necessidade de verificar se os filmes realmente foram desenvolvidos e, assim, comprovar a possibilidade de construir recobrimentos na placa de poços através do pipetador automático. Dessa forma, realizou-se uma espectroscopia de UV-visível corando-se os recobrimentos com Azul de Alciano. Os grupos carboxila presentes no ácido hialurônico, ao serem desprotonados, interagem com este corante, produzindo um conjugado cuja curva de absorbância apresenta um pico em, aproximadamente, 617 nm, e um ombro próximo à 700 nm [7]. A Figura 6 exibe a curva obtida.

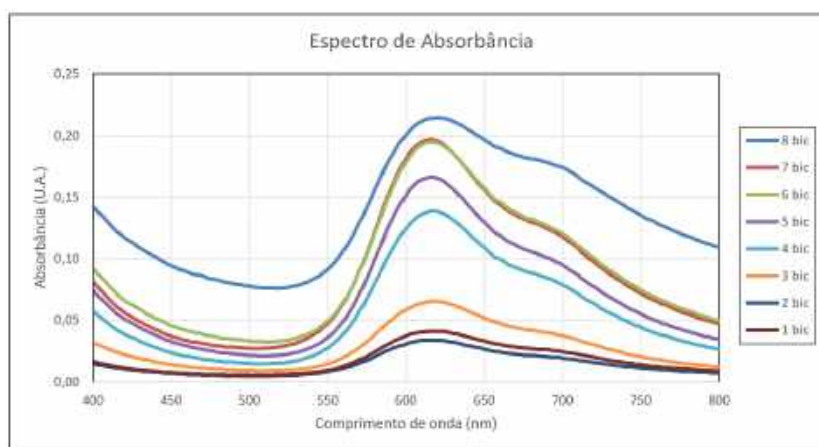


Figura 6: Espectro de absorbância dos filmes de HA/CHI com 1 a 8 bicamadas, depositados em uma placa de 96 poços, logo após a incorporação de Azul de Alciano.

A presença do conjugado entre os grupos carboxila e o Azul de Alciano, evidenciado acima, indica a existência de filme em todos os poços. Portanto, a realização do LbL através da técnica utilizada é possível. A diferença entre as intensidades das curvas mostra a desigualdade da quantidade de moléculas de HA em cada filme, o que se dá pela diferença no número de bicamadas depositados em cada caso. Esta disparidade, porém, não é muito intensa devido aos baixos números de bicamadas utilizados.

Conclusão

O código criado é bastante útil para a produção de recobrimentos mas demasiadamente limitado e ainda requer bastante intervenção dos experimentalistas. No entanto, as alterações realizadas após a



migração para a bolsa FAPESP promoveram melhorias consideráveis no sistema. Em primeiro lugar, passou-se a produzir recobrimentos em todos os poços da placa, aumentando a capacidade de produção. A maneira como o gradiente de bicamadas é feito foi alterado, de tal maneira que não é mais necessário dispor as ponteiras de maneira organizada. Foram inseridas, também, funções para que as ponteiras pudessem ser guardadas, permitindo sua reutilização e diminuindo consideravelmente a quantidade de ponteiras descartadas. Variáveis como velocidade do braço do robô, velocidade de despejo das soluções e até movimentação da ponteira dentro das soluções foram exploradas de forma a otimizar ainda mais o processo e torná-lo adaptável à outros experimentos, como o Western Blotting. Por fim, apesar de não haver uma interface com o usuário, o código encontra-se mais organizado, amigável e flexível, permitindo maior interação e compreensão do usuário.

O sistema desenvolvido nesse trabalho e em sua continuação promoveram ganhos para o laboratório, uma vez que houve um crescimento exponencial da capacidade de produção de filmes distintos aliado a uma redução considerável na quantidade de solução utilizada. Isso permite uma apreciável aceleração nas pesquisas científicas, reduzindo-se custos a longo prazo.

Referências

- 1 DECHER, G. Fuzzy nanassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v. 277, p. 1232–1237, 08 1997.
- 2 DECHER, G.; HONG, J. 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*, v. 46, p. 321 – 327, 06 1991.
- 3 DECHER, G. et al. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Current Opinion in Colloid Interface Science*, v. 3, p. 32–39, 02 1998.
- 4 VOZAR, S. et al. Automated spin-assisted layer-by-layer assembly of nanocomposites. *The Review of scientific instruments*, v. 80, p. 023903, 03 2009.
- 5 KROGMAN, K. et al. Automated process for improved uniformity and versatility of layer-by-layer deposition. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 23, p. 3137–41, 04 2007.
- 6 CHAPMAN, T. Lab automation and robotics: Automation on the move. *Nature*, v. 421, p. 661, 663, 665–6, 03 2003.
- 7 MELLO, M. et al. Optical anisotropy of alcian blue-stained acid glycosaminoglycans. *Acta histochemica*, v. 109, p. 78–85, 02 2007.