



# ESTUDO DE SOLUÇÕES BIOPOLIMÉRICAS VISANDO FORMAÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS PELA TÉCNICA DE *LAYER-BY-LAYER*

**Palavras-Chave:** *LAYER-BY-LAYER*, POLÍMEROS NATURAIS, FILMES NANOESTRUTURADOS

**Autores(as):**

MARIANA HOLANDA PARENTE, FEQ – UNICAMP

THALYTA STEFANI AMÂNCIO SANTIAGO, FEQ – UNICAMP

EDUARDA BAGGIO PAGLIA, FEQ - UNICAMP

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. MARISA MASUMI BEPPU (orientadora), FEQ - UNICAMP

## INTRODUÇÃO:

O estudo das soluções de polianions e poliânions para a formação de filmes tem sido amplamente explorado na busca por aplicações biomédicas promissoras, como recobrimentos para a detecção de células tumorais. Para essa finalidade, é possível aplicar a técnica de Layer-by-Layer (LbL), que permite a criação controlada de filmes finos e altamente sensíveis.

A técnica de LbL consiste na construção de filmes nanoestruturados a partir da deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas em um substrato, como mostra a Figura 1.

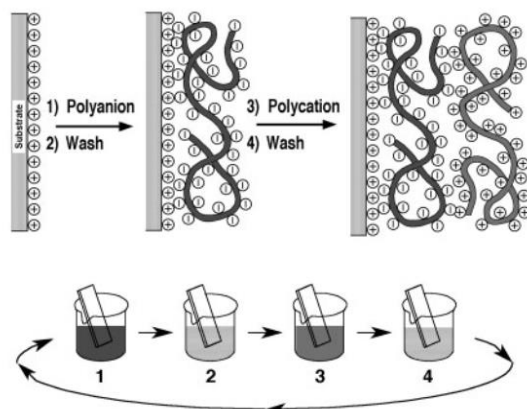


Figura 1. Esquema ilustrativo da técnica Layer-by-Layer. Retirada de (DECHER, 2002).

Primeiramente, um polieletrólito é imerso em uma solução diluída contendo polímeros de carga oposta. Esses componentes interagem eletrostaticamente, possibilitando a adsorção do polieletrólito no substrato e promovendo uma mudança na polaridade da superfície. Posteriormente, são realizadas lavagens para remover o excesso do polieletrólito entre cada deposição. Em seguida, o substrato é mergulhado em uma solução diluída de outro polímero, também de carga oposta à da primeira solução (MORAES, 2014), para dar continuidade ao processo de deposição. Esse ciclo é repetido conforme necessário para alcançar o revestimento desejado, permitindo a construção controlada de camadas de polímeros alternados, característico da técnica Layer-by-Layer (LbL). A interação eletrostática entre os polímeros carregados opostamente é essencial para a estabilidade e a aderência do filme.

A técnica LbL, desenvolvida por Gero Decher em 1997, oferece várias vantagens, como sua reprodutibilidade e a capacidade de realizar deposições em praticamente qualquer

tipo de substrato, além do controle de parâmetros dos filmes de bicamadas, como concentração, composição e tempo de adsorção (DECHER, 2002). A estrutura dos filmes formados por essa técnica, incluindo a rugosidade e a espessura, é influenciada por diversos fatores, como o tipo do polímero utilizado, o pH das soluções (SHIRATORI, 2000), (VASCONCELLOS *et al.*, 2010) e a força iônica (ROCHA NETO *et al.*, 2019). Outra vantagem é a ampla gama de reagentes que podem ser utilizados nas deposições LbL, incluindo polímeros, biomacromoléculas, coloides etc. Ainda, os filmes produzidos são úteis em diversas aplicações biomédicas, tais como em sistemas de liberação de fármacos, adesão de células, desenvolvimento de materiais de regeneração para tecidos, biossensores, entre outros (TANG *et al.*, 2006).

Nesse contexto, os poliânions e policátions atuam como os componentes essenciais para a construção desses filmes. Uma vez formado, esse filme pode ser modificado com biomoléculas específicas, que possuem afinidade por biomarcadores associados ao câncer (SHARMA, 2017). Entre eles destaca-se o CD44, uma glicoproteína associada à adesão celular e que tem como principal ligante o ácido hialurônico (HA) (SNEATH; MANGHAM, 1998), (GOODISON *et al.*, 1999). Além do HA, outros ligantes são o sulfato de condroitina (CS), o alginato de sódio (ALG), a carboximetilcelulose (CMC), a fibronectina e o colágeno (SNEATH; MANGHAM, 1998), (GOODISON *et al.*, 1999). Para casos como esse, que envolvem o desenvolvimento de tecnologias para a aplicação biomédica, é interessante utilizar

polímeros naturais, pois são biocompatíveis e biodegradáveis, além de possuírem baixa toxicidade (ASSIS, 2003).

A técnica de Layer-by-Layer (LbL) emerge como uma estratégia promissora para a criação de biomateriais que podem ser utilizados na imobilização de células, como a aplicação em revestimento de biossensores para aprimorar a sensibilidade e a seletividade (SWISTON, 2008), permitindo o controle da adesão celular na superfície de substratos, necessária para identificar precocemente a presença de células tumorais prostáticas.

Nesse contexto, o estudo objetiva avaliar o comportamento de misturas de poliânions, como HA, CS, CMC e ALG, para avaliar as condições de produção de filmes finos através da técnica LbL. Essa abordagem pode abrir caminho para possíveis aplicações promissoras na área biomédica, como no recobrimento de biossensores com potencial para a detecção de câncer.

## **METODOLOGIA:**

A metodologia adotada para estudar o comportamento das soluções de polímeros naturais, a fim de para avaliar a possibilidade de formação de filmes, iniciou-se com o preparo das soluções de polieletrólitos: ácido hialurônico (HA), sulfato de condroitina (CS), alginato de sódio (ALG) e carboximetilcelulose (CMC); estas foram feitas na concentração de 1 g/L a partir da solubilização dos polímeros em água Milli-Q® 18.2 MΩ. Já a solução de quitosana (CHI) foi preparada solubilizando-a em solução de ácido acético a 0,1 M, também sob agitação. Os pH foram ajustados para  $3,5 \pm 0,1$  e  $5,5 \pm 0,1$  utilizando soluções de NaOH e HCl 0,1 M.

Posteriormente, o comportamento de carga das soluções foi caracterizado pela técnica do potencial zeta, usando um equipamento Zetasizer Nano ZS. Além disso, as soluções de polieletrólitos e misturas das mesmas quantidades de polication/poliânion foram caracterizadas pela espectroscopia ultravioleta-visível, utilizando um leitor de placas Varioskan Lux, nos comprimentos de onda de 300 a 800 nm.

As soluções avaliadas foram aplicadas no revestimento de lâminas de vidro, de forma a estudar a formação de filmes pela técnica LbL. As lâminas de vidro foram imersas em solução de detergente, hidróxido de sódio 1,0 M e água deionizada, respectivamente, em banho ultrassônico, durante 10 minutos cada. Em seguida, foram secas em condição ambiente e armazenadas até a deposição dos filmes. Depois, em cada lâmina foi depositada uma pré-camada de PEI durante 10 minutos, seguida por três lavagens por 2, 1 e 1 minuto. Sobre esta pré-camada, foram depositadas 3,5 bicamadas de polication/poliânion, por meio da imersão alternada das lâminas nas soluções de polieletrólitos durante 10 minutos cada, intercaladas por três imersões em soluções de lavagem de água deionizada, durante 2, 1 e 1 minutos, respectivamente.

Após os recobrimentos estarem prontos, a caracterização dos filmes foi feita medindo a absorvância dos substratos, no comprimento de 617 nm, no leitor de placas Varioskan Lux, de forma a relacionar a absorvância com as características da estrutura dos filmes. Para isso, as lâminas foram imersas em soluções de corante AA (0,001 H e pH 3,0) por 15 minutos e,

então, lavadas duas vezes consecutivas, por 2 minutos em água Milli-Q®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A avaliação do potencial zeta das soluções demonstrou uma tendência de valores absolutos mais elevados nos poliânions em pH 5,5, com exceção do CMC, que não apresentou variação significativa. O gráfico apresentado na Figura 2 contém o potencial zeta das soluções de quitosana, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, alginato de sódio e carboximetilcelulose.

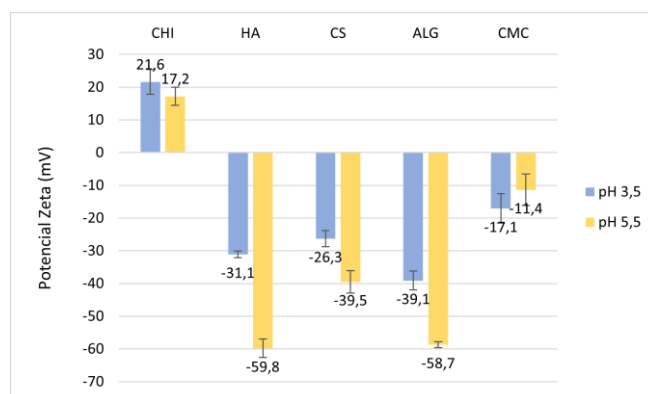


Figura 2. Potencial zeta das soluções de polieletrólitos (1 g/L).

Essa medida foi utilizada para avaliar a estabilidade das soluções no pH selecionado, fornecendo informações sobre a carga superficial das partículas coloidais presentes nas soluções e sendo crucial para compreender as interações eletrostáticas entre os polieletrólitos e determinar a estabilidade da solução em diferentes condições de pH. Em geral, o valor de 30mV é a referência de estabilidade das partículas; assim, potenciais zeta de valor absoluto superior a 30 mV indicam estabilidade, enquanto valores absolutos inferiores a esse potencial indicam instabilidade, floculação, agregação (KEPEKÇI *et al.*, 2021).

O comportamento obtido é esperado, uma vez que, considerando o pKa das

substâncias, sabe-se que elas estarão mais ionizadas em soluções menos ácidas (VASCONCELLOS *et al.*, 2010). A quitosana, por sua vez, apresenta um comportamento contrário, possuindo maiores potenciais em condições mais ácidas e, então, sendo mais estável. Isso ocorre devido a protonação dos grupamentos amino (NH<sub>2</sub>).

A Tabela 1 contém os valores de absorvância das misturas estudadas no comprimento de 600 nm. Analisando-a, percebe-se que aquelas que contém quitosana no pH 5,5 possuem maior absorvância.

Tabela 1. Valores de absorvância das soluções obtidos em um comprimento de onda de 600 nm.

| Placas            | Absorvância   |
|-------------------|---------------|
| HA 3,5 / CHI 3,5  | 0,365 ± 0,159 |
| HA 5,5 / CHI 3,5  | 0,504 ± 0,325 |
| CS 3,5 / CHI 3,5  | 0,209 ± 0,033 |
| CS 5,5 / CHI 3,5  | 0,218 ± 0,017 |
| ALG 3,5 / CHI 3,5 | 0,383 ± 0,071 |
| ALG 5,5 / CHI 3,5 | 0,473 ± 0,042 |
| CMC 3,5 / CHI 3,5 | 0,202 ± 0,022 |
| CMC 5,5 / CHI 3,5 | 0,246 ± 0,008 |
| HA 5,5 / CHI 5,5  | 0,696 ± 0,130 |
| HA 3,5 / CHI 5,5  | 0,789 ± 0,081 |
| CS 5,5 / CHI 5,5  | 0,510 ± 0,019 |
| CS 3,5 / CHI 5,5  | 0,487 ± 0,013 |
| ALG 5,5 / CHI 5,5 | 0,250 ± 0,038 |
| ALG 3,5 / CHI 5,5 | 0,231 ± 0,021 |
| CMC 5,5 / CHI 5,5 | 0,497 ± 0,029 |
| CMC 3,5 / CHI 5,5 | 0,491 ± 0,009 |

A técnica de espectroscopia UV-visível (UV-vis) foi aplicada para estabelecer uma relação entre a absorvância e a turbidez gerada na mistura. A espectroscopia UV-vis possibilita a análise da absorvância de soluções em diferentes comprimentos de onda, o que pode revelar padrões específicos relacionados à formação de complexos ou agregados coloidais.

Segundo a Equação de Henderson-Hasselbach, a CHI está totalmente ionizada em pH 3,5 e apenas parcialmente em pH 5,5, ou seja, em pH 5,5 há menos grupamentos aminos livres. Já os poliânions estão mais dissociados

em soluções menos ácidas. Fixando o pH da quitosana em 3,5, nota-se que o aumento do pH das soluções de poliânions elevou a absorvância da solução; assim, entende-se que os íons carboxílicos, presentes nos poliânions, estão mais disponíveis nesse pH para interagir com os aminos, presentes na quitosana, formando agregados. Estes dispersam mais luz, aumentando a turbidez da solução e a absorvância. depende do respectivo grau de ionização dos polímeros. Nesse sentido, como CS, ALG e CMC em pH 5,5 tiveram maior absorvância, possivelmente formaram mais agregados, suscitando a possibilidade de essas misturas possuírem melhor propriedades para a formação de filmes.

## CONCLUSÕES:

O comportamento de misturas de poliânions foi estudado, neste trabalho, para avaliar as condições de produção de filmes finos através da técnica LbL. Foi verificada a possibilidade de formação de filmes de CS, ALG e CMC em pH 5,5. Como interação com CD44, pode-se investigar a produção de filmes com potencial para captura de células.

## BIBLIOGRAFIA:

- ASSIS, Odilio B. G.; DA, Silva Valmir L.. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 223-228, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282003000400006>.
- DECHER, Gero. **Multilayer Thin Films**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 535 p.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D.. CD44 cell adhesion molecules. **Molecular Pathology**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 189-196, 1 ago. 1999. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/mp.52.4.189>.

KEPEKÇI, Remziye Aysun; İLÇE, Burcu Yener; KANMAZALP, Sibel Demir. Plant-derived biomaterials for wound healing. **Bioactive Natural Products**, [S.L.], p. 227-264, jul. 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-819489-8.00001-6>.

MORAES, Mariana Agostini de. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS MICRO E NANOESTRUTURADOS CONTENDO FIBROÍNA DE SEDA COMBINADA A OUTROS POLÍMEROS BIOCAMPATÍVEIS PARA CONTATO COM CÉLULAS. 2014. 150 f. Tese - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

O'REILLY, Julie-Ann. Prostate Cancer Detection: complexities and strategies. **Journal Of Cancer Treatment And Diagnosis**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 18-25, 1 dez. 2017. Sciaccess Publishers LLC. <http://dx.doi.org/10.29245/2578-2967/2018/1.1111>.

ROCHA NETO, J.B.M.; TAKETA, T.B.; BATAGLIOLI, R.A.; PIMENTEL, S.B.; SANTOS, D.M.; FIAMINGO, A.; COSTA, C.A.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CARVALHO, H.F.; BEPPU, M.M.. Tailored chitosan/hyaluronan coatings for tumor cell adhesion: effects of topography, charge density and surface composition. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 486, p. 508-518, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.04.227>.

SHARMA, Shikha; ZAPATERO-RODRÍGUEZ, Julia; O'KENNEDY, Richard. Prostate cancer diagnostics: clinical challenges and the ongoing

need for disruptive and effective diagnostic tools. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 135-149, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.009>.

SHIRATORI, S. S.; RUBNER, M. F.. PH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. **Macromolecules**, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 4213-4219, 22 abr. 2000. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/ma991645q>.

SNEATH, R. J.; MANGHAM, D. C.. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. **Molecular Pathology**, [S.L.], v. 51, n. 4, p. 191-200, 1 ago. 1998. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/mp.51.4.191>.

SWISTON, Albert J.; CHENG, Connie; UM, Soong Ho; IRVINE, Darrell J.; COHEN, Robert E.; RUBNER, Michael F.. Surface Functionalization of Living Cells with Multilayer Patches. **Nano Letters**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 4446-4453, 5 nov. 2008. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/nl802404h>.

TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A.. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, [S.L.], v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 16 nov. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200600113>.

VASCONCELLOS, Fernando C.; SWISTON, Albert J.; BEPPU, Marisa M.; COHEN, Robert E.; RUBNER, Michael F.. Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: hyaluronic acid mediated b lymphocyte adhesion. **Biomacromolecules**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 2407-2414, 13 set. 2010. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/bm100570r>.