



THIAGO BEZERRA TAKETA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE  
QUITOSANA/ÁCIDO HIALURÔNICO E QUITOSANA/ALGINATO  
DE SÓDIO PELA TÉCNICA  
*LAYER-BY-LAYER* PARA APLICAÇÕES ANTIMICÓTICAS

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

THIAGO BEZERRA TAKETA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RECOBRIMENTOS DE  
QUITOSANA/ÁCIDO HIALURÔNICO E QUITOSANA/ALGINATO  
DE SÓDIO PELA TÉCNICA  
*LAYER-BY-LAYER* PARA APLICAÇÕES ANTIMICÓTICAS

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
THIAGO BEZERRA TAKETA E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. MARISA MASUMI BEPPU

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marisa M. Beppu", is written over a horizontal line.

CAMPINAS

2013

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

T139o Taketa, Thiago Bezerra, 1988-  
Obtenção e caracterização de recobrimentos de quitosana/ácido hialurônico e quitosana/alginate de sódio pela técnica layer-by-layer para aplicações antimicóticas / Thiago Bezerra Taketa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Filmes multicamadas. 3. Filmes automontados. 4. Biopolímeros. 5. *Candida albicans*. I. Beppu, Marisa Masumi, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Preparation and characterization of chitosan/hyaluronic acid and chitosan/sodium alginate coatings via layer-by-layer technique for antifungal applications

**Palavras-chave em inglês:**

Chitosan

Multilayer films

Self-assembled films

Biopolymers

*Candida albicans*

**Área de concentração:** Engenharia de Processos

**Titulação:** Mestre em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Fernando Jorge Mendes Monteiro

Mariana Altenhofen da Silva

**Data de defesa:** 14-05-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

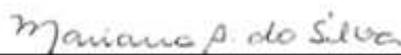
Dissertação de Mestrado defendida por Thiago Bezerra Taketa e aprovada em 14 de maio de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marisa M. Beppu', written above a horizontal line.

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. J. M. Monteiro', written above a horizontal line.

Prof. Dr. Fernando Jorge Mendes Monteiro

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mariana A. da Silva', written above a horizontal line.

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva

Para a minha família, em especial à minha  
batchan, Seitsuko Taketa (*in memoriam*)

# Agradecimentos

---

*A Deus, por ter reservado no tempo e no espaço tantos momentos de felicidade para mim.*

*A minha família:* Ao meu pai Mario, minha mãe Maria Inês e meus irmãos, Lucas e Karina. Vocês são a minha razão de viver. Agradeço à minha vó Maria e à minha tia Elisângela por terem me ajudado na inscrição do Mestrado. Tudo pode passar, mas o meu amor por vocês sempre estará aqui: intacto. Obrigado por tudo.

*À Professora Marisa Beppu:* Este trabalho não seria possível sem o apoio e confiança da minha orientadora, Professora Marisa Masumi Beppu. Sou extremamente grato pelos momentos em que você pediu para que eu fosse perseverante e seguisse com o meu trabalho. Você sempre será um grande exemplo pessoal e profissional para mim.

*À Universidade Federal do Ceará:* Agradeço aos professores Sâmia Brilhante e José Julio Costa Sidrim que tornaram possível a realização dos testes antimicóticos no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da UFC. Obrigado a toda equipe pelo suporte durante a minha visita ao laboratório.

*Ao Rogério Aparecido Bataglioli:* Agradeço ao Rogério pela paciência ao me ensinar os procedimentos da linha de pesquisa do *layer-by-layer* e pelos trabalhos que realizamos juntos.

*À equipe do layer-by-layer:* Fernando Miyazaki, Rodrigo Rabelo, Ennio Balbi, Fernando Vasconcellos e Tiago Martins.

*Ao LEQUIP:* Bruno Cunha, Vicente Franco, Reginaldo Neto e Giovana Genevro. Agradeço à Cynthia Mahl, Mariana Moraes e Juliana Vaz pelo suporte e carinho ao longo dos últimos meses do Mestrado.

*Aos laboratórios parceiros:* À Professora Mônica Alonso Cotta e Mauro de Carvalho, também aos técnicos Rosane Palissari, Airton Lourenço e Jorge Luis de Lima do LAMULT (IFGW/Unicamp) pelas análises de AFM e perfilometria, ao LRAC (FEQ/Unicamp) pelas análises de IV e ao Professor Fernando Galembeck do IQ/Unicamp por viabilizar as análises de ângulo de contato.

*Aos Professores da banca:* Agradeço ao Professor Fernando Jorge Mendes Monteiro (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto) e Mariana Altenhofen da Silva (Faculdade de Engenharia Química da Unicamp) pelos elogios e críticas acerca do trabalho apresentado.

*Aos órgãos de fomento:* CAPES, CNPq e Fapesp.

Minha mãe achava estudo  
a coisa mais fina do mundo.  
Não é.  
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.

*Adélia Prado – Ensino*

# Resumo

---

A busca por materiais que possam constituir superfícies antimicrobianas é relevante uma vez que o contato com micro-organismos patogênicos representa um sério risco à saúde.

Além das propriedades naturais biocidas de alguns materiais, a adição de compostos que também atuam como agentes antibióticos, como íons metálicos ou peptídeos, podem potencializar essa funcionalidade. Existe também a alternativa de criar-se uma superfície antimicrobiana através da modificação da densidade e da mobilidade de cargas catiônicas dos materiais utilizados, assim como propriedades estruturais dos revestimentos visando dificultar a adesão ou crescimento de micro-organismos.

Neste trabalho, os filmes foram construídos pela técnica *layer-by-layer*, na qual é feita a imersão de um substrato (lâmina de vidro) alternadamente em soluções que contêm cargas positivas ou negativas e, no intervalo entre cada submersão, o filme em formação passa por um processo de lavagem em água deionizada para a retirada do excesso de polieletrólitos. Especificamente, foram utilizados o biopolímero catiônico quitosana (CHI) e os polieletrólitos negativos alginato de sódio (ALG) e ácido hialurônico (HA). Os filmes constituídos de ALG/CHI e HA/CHI foram construídos em diferentes pH e força iônica das soluções polieletrólíticas.

Por análises de perfilometria e microscopia de força atômica (AFM) foi possível monitorar mudanças de espessura e rugosidade dos recobrimentos e foi verificado que a presença de sal no meio de deposição faz com que os polímeros apresentem conformações com mais *loops* e *tails* e esse arranjo das cadeias em solução é transmitido para os filmes, que se tornam mais rugosos. Além disso, a espessura dos filmes pode ser controlada por meio do ajuste do pH do meio de deposição. A incorporação dos corantes rosa de bengala e azul de alciano, em conjunto com análises de FTIR possibilitaram identificar os grupos funcionais responsáveis pela funcionalidade dos recobrimentos formados.

Por fim, foram feitos testes dos recobrimentos, com e sem acetato de prata, frente à cepa *Candida albicans* e foi verificado que filmes contendo  $\text{Ag}^+$  foram capazes de inibir o crescimento do fungo. O uso sinérgico de polímeros naturais e da técnica LbL viabilizou, de uma maneira simples e versátil, a construção de filmes nanoestruturados com potencial para aplicações antimicóticas.

Palavras-chave: *Layer-by-layer*, quitosana, biopolímeros, *Candida albicans*.

# Abstract

---

The search for materials that can constitute antimicrobial surfaces is relevant since the contact with pathogenic microorganisms is a serious health risk.

Besides the natural biocidal properties of some materials, the addition of compounds that also act as antimicrobial agents, such as metal ions or peptides, may enhance this capability. There is also the alternative to create an antimicrobial surface by modifying the density and mobility of cationic charges of the materials used, as well as structural properties of the coatings in order to hinder the adhesion or proliferation of microorganisms.

In this work, the nanostructured films were built by the layer-by-layer (LbL) technique, whose interaction among species with opposite electrostatic charges is, in most cases, the primary phenomenon responsible for the formation of multilayers. Specifically, we chose the cationic biopolymer chitosan (CHI) and the negative polyelectrolytes sodium alginate (ALG) and hyaluronic acid (HA). The aim of this study was to evaluate the effect of ionic strength (0 versus 200 mM) and pH (3 versus 5) on ALG/CHI and HA/CHI nanostructured multilayered thin films properties.

From profilometry and atomic force microscopy (AFM) analysis, it was possible to monitor changes in thickness and roughness of the coatings and it was found that the presence of salt in polyelectrolyte solutions promoted polymer chains conformations with more loops and tails and this arrangement in solution is transmitted to films, resulting in rougher coatings. Furthermore, the film thickness can be precisely controlled by adjusting the pH of the polyelectrolyte solution. The incorporation of rose bengal and alcian blue dyes in conjunction with FTIR analysis allowed identifying the functional groups responsible for the functionality of the coatings formed.

Finally, we evaluated the antifungal activity of the LbL coatings (with and without silver ions) against *Candida albicans* strain and we observed that films containing  $\text{Ag}^+$  were able to inhibit the growth of the fungus. The synergistic use of natural polymers and LbL technique made possible, in a simple and versatile way, the construction of nanostructured films with great potential for antifungal surfaces.

Keywords: Layer-by-layer, chitosan, biopolymers, *Candida albicans*.

# Sumário

---

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos.....	3
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica .....	4
2.1. Método <i>layer-by-layer</i> para recobrimento de superfícies .....	4
2.2. Parâmetros relevantes no processo de formação de filmes multicamadas pela técnica <i>layer-by-layer</i> .....	5
2.3. Revestimentos antimicrobianos construídos pelo método <i>LbL</i> : importância da modificação/funcionalização de superfícies .....	9
2.4. Polímeros naturais aplicados em biomateriais.....	13
2.4.1. Quitosana.....	14
2.4.2. Alginato de Sódio.....	16
2.4.3. Ácido Hialurônico .....	17
Capítulo 3 – Materiais e Métodos .....	18
3.1. Materiais .....	18
3.2. Preparo das soluções de biopolímeros e dos filmes nanoestruturados .....	18
3.2.1. Preparo das soluções de biopolímeros .....	18
3.2.2. Preparo dos substratos e método de deposição dos filmes.....	18
3.3. Caracterização dos filmes multicamadas.....	20
3.3.1. Perfilometria.....	20
3.3.2. Ângulo de Contato .....	21
3.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	21
3.3.4. Planejamento de Experimentos (DoE).....	21

3.3.5.	UV-VIS .....	22
3.3.6.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) .....	23
3.3.7.	Incorporação de íons prata às PEMs de biopolímeros .....	24
3.3.8.	Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com Módulo de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) .....	24
3.3.9.	Efeito dos filmes de biopolímeros frente à espécie <i>Candida albicans</i> .....	25
3.3.9.1.	Micro-organismos .....	25
3.3.9.2.	Recobrimentos .....	25
3.3.9.3.	Prova do microcultivo de levedura .....	26
Capítulo 4 – Resultados e Discussão .....		29
4.1.	Espessura dos Filmes .....	29
4.2.	Topografia dos Filmes .....	33
4.3.	Ângulo de Contato (AC) .....	38
4.4.	Identificação de grupos funcionais por FTIR-ATR .....	42
4.5.	Identificação de grupos funcionais livres por incorporação de corantes iônicos .....	46
4.6.	MEV, EDS e UV-Vis de recobrimentos contendo íons de prata (Ag <sup>+</sup> ) .....	50
4.7.	Filmes de biopolímeros frente à <i>Candida albicans</i> .....	53
Capítulo 5 – Conclusões .....		56
Capítulo 6 – Sugestões para trabalhos futuros .....		58
Referências bibliográficas .....		59
Anexo 1 – Grau de ionização dos polieletrólitos .....		69
Anexo 2 – Macro/Microscopia dos testes com <i>Candida albicans</i> .....		71

# Abreviações

---

AA– Azul de Alciano

AC – Ângulo de contato

AFM – Microscopia de força atômica

AgNP – Nanopartícula de prata

ALG – Alginato

AM – Azul de metileno

ATRP – Polimerização radicalar controlada por transferência de átomos

CGA – Cromogranina A

CHI – Quitosana

CVD – Deposição de vapor químico

DC – Grau de carga

DoE – *Design* de experimentos

EDS – Energia dispersiva de raio X

F.I. – Força iônica

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GlcN – 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose

HA – Ácido Hialurônico

HCl – Ácido clorídrico

LbL – Layer-by-Layer

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MM – Massa molar

NaCl– Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NMVA – N-metil-N-vinil-acetamida

PAA – Poli(ácido acrílico)

PAH – Hidrocloro de poli(alilamina)

PDAC – Poli(cloreto de dialildimetil amônio)

PEAD – Polietileno de alta densidade

PEBD – Polietileno de baixa densidade

PEI – Poli(etilenoimina)  
PEM – Membranas polieletrólíticas  
PET – Polietileno tereftalato  
PGA – Poli(L-ácido glutâmico)  
pH – Potencial hidrogeniônico  
pK<sub>a</sub> – Logaritmo da constante de dissociação ácida  
pK<sub>b</sub> – Logaritmo da constante de dissociação básica  
pK<sub>o</sub> – Logaritmo da constante de dissociação  
PLL – Poli-L-lisina  
PP – Polipropileno  
RB – Rosa de bengala  
RNA – Ácido ribonucleico  
SPS – Poli(4-estireno sulfonato de sódio)  
Tw 80 – Tween 80  
UV – Ultravioleta  
Vis – Visível  
 $\alpha$  – Nível de significância

# Lista de figuras

---

Figura 2.1 – Método <i>LbL</i> . (A) Imersão do substrato em soluções de polycations, poliânions e enxágue e (B) formação das camadas após as imersões nas soluções polieletrólíticas. Adaptado de Decher [21].	4
Figura 2.2 – Estrutura química da quitosana. Adaptada de Tao <i>et al.</i> (2007) [71].	14
Figura 2.3 – Estrutura química do alginato de sódio. Adaptado de Tao <i>et al.</i> (2007) [71].	16
Figura 2.4 – Estrutura química do ácido hialurônico. Adaptado de Rinaudo (2008) [10].	17
Figura 3.1 - <i>LbL</i> Nanostructure Pro e tempos de deposição do substrato nas soluções de polímeros e de lavagem com H <sub>2</sub> O.	19
Figura 3.2 - Esquematização dos pontos de leitura da espessura dos filmes nanoestruturados pela técnica de perfilometria. Para cada amostra, foram feitas 12 leituras de espessura.	20
Figura 3.3 – Estrias com <i>Candida albicans</i> em placa de Agar Corn-Meal Tw80.	26
Figura 3.4 – Lâminas com polímeros lavadas com álcool 70% (A) e deixadas em repouso para secagem (B).	27
Figura 3.5 – Lâminas controle (sem polímero) lavadas com álcool 70% (A) e deixadas em repouso para secagem (B).	27
Figura 3.6 – A/B/C: Lâmina com polímero sendo posicionada sobre as estrias no meio ágar; D/E/F: Lâmina controle sendo posicionada sobre as estrias no meio ágar.	28
Figura 4.1 – Conformação das cadeias de CHI, ALG e HA em diferentes pH e força iônica.	33
Figura 4.2 – Imagens obtidas por AFM em 2D e 3D para o vidro tratado e para o vidro recoberto com PEI.	34
Figura 4.3 – AFM dos filmes de HA/CHI em diferentes valores de pH e F.I.	36
Figura 4.4 – AFM dos filmes de ALG/CHI em diferentes valores de pH e F.I.	37
Figura 4.5 – Ângulo de contato em função do número de bicamadas. O símbolo ♦ representa filmes com CHI na última camada e ● representa filmes com ALG na última camada.	39
Figura 4.6 – Ângulo de contato em função do número de bicamadas. O símbolo ♦ representa filmes com CHI na última camada e ▲ representa filmes com HA na última camada.	40
Figura 4.7 – Espectro de FTIR para recobrimentos de HA/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$ de 675 a 4000 cm <sup>-1</sup> ).	44

Figura 4.8 – Espectro de FTIR para recobrimentos de HA/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$ de 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ ).	44
Figura 4.9 – Espectro de FTIR para recobrimentos de ALG/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$ de 675 a 4000 $\text{cm}^{-1}$ ).	45
Figura 4.10 – Espectro de FTIR para recobrimentos de ALG/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$ de 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ ).	45
Figura 4.11 – Espectro de UV para filmes de HA/CHI com o corante azul de alciano em pH 7.	49
Figura 4.12 – Espectro de UV para filmes de ALG/CHI com o corante azul de alciano em pH 7.	49
Figura 4.13 – Espectro de UV para filmes de HA/CHI com o corante rosa de bengala em pH 7.	50
Figura 4.14 – Espectro de UV para filmes de ALG/CHI com o corante rosa de bengala em pH 7.	50
Figura 4.15 – Espectro de FTIR para filmes de $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ e $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ com e sem $\text{Ag}^+$ .	51
Figura 4.16 – (A/C) MEV da superfície dos filmes de $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ e $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ e EDS (B/D) para mapeamento de prata. Os pontos vermelhos indicam a presença do metal na superfície analisada.	52
Figura 4.17 – Espectro de UV–Vis para os filmes de $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ e $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ contendo íons de prata.	52
Figura 4.18 – Projeções 2D e 3D da microscopia de força atômica dos filmes de $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ e $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ contendo $\text{Ag}^+$ .	53
Figura A.1 – Microscopia do filme de $(\text{HA}/\text{CHI}_5)_{10}$ indicando o crescimento de <i>Candida albicans</i> na amostra.	71
Figura A.2 – Vidro. (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.	72
Figura A.3 – $\text{PEI}_4 \text{NaCl}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.	72
Figura A.4 – $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.	72
Figura A.5 – $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10} \text{NaCl}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) dias.	72
Figura A.6 – $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.	73
Figura A.7 – $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10} \text{NaCl}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.	73

Figura A.8 – (HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias. .....	73
Figura A.9 – (HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.....	74
Figura A.10 – (HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias. .....	74
Figura A.11 – (HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.....	74
Figura A.12 – (ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> Ag <sup>+</sup> . Microscopia de (A) 20 horas e (B) 7 dias. ....	75
Figura A.13 – (HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> Ag <sup>+</sup> . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.....	75
Figura A.14 – Estria no limite superior do filme de (HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> Ag <sup>+</sup> . Campo acima: fora de contato com o filme, observa-se focos de filamentação. Abaixo: contato com o filme, ausência de crescimento fúngico. Microscopia de 96 horas de contato.....	76
Figura A.15 – Efeito do recobrimento sobre o fungo. Na região abaixo da lâmina não há crescimento do micro-organismo. Na região do ágar, o crescimento é pronunciado.....	76

# Lista de tabelas

---

Tabela 3. 1 – PEMs utilizadas nos testes com <i>C. albicans</i> .....	25
Tabela 4.1 – Espessura dos filmes de biopolímeros. DP é o desvio–padrão, F.I. é a força iônica das soluções de polímeros e Am. é a amostra. ....	29
Tabela 4.2– Efeito do pH e F.I. sobre a espessura dos filmes de ALG/CHI. ....	30
Tabela 4.3 – Efeito do pH e F.I. sobre a espessura dos filmes de HA/CHI. ....	30
Tabela 4.4 – Percentual de grupos funcionais ionizados dos polieletrólitos em diferentes pH ....	30
Tabela 4.5 – Valores de RMS para filmes de HA/CHI e cálculo dos efeitos de pH e F.I. sobre a rugosidade dos filmes de HA/CHI. <i>Rep.</i> é a replicata e <i>EP</i> é o erro–padrão. ....	35
Tabela 4.6 – Valores de RMS para filmes de ALG/CHI e cálculo dos efeitos de pH e F.I. sobre a rugosidade dos filmes de ALG/CHI. <i>Rep.</i> é a replicata e <i>EP</i> é o erro–padrão.....	35
Tabela 4.7 – Valores de absorvância para testes realizados com os corantes azul de alciano (AA) ( $\lambda = 617$ nm) e rosa de bengala (RB) ( $\lambda = 567$ nm).....	47
Tabela 4.8 – Efeito do pH e força iônica (F.I.) sobre a incorporação dos corantes azul de alciano (AA) e rosa de bengala (RB) em filmes de ALG/CHI e HA/CHI. Os efeitos foram calculados com base nos valores de absorvância normalizados pela espessura.....	47
Tabela 4.9 – Resultados observados dos testes com <i>Candida albicans</i> frente aos recobrimentos de polímeros naturais e influência da incorporação de metal sobre a ação antifúngica dos filmes. ...	55

# Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

---

## 1.1 Introdução

Micro-organismos, como bactérias, fungos e algas nos superam em número e massa. Mesmo em nosso corpo, a proporção entre células humanas e células de micro-organismos é de 1:10 [1]. Parte desses micróbios é fundamental para processos de digestão, decomposição e fermentação. Porém, alguns desses micro-organismos são classificados como patogênicos e as infecções causadas por eles, especialmente devido a sua capacidade de adesão a dispositivos médico-hospitalares, são ainda a causa de milhões de mortes todos os anos [1, 2].

Materiais comuns, como vidro, cerâmica, metais e madeira, por não apresentarem naturalmente propriedades antimicrobianas, necessitam de modificações em sua superfície para evitar a adesão e proliferação de micro-organismos [2]. Uma alternativa adequada para efetuar tais modificações é a técnica *layer-by-layer* que, por permitir o emprego de diversos materiais e possibilitar o recobrimento de substratos de diferentes geometrias, apresenta-se como um método operacionalmente simples e versátil. Nessa técnica, um substrato (*e.g.* lâmina de vidro) é imerso alternadamente em soluções polieletrólíticas de cargas opostas, promovendo o crescimento de um filme multicamadas. A organização molecular desse filme vai depender dos materiais selecionados para a sua construção, bem como das condições de preparo da solução polieletrólítica, no que se refere ao pH e força iônica do meio.

O método *layer-by-layer* permite a construção de recobrimentos que exploram diferentes estratégias para conferir ao material resultante a funcionalidade antimicrobiana, como: (a) minimizar a adesão de microrganismos e por consequência reduzir a formação de biofilme; (b) incorporar nesses recobrimentos compostos antimicrobianos, como antibióticos ou íons metálicos e permitir a sua posterior liberação ou (c) exibir um mecanismo de ação por contato entre a superfície e a célula, em que espécies catiônicas presentes nos recobrimentos promovam o rompimento da parede celular do micro-organismo, inativando-o.

A incorporação de quitosana aos filmes multicamadas tem sido investigada por diversos pesquisadores [3-6]. Apesar de vários mecanismos de ação terem sido propostos [7], em sistemas multicamadas a quitosana e seus derivados parecem se ligar a membrana celular de micróbios, destruindo o material genético e por consequência impedindo a sua proliferação. Além disso, quando o processo de deposição das multicamadas ocorre de forma adequada, filmes contendo quitosana apresentaram resistência à adesão de microrganismos patogênicos.

Assim como a quitosana, polímeros naturais como o ácido hialurônico e o alginato de sódio apresentam propriedades importantes para aplicações em sistemas biotecnológicos [5, 8, 9], como alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade [10]. Neste trabalho foram preparados e caracterizados revestimentos obtidos pela deposição alternada de polímeros naturais (quitosana/ácido hialurônico e quitosana/alginato de sódio) sobre lâmina de vidro.

O uso do método *LbL* associado a funcionalidade antimicrobiana tem sido extensivamente estudado para bactérias, tanto gram-positivas como gram-negativas [4, 11-13]. O sucesso dos revestimentos antibacterianos sustenta-se no fato de que os filmes construídos são arquitetados de forma a não permitir a adesão celular e/ou apresentarem segmentos poliméricos carregados positivamente que entram em ação quando em contato com a parede celular dos microrganismos, podendo destruí-las. O grau de hidrofiliicidade [14], a disponibilidade de grupos funcionais catiônicos [13], a rigidez [15] e outras características da superfície destes recobrimentos são fatores chave para que o material apresente a funcionalização desejada.

No entanto, testes com fungos e leveduras ainda são poucos explorados e utilizam os recobrimentos somente para incorporação e liberação de antifúngicos [16, 17]. É interessante avaliar, como este trabalho propõe, se existe interação de células micóticas com os revestimentos construídos por contato direto (ação pro contato com a quitosana) e se esta interação está relacionada com a variação de parâmetros como força iônica e pH das soluções do processo de deposição. Estes parâmetros são explorados porque se relacionam diretamente com a arquitetura do filme a ser construído, já que as mudanças na conformação do polímero em solução são, evidentemente, transmitidas para os filmes. Também foram feitos testes com recobrimentos contendo íons prata em sua estrutura. O uso desse metal como agente antibiótico é de longo tempo e sua associação a polímeros naturais torna possível a obtenção de dispositivos com propriedades de interesse no desenvolvimento de materiais antimicrobianos.

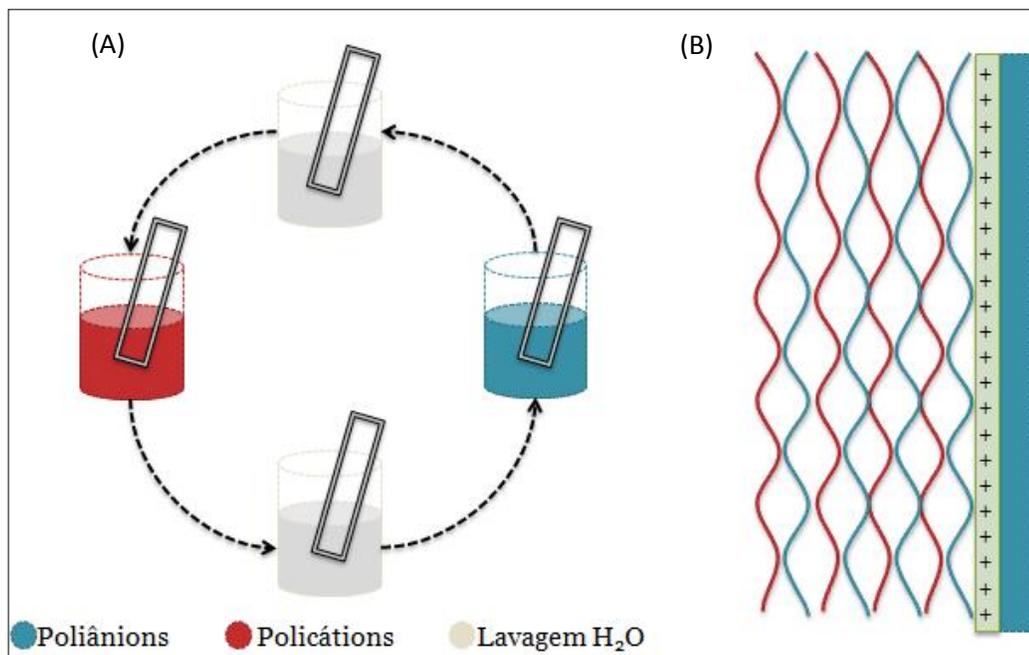
## 1.2 Objetivos

- ✓ Construção de revestimentos de biopolímeros pela técnica *layer-by-layer* (LbL), avaliando a influência do pH e força iônica das soluções polieletrólíticas;
- ✓ Caracterização física e química dos revestimentos construídos quanto à espessura, grau de hidrofobicidade, disponibilidade de grupos funcionais e topografia da superfície;
- ✓ Avaliação da interação dos revestimentos com o micro-organismo de teste *Candida albicans*.

# Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

## 2.1. Método *layer-by-layer* para recobrimento de superfícies

Na literatura, diversos trabalhos exploraram a técnica *layer-by-layer* (*LbL*) para a construção de filmes ou recobrimentos com espessura micro-nanométrica. Na maioria dos casos, o conceito fundamental para a formação desses filmes é advindo da interação entre espécies com cargas eletrostáticas opostas [18-20]. As etapas de construção de recobrimentos por essa técnica são mostradas na **Figura 2.1**. Nesse caso, um substrato como, por exemplo, uma lâmina de vidro, é imerso alternadamente em soluções polieletrólíticas com cargas opostas, promovendo a formação das multicamadas [21]. A cada imersão do substrato nestas soluções pode ser incorporada uma etapa de lavagem com água para retirada de segmentos das cadeias poliméricas que estão fracamente adsorvidos.



**Figura 2.1** – Método *LbL*. (A) Imersão do substrato em soluções de policátions, polianions e enxágue e (B) formação das camadas após as imersões nas soluções polieletrólíticas. Adaptado de Decher [21].

É um método simples para fabricação de filmes multicamadas (*PEMs*) cuja aplicação se torna cada vez mais versátil, particularmente após o estabelecimento de métodos de *LbL* com base em diferentes interações moleculares (forças eletrostáticas [22], ligações hidrogênio [23], reconhecimento molecular [24], forças de van der Waals [25]), permitindo a incorporação de diversos tipos de moléculas (proteínas [26], polissacarídeos [27], compostos sintéticos [15], DNA [28]). O método é independente do tamanho e formato do substrato, que pode ser constituído por uma variedade de materiais (vidro [29], titânio[3], fibras têxteis [30], plásticos [4], silício [31]).

Para processos cuja força-motriz é advinda das interações eletrostáticas, os polieletrólitos ou colóides, que apresentam certa densidade de carga, são utilizados em excesso para carregar positiva ou negativamente o substrato. Portanto, um excesso não-estequiométrico de carga é absorvido em relação à camada precedente após cada passo. Este excedente de carga fornece o mecanismo para a inversão da polaridade de carga da superfície, o que permite adsorção das camadas subsequentes [21], promovendo o crescimento do filme.

Além de poder empregar diversos materiais, o filme pode ter sua rugosidade, espessura e porosidade controlados no nível molecular pelo ajuste de parâmetros experimentais como pH, força iônica e concentração do polieletrólito [32, 33].

A natureza dos materiais utilizados na técnica do *layer-by-layer* pode resultar em características distintas quanto ao regime de crescimento e morfologia dos filmes formados. Assim, a compreensão do mecanismo de formação dos filmes multicamadas e a função dos vários parâmetros determinantes na espessura, estrutura e propriedades interfaciais são fundamentais para o projeto apropriado do recobrimento para sua futura aplicação.

## 2.2. Parâmetros relevantes no processo de formação de filmes multicamadas pela técnica *layer-by-layer*

A explicação preliminar da técnica *LbL* ilustra a grande flexibilidade inerente a esse método de construção de filmes multicamadas. As soluções polieletrólíticas devem apresentar concentração de polieletrólitos suficiente para promover o excesso de adsorção dessa substância pelo substrato, promovendo a neutralização e inversão de cargas da superfície [18, 34]. A alternância da carga da superfície resulta em um processo contínuo de montagem do filme entre

materiais carregados positiva e negativamente. Como biomateriais, especialmente proteínas e polissacarídeos, possuem sítios carregados em sua superfície, eles são geralmente utilizados no processo de deposição eletrostática do método *layer-by-layer* [12, 28, 35].

Para que ocorra a formação de filmes multicamadas por forças eletrostáticas é necessário que haja uma densidade de carga mínima tanto por parte do recobrimento formado quanto das cadeias polieletrólíticas a serem adsorvidas [20]. Quando ambos se encontram altamente carregados, a espessura do filme e a quantidade de polieletrólito depositada aumentam linearmente com o número de bicamadas depositadas. Esse comportamento é bastante comum para sistemas que utilizam polieletrólitos fortes, ou seja, compostos que se apresentam altamente carregados em uma ampla faixa de pH, *e.g.* os polímeros sintéticos PDAC/SPS (poli(cloreto de dialildimetil amônio) e poli(4-estireno sulfonato de sódio)) [36].

No entanto, esse modelo de crescimento linear e estratificado verificado para alguns pares de polieletrólitos fortes não é a única possibilidade existente no processo de construção dos filmes [12, 37, 38].

Para sistemas contendo os polipeptídeos PGA/PLL (poli(L-ácido glutâmico)/poli-L-lisina) o aumento linear do número de bicamadas depositadas resultou em um crescimento “exponencial” do filme [37]. Comparando esse sistema com filmes de SPS/PAH (poli(4-estireno sulfonato de sódio)/hidrocloro de poli(alilamina)), foi verificado que para os polímeros sintéticos, as camadas são formadas por pequenos glóbulos regulares que preenchem toda a extensão do filme, enquanto que as camadas dos filmes de PGA/PLL apresentam estruturas em conformações mais irregulares e enoveladas, levando a (i) um incremento “exponencial” na deposição de massa, (ii) mobilidade das cadeias fracamente adsorvidas no interior do filme (*in and out diffusion*) [38] e (iii) possibilidade de interações dos polieletrólitos por ligações hidrogênio, visto que polipeptídeos também podem interagir entre si por interações não-eletrostáticas.

Alguns polieletrólitos se comportam em solução como ácidos ou bases fracas. Assim, o grau de ionização destes compostos vai ser favorecido ou não pelo pH do meio, dependendo da constante de dissociação ( $pK_o$ ) do composto. O processo de formação de multicamadas a partir de polieletrólitos fracos pode ser controlado pelo pH das soluções polieletrólíticas uma vez que

este parâmetro influencia a densidade de carga das cadeias dos polieletrólitos afetando suas conformações e interações mútuas [33].

Sendo assim, existem determinadas condições em que estes compostos apresentam cadeias bastante carregadas, em conformações mais regulares e lineares. Isso é atribuído ao fato de que polieletrólitos altamente carregados exibem conformações lineares e esticadas devido às fortes repulsões entre os segmentos de sua cadeia [36]. A adsorção de moléculas em conformações mais lineares leva à formação de filmes mais finos [39]. Já em condições desfavoráveis de carga as cadeias destes polieletrólitos, que se encontram pouco ionizadas, assumirão conformações mais enoveladas e irregulares, devido às baixas repulsões eletrostáticas entre os segmentos de sua cadeia. Essa conformação do polieletrólito em solução é transmitida para o filme em construção, o que resulta em revestimentos mais espessos do que aqueles provenientes de polieletrólitos fortemente carregados [36, 39]. Essas diferentes morfologias dos compostos em solução levam a desvios do comportamento de deposição linear de massa por ciclo de montagem do filme.

O sistema PAH/PAA (hidrocloro de poli(alilamina) e poli(ácido acrílico)), um par de polieletrólitos sintéticos fracos, é outro exemplo que ilustra a importância do grau de carga da solução para a formação das multicamadas. Filmes mais espessos foram obtidos quando ambos os polieletrólitos estavam fracamente carregados (pH 11 para o PAH e pH 3 para o PAA), enquanto filmes mais finos foram obtidos quando o sistema PAH/PAA se encontrava completamente carregado (pH 3 para o PAH e pH 11 para o PAA) [36].

Dessa forma, é possível ajustar com precisão no nível molecular a estrutura e propriedades dos filmes multicamadas. Shiratori e Rubner [33] verificaram que o processo de deposição de PAA/PAH pode ser completamente controlado pelo ajuste do pH das soluções de imersão. Foi possível depositar desde camadas extremamente finas ( $<10 \text{ \AA}$ ) até recobrimentos mais espessos ( $>120 \text{ \AA}$ ) e, em alguns casos, evitar que o processo de deposição dos polieletrólitos ocorresse. Assim, o pH se torna um fator chave no caso de polieletrólitos fracos, já que com o devido ajuste do pH das soluções polieletrólíticas, o grau de ionização desses polímeros pode ser alterado substancialmente.

É necessário que tanto a superfície quanto a cadeia de polieletrólito a ser adsorvida apresentem uma densidade de cargas mínima para que haja formação dos filmes multicamadas.

Voigt *et al.* [20] avaliaram a importância das interações eletrostáticas para estabilidade e propriedade de filmes multicamadas. O poliânion forte SPS (poli(estireno-sulfonato) foi combinado com o polycation poli(cloreto de dialildimetil amônio) (PDAC), o qual podia ter seu grau de carga (DC) modificado pela adição de um monômero neutro (N-metil-N-vinil-acetamida, NMVA). Foi verificado que para filmes com DC de 75% e 100%, o aumento do número de bicamadas leva, estritamente, ao aumento da espessura do filme. Filmes contendo PDAC com DC de 100% apresentaram crescimento praticamente linear. Nos casos de filmes com DC de 53%, a partir da segunda camada SPS não há mais adsorção de polieletrólito. Além disso, foi verificado que a rugosidade do filme varia em função do DC e alcança um máximo quando o grau de carga do polycation é de 75%. Dessa forma, a modificação de parâmetros que alteram a densidade de carga das soluções polieletrólíticas levam à deposição de filmes com diferentes características morfológicas.

Evidências experimentais suportam a ideia de que, ao aumentar a concentração de sal em um dado sistema, a espessura do filme e a quantidade adsorvida de polieletrólito podem aumentar exponencialmente com o número de bicamadas depositadas [37, 40]. A presença de sal na solução polieletrólítica altera drasticamente a configuração das cadeias em solução e por variações sobre esse parâmetro é possível modificar a espessura [41] e rugosidade [42] do filme. Isso porque estruturas que antes se apresentavam estendidas e lineares, tornam-se enoveladas devido à presença dos íons do sal em solução, levando a filmes com morfologias mais irregulares e rugosas [43]. Esse aumento de força iônica leva a uma nova situação de carga do meio, provocando um rearranjo dos segmentos dos polieletrólitos em solução.

Tendo por base a influência do sal no meio de deposição, a espessura dos filmes pode ser controlada a partir da variação da concentração de contraíons das soluções polieletrólíticas (íons de NaCl + contraíons dos polieletrólitos) [20]. Até uma força iônica de 0,5 M, filmes de PDAC/SPS com DC de 75% e 89% cresceram linearmente como aumento da concentração de contraíons. Para cadeias completamente carregadas, esse aumento foi menos pronunciado e para DC de 53% ou menos, a força iônica não exerceu influência na espessura dos filmes. Foi verificado que, se não há supercompensação de cargas para a formação do sistema multicamadas ( $DC < DC_{min}$ ), a presença de sal não causa influência na espessura do filme. Seguindo o mesmo raciocínio, Schoeler *et al.* [22] realizaram ensaios com SPS e PDAC–NMVA e, acima do valor

crítico de densidade de carga (entre 75% e 53%), o aumento na concentração de sal resultou em filmes mais espessos e rugosos. No entanto, quando  $DC < DC_{\min}$ , a presença de sal não causa mudanças significativas na estrutura do filme.

Materiais inovadores e funcionais sempre foram almeçados e o emprego de modificação de superfícies no nível molecular tem grande impacto no sucesso desta busca. A modificação de superfícies resultou numa multiplicidade de novas propriedades que anteriormente não eram associados ao material original. Essas mudanças incluem modificações das propriedades elétricas, óticas, magnéticas, físico-químicas e biológicas do material em questão. Como consequência, várias disciplinas das ciências naturais sofreram o impacto do estudo de modificações de superfície, alterando as propriedades fundamentais dos materiais no nível molecular. Pelo método *LbL*, é possível produzir dispositivos para as mais variadas funções, como liberação de fármacos [44], adesão de células [12], superfícies antifúngicas [16], antibacterianas [13], super-hidrofílicas [45], antirreflexo [46], entre outras.

Por alteração de propriedades simples é possível arquitetar filmes com diferentes propriedades químicas e estruturais de forma a adequá-los para as mais diversas aplicações.

### 2.3. Revestimentos antimicrobianos construídos pelo método *LbL*: importância da modificação/funcionalização de superfícies

A maioria das superfícies (de medicamentos, alimentos, tapetes, luvas, tecidos) pode ser revestida com compostos antimicrobianos [47, 48]. Substratos diversos como vidro, polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD), polipropileno (PP), nylon, polietileno tereftalato (PET) foram tratados com sais quaternários de amônio [49]. Fibras de nylon foram revestidas com compostos antibacterianos pela deposição de vapor químico (CVD) [2]. Polímeros antibacterianos foram formados diretamente sobre vidro e papel através de polimerização radicalar controlada por transferência de átomos (ATRP) [50]. Substratos de aço inoxidável foram cobertos com compostos à base de prata que formaram duradoura superfície antibacteriana, apesar dos ciclos repetidos de limpeza, em ambientes secos ou úmidos [51]. A preocupação crescente do público e da indústria para a contaminação cruzada e o crescimento de bactérias

induziu o desenvolvimento de muitas aplicações, tais como embalagens antibacterianas para a indústria alimentícia, a fim de evitar adesão de bactérias no alimento [52]. Embalagens antibacterianas que prolongam a vida útil dos alimentos perecíveis, o que é necessário para o transporte em longas distâncias, baseiam-se essencialmente nas propriedades antibacterianas de compostos de prata [48] e de quitosana [53, 54]. Vários tipos de embalagens baseados em nanocompósitos foram desenvolvidos com excelente desempenho [54, 55].

Outra estratégia aplicada à obtenção de materiais antimicrobianos é a incorporação de prata [56], na forma de íons ou nanopartículas, em materiais comuns, como plásticos [57, 58], aço [47] ou fibras de tecido [30, 59]. A ação antimicrobiana da prata é normalmente atribuída a sua interação com o material genético dos micro-organismos, impedindo a sua divisão celular.

A técnica do *layer-by-layer*, ao empregar materiais bioativos, permite produzir superfícies antimicrobianas atóxicas, biodegradáveis e adequadas para aplicações biomédicas ou na indústria alimentícia.

Micro-organismos podem ser destruídos pelo rompimento de suas membranas celulares sob a ação de antibióticos, iodo ou metais pesados [50, 51], ou por policações [13], detergentes ou solução de etanol 70%, processos mecânicos ou radiação (calor, luz ultravioleta). Prata é outro agente biocida muito conhecido, com baixa toxicidade para células de mamíferos em baixas concentrações [47, 60, 61]. A adição de metais (prata [57], cobre [62]) ou flúor [63] a películas protetoras provou ser eficaz contra bactérias.

Os micro-organismos acompanham os seres humanos desde o início da evolução. Muitas vezes essas associações trazem uma série de benefícios, como é o caso, por exemplo, das bactérias intestinais que auxiliam no processo de digestão e das leveduras utilizadas no processo de fermentação de pães e bebidas.

Em outras situações, porém, esses micro-organismos são causadores de doenças em seres humanos. Além de dispositivos médico-hospitalares e implantes, há outros campos de interesse para materiais que possam constituir superfícies antimicrobianas, como a preservação de alimentos, higiene e *health care*, sistemas de ar condicionado, reservatórios de água, entre outros [1, 2].

A compreensão e manipulação de propriedades físicas e químicas de materiais possibilitam a construção de superfícies com funcionalidade antimicrobiana. Apesar da complexa

interação entre superfície/micro-organismo, atualmente três estratégias são abordadas quanto ao projeto de superfícies antimicrobianas [1, 64]:

- ✓ Resistência à adesão [4, 15]: consiste na obtenção de uma superfície capaz de repelir células microbianas, evitando assim estágios avançados da adesão de micro-organismos que leva à formação de biofilmes estáveis;
- ✓ Ação por contato (*contact killing*) [13, 51]: esse mecanismo de ação consiste em eliminar ou retardar o crescimento de micro-organismos que aderem à superfície do material construído.
- ✓ Incorporação/liberação de compostos antimicrobianos [47, 51, 65]: íons metálicos, peptídeos e outros compostos antibióticos podem ser incorporados ao material que constitui a superfície para lhes atribuir a funcionalidade antimicrobiana. Nesse caso, o material deve ser arquitetado de forma a ser favorável à incorporação e liberação desses compostos.

As três estratégias previamente citadas são exploradas pela técnica *layer-by-layer*, tanto individualmente como de forma sinérgica, já que para potencializar a capacidade antimicrobiana de uma superfície mais de um mecanismo de ação contra micro-organismos pode ser utilizado [1, 51].

Os trabalhos a seguir mostram que a técnica *LbL*, mesmo empregando diferentes materiais e condições de tratamento, possibilita a montagem de estruturas capazes de prevenir a adesão e/ou crescimento de bactérias e fungos.

Lichter e Rubner (2009) [13] construíram filmes multicamadas formados pelo polícatión PAH (hidrocloro de poli(alilamina)) e o poliânion SPS (poli(4-estireno sulfonato de sódio)) e, ao estudar as condições de pH durante e após a construção dos filmes, constataram que é possível modificar a arquitetura do filme de tal maneira que materiais que a princípio não apresentam características antibacterianas passam a apresentá-las devido à exposição e mobilidade de cargas catiônicas presente nos materiais constituintes desses revestimentos. Isso porque é possível protonar e expor grupos funcionais catiônicos (responsáveis pelo *contact killing*) mesmo após a formação do filme. No caso, filmes multicamadas construídos em valores de pH alto foram

posteriormente imersos em  $\text{pH} < 2,5$ , o que possibilitou a abertura e mobilidade de grupos amino, que fornecem as *PEMs* a capacidade antimicrobiana.

Os resultados, apesar de bastante satisfatórios, foram melhores para a bactéria gram(+) *Staphylococcus epidermis* do que para a bactéria gram(-) *Escherichia coli*, o que pode ser atribuído ao fato de que a parede celular de bactérias gram(+) são mais simples e mais facilmente rompidas ao interagir com os grupos catiônicos das *PEMs* [64].

Fu e colaboradores (2005) [4] avaliaram a capacidade antibacteriana e antiadesiva de filmes multicamadas dos polímeros naturais heparina/quitosana utilizando *E. coli* como micro-organismo de teste. Neste trabalho foram depositados sobre substratos de PET aminolisado filmes de heparina e quitosana de 2 a 8 bicamadas nos valores de  $\text{pH}$  de 2,9; 3,8 e 6,0. A variação desse parâmetro está diretamente relacionada ao controle da composição superficial dos revestimentos formados, uma vez que é esperado que a capacidade antibacteriana dos filmes seja dependente da quantidade de quitosana presente em sua superfície. A concentração de bactérias reduziu mais rapidamente para *PEMs* construídas em  $\text{pH}$  3,8 e apresentou resultados mais lentos em  $\text{pH}$  6,0, valores nos quais, respectivamente, se observou maior e menor quantidade de cadeias de CHI na camada mais externa do filme. Em valores mais altos de  $\text{pH}$ , a quitosana apresenta menor quantidade de segmentos de sua cadeia carregados, adotando uma conformação globular e enovelada (*loops and tails*), levando à formação de filmes mais rugosos. A menor disponibilidade de segmentos carregados, que interagem com as células bacterianas, diminui a eficiência antimicrobiana dos recobrimentos em estudo.

Richert *et al.*(2004) [66] avaliaram as propriedades biológicas de filmes de quitosana e ácido hialurônico quanto à adesão de células bacterianas (*E. coli*) e também de condrócitos (células presentes no tecido cartilaginoso). A proposta foi avaliar a influência da força iônica das soluções de deposição na adesão dessas células sobre os filmes. Filmes construídos em força iônica de 0,15 mol/L mostraram-se mais resistente a adesão de células do que aqueles construídos em força iônica de  $10^{-2}$  mol/L. Estruturalmente, filmes construídos em maior valor de força iônica são mais espessos e menos rígidos, fatores que possivelmente não são favoráveis à adesão celular. Vasconcellos (2011) [11], também utilizando *PEMs* de quitosana e ácido hialurônico, preparadas em  $\text{pH}$  3,0, constatou que esses recobrimentos previnem a proliferação de

bactérias *S. epidermidis*, com resultados que apontam redução de até 99% de colônias bacterianas aderidas em substratos funcionalizados pela técnica *LbL*.

Li *et al.* (2006) [51] utilizaram duas estratégias para construção de uma *PEM* com dois níveis antibacterianos: (a) parte do filme consistia em um sistema de incorporação e liberação de nanopartículas de prata (AgNP) e (b) outra parte era formada por compostos de amônio quaternário, capazes de eliminar bactérias por contato. Testes com *E. coli* e *S. epidermis* mostram que, na ausência do sistema de liberação de AgNP, a eficiência de *contac killing* foi aproximadamente de 99%. Quando a *PEM* continha os dois níveis antibacterianos, esse valor foi superior a 99,99%.

Etienne *et al.* (2005) [16] funcionalizaram filmes multicamadas de PGA/PLL com um peptídeo antifúngico derivado da cromogranina A (CGA). Este peptídeo está presente na saliva e fluidos da gengiva, demonstrando a sua importância na proteção natural da cavidade bucal. Estudos *in vitro* demonstraram que este filme foi capaz de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans* em 65% e cessar completamente a proliferação do fungo filamentosso *Neurospora crassa*. Testes *in vivo* foram feitos suturando um disco de filme funcionalizado no tecido mucoso de ratos. Também foram realizados estudos com filmes não funcionalizados com CGA. Após 6 dias de estudos, sinais de candidíase foram observados nos discos de *PEM* não funcionalizados que entraram em contato com a mucosa dos animais. Já os discos que continham CGA praticamente não apresentaram traços de candidíase. Karlsson *et al.* (2010) [17] estudaram o mesmo tipo de filme, incorporando  $\beta$ -peptídeos e também obtiveram sistemas de liberação eficientes contra o crescimento e proliferação de *C. albicans* em testes *in vitro*.

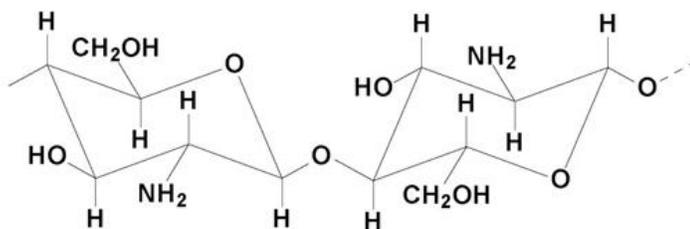
#### 2.4. Polímeros naturais aplicados em biomateriais

O grande número de polissacarídeos com diferentes estruturas e propriedades se apresenta como uma fonte de materiais para as mais diversas aplicações, especialmente no domínio dos biomateriais [10]. Quitosana, alginato de sódio e ácido hialurônico são exemplos de polissacarídeos que, além de apresentarem individualmente propriedades importantes no cenário dos biomateriais, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, também podem formar

complexos polieletrólitos para construção de filmes nanoestruturados, favorecendo a sinergia entre estes materiais.

#### 2.4.1. Quitosana

Do processo de desacetilação da quitina, presente na carapaça de crustáceos e exoesqueletos de artrópodes, é obtida a quitosana, designação para o biopolímero poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose]. Por apresentar propriedades antimicrobianas, sua aplicação vem sendo estudada em diversas áreas, como engenharia ambiental e biomédica. A estrutura química da quitosana é esquematizada na **Figura 2.2**. Quitosana, na forma de filme ou de nanopartículas, desperta interesse por suas propriedades antibacterianas [48, 67, 68] e antimicóticas [7, 69]. É um polissacarídeo linear, segundo biopolímero mais abundantes na natureza, depois da celulose [70]. O mecanismo básico proposto para explicar a atividade antimicrobiana de quitosana envolve as interações entre os grupos amino das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) de quitosana que são carregados positivamente em meios moderadamente ácidos ( $\text{pH} \approx 5,0$ ) e aumentam a permeabilidade da membrana celular, negativamente carregada, causando a ruptura e liberação de compostos intracelulares de microrganismos [70]. Dois outros mecanismos têm sido identificados como sinérgicos: quelação de metais em pequenas quantidades por interação com os grupos amino das unidades GlcN, inibindo a atividade enzimática e, no caso de células fúngicas, a passagem através da membrana celular que inibe a síntese de RNA [7].



**Figura 2.2** – Estrutura química da quitosana. Adaptada de Tao *et al.* (2007) [71].

O efeito antimicótico de diferentes tipos de quitosana foi avaliado sobre a espécie *Candida albicans* [69, 72-74], micro-organismo capaz de causar infecções à pele, mucosas e

vísceras humanas. No entanto, é extremamente importante ressaltar que a quitosana se apresenta de diversas formas quanto à origem, grau de acetilação, massa molecular, viscosidade, além de poder ser dissolvida em meios ácidos ou em somente água. Frente a essa diversidade de quitosanas, o micro-organismo tende a responder de forma diferente nos testes antimicóticos. O efeito da quitosana está aparentemente relacionado às interações iônicas entre os grupos protonados amino do polímero com a parede celular carregada negativamente dos micro-organismos. Palmeira-de-Oliveira e colaboradores [73] verificaram em ensaios de cromatografia por troca iônica que espécies de *Candida* com parede celular mais negativa, ou seja, com mais afinidades a resinas positivas, são também mais sensíveis à quitosana. Também foi verificado que quanto maior o grau de acetilação do polímero, maior o efeito antifúngico sobre os micro-organismos, porém o efeito da massa molecular ainda não foi totalmente compreendido e diverge em alguns trabalhos da área [69, 72].

Ziani *et al.* (2009) [75] avaliaram a atividade antimicótica da quitosana contra três tipos de fungos: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* e *Rhizopus oryzae* e constataram que a quitosana, tanto em solução quanto na forma de filmes, foi efetiva contra o microrganismo *A. alternata*. No entanto, o crescimento de *R. oryzae* e *A. niger* só foi efetivamente contido quando a quitosana se apresentava, respectivamente, na forma de solução e de filmes. Assim, a capacidade antifúngica da quitosana é real, mas o total entendimento do mecanismo de ação ainda não foi alcançado.

Roller e Covill (1999) [76] avaliaram o efeito da quitosana em solução sobre 15 diferentes espécies de fungos e verificaram que entre 7 espécies de fungos filamentosos, 3 deles foram resistentes à concentração máxima de 10 g/L de quitosana enquanto 7 de 8 leveduras testadas apresentaram inibição em sua taxa de crescimento quando em contato com quitosana ao nível de 0,1 g/L. O autor destacou que o mecanismo de ação da quitosana é extremamente depende do pH do meio, e que basicamente duas hipóteses podem ser formuladas: (a) a capacidade da quitosana em atuar como um agente quelante capaz de se ligar a nutrientes do meio necessários ao crescimento dos micro-organismos e, na falta desses nutrientes, o crescimento celular torna-se mais lento ou (b) os grupamentos amino da quitosana, altamente reativos com grupos aniônicos que compõe a parede celular dos micro-organismos, podem desestabilizar essa célula, impedindo o transporte de solutos essenciais ao seu desenvolvimento, levando ao rompimento da parede celular e desativando-a.

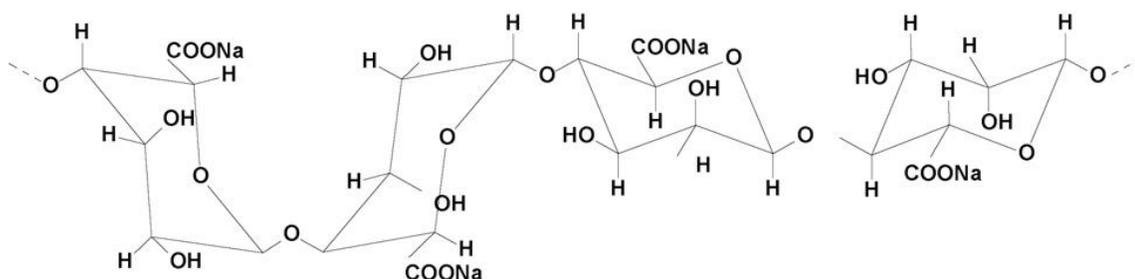
De uma forma geral, os trabalhos evidenciam que a complexidade da interação quitosana/célula baseia-se no fato de que, além da diversidade de micro-organismos existentes, a quitosana pode se apresentar de diversas formas, no que diz respeito a sua massa molecular, concentração e o pH do meio [4, 77, 78].

#### 2.4.2. Alginato de Sódio

Alginato é a designação para o polímero de origem natural encontrando majoritariamente em algas marrons, como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. A estrutura do alginato de sódio é apresentada na **Figura 2.3**. Polímeros de alginato são uma família de polissacarídeos lineares ramificados que contêm quantidades variáveis de resíduos do ácido  $\beta$ -D-manurônico e do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico. [8, 79].

No cenário biotecnológico, o alginato tem sido altamente aplicável à liberação de proteínas, medicamentos e proteção de ferimentos devido a suas propriedades de formação de gel e biocompatibilidade [8, 80].

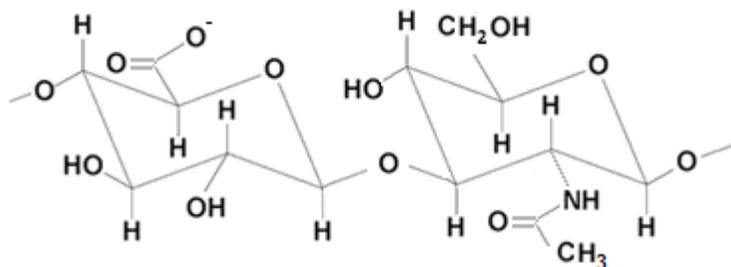
Por ser um polieletrólito negativo, sua associação com a quitosana tem sido bastante explorada na construção de filmes pela técnica *LbL* [5, 11].



**Figura 2.3** – Estrutura química do alginato de sódio. Adaptado de Tao *et al.*(2007) [71].

### 2.4.3. Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico, representado na **Figura 2.4**, está presente em tecidos neurais, conectivos e epiteliais de mamíferos. Consiste em um biopolímero composto de ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina.



**Figura 2.4** – Estrutura química do ácido hialurônico. Adaptado de Rinaudo (2008) [10].

Na área dos biomateriais, o ácido hialurônico apresenta propriedades interessantes para a sua aplicação neste cenário, como biocompatibilidade e aplicações potenciais em engenharia de tecidos. Por consequência, tem sido aplicado em diversos campos da medicina, como em neurocirurgia, recobrimento de ferimentos e desenvolvimento de cosméticos [81].

Assim como o alginato, o HA também é um polieletrólito negativo bastante associado à quitosana para a construção de membranas polieletrólíticas [3, 29, 82].

# Capítulo 3 – Materiais e Métodos

---

## 3.1. Materiais

Quitosana (CHI, baixo peso molecular, grau de desacetilação entre 75-85%), ácido hialurônico (HA, de *Streptococcus equi sp.*), alginato de sódio (ALG, baixa viscosidade e baixa massa molecular), poli(etileno imina) (PEI, MM =  $7,5 \times 10^5$  g/mol, 50% (m/m) em solução aquosa) e os corantes azul de alciano (MM = 1298,86 g/mol) e rosa de bengala (MM = 973,67 g/mol) são da empresa Sigma-Aldrich (USA). Estes e os demais reagentes usados são de grau analítico e são utilizados sem prévias purificações. Todas as soluções utilizadas são preparadas com água Milli-Q<sup>®</sup> 18M $\Omega$ . Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) são da marca Synth (Brasil).

## 3.2. Preparo das soluções de biopolímeros e dos filmes nanoestruturados

### 3.2.1. Preparo das soluções de biopolímeros

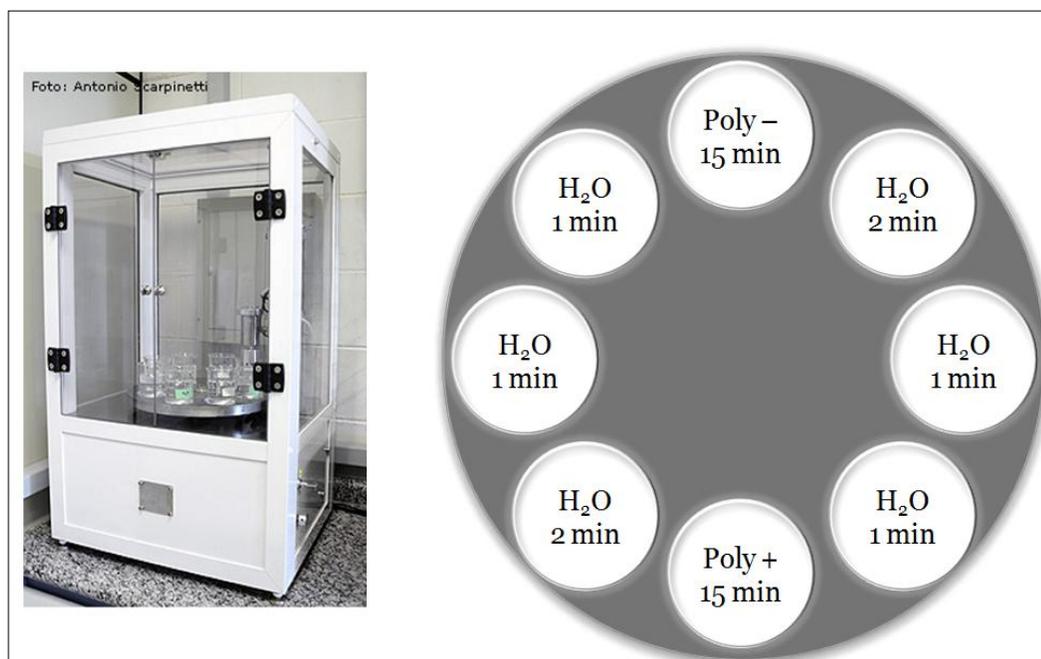
Soluções de CHI, HA e ALG, na concentração de 0,1% (w/v) em água Milli-Q<sup>®</sup> 18M $\Omega$ , foram preparadas solubilizando-se os polímeros em água ou soluções de NaCl 0,2 mol/L. Estas soluções tiveram o pH ajustado para  $3,00 \pm 0,10$  ou  $5,00 \pm 0,10$  com soluções de HCl ou NaOH, ambas 1,0 mol/L. No caso da solução de quitosana, realizou-se a adição do ácido acético glacial à solução, a fim de se obter uma solução com 0,1 mol/L de ácido acético. O tempo de solubilização foi de 12 horas.

### 3.2.2. Preparo dos substratos e método de deposição dos filmes

Lâminas de vidro da marca Knittel (Alemanha), com dimensões de 76x26x10 mm foram lavadas em uma solução de detergente e deixadas em banho ultrassônico imersas em solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L e água Milli-Q<sup>®</sup>, respectivamente, durante 16 min cada. A fim de favorecer a adesão de camadas biopolímeros ao substrato e proporcionar um filme mais

homogêneo, foi preparada uma pré-camada de PEI, na concentração de 1% (w/v), ajustada a pH 4,0, contendo 0,5 mol/L de NaCl. A pré-camada, por ser um polieletrólito forte, é capaz de recobrir todo o substrato e aumenta a sua densidade de cargas [37, 83].

Utilizou-se o equipamento automatizado *LbL Nanostructure Pro* (**Figura 3.1**), desenvolvido em nosso laboratório, que realiza as imersões das lâminas de vidro tanto nas soluções de biopolímeros quanto nas soluções de lavagem. Pelo *software* associado ao equipamento, foram fixados os tempos de lavagem e de imersão das lâminas de vidro nas soluções de biopolímeros, bem como o número de bicamadas desejado. Uma bicamada consiste no conjunto formado pela adesão de uma camada positiva com uma negativa. Em todos os casos, a deposição das *PEMs* foi realizada por imersões alternadas dos substratos de vidro em soluções de polieletrólitos de cargas opostas durante 15 minutos, intercaladas por lavagens em água Milli-Q<sup>®</sup> ou solução de NaCl, durante 2, 1 e 1 minuto(s), respectivamente. Os filmes foram constituídos de 10 bicamadas de HA/CHI e ALG/CHI, o que indica que a camada de topo é a quitosana.



**Figura 3.1** - *LbL Nanostructure Pro* e tempos de deposição do substrato nas soluções de polímeros e de lavagem com H<sub>2</sub>O.

A notação a seguir vai ser bastante adotada no decorrer do trabalho:

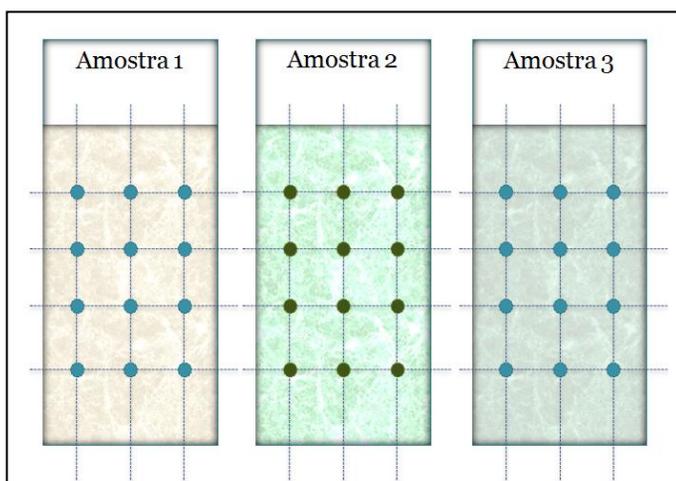
(Poliânion/Policátion<sub>pH do meio</sub>) n° de bicamadas

Essa notação identifica quais foram os polímeros utilizados, em que pH as soluções polieletrólíticas foram preparadas e o número de bicamadas que compõem o recobrimento.

### 3.3. Caracterização dos filmes multicamadas

#### 3.3.1. Perfilometria

A partir do perfilômetro Dektak (150), Veeco (EUA), foram realizadas análises referentes à espessura dos filmes, com a ponta do equipamento aplicando uma força de 1 mg sobre as amostras e percorrendo uma extensão de 500 µm, durante 30 s. Com o auxílio de uma lâmina foi feito um corte no filme. A ponta de diamante do equipamento inicia a varredura sobre a superfície do filme. Ao passar pela fenda provocada pelo corte, o software fornece uma imagem equivalente a um degrau. A diferença vertical observada na figura gerada pelo programa é equivalente ao valor de espessura do filme. Os pontos de leitura das amostras são esquematizados na **Figura 3.2**.



**Figura 3.2** - Esquematização dos pontos de leitura da espessura dos filmes nanoestruturados pela técnica de perfilometria. Para cada amostra, foram feitas 12 leituras de espessura.

### 3.3.2. Ângulo de Contato

Para avaliar o caráter hidrofílico da camada superior (externa) da superfície é feita a medida do ângulo de contato, fazendo-se uso do goniômetro Easy Drop DSA150 (Krüss, Alemanha) situado no Instituto de Química da Unicamp. Gotas de água do Milli-Q® de 5 µL em condição ambiente são colocadas em contato com as PEMs por intervalos de 3 a 5 s. Uma câmera fornece a imagem das gotas na superfície dos filmes e por meio desta o software associado ao equipamento fornece valor do ângulo de contato.

### 3.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A partir da técnica de microscopia de força atômica, que permite estudar com elevada resolução (em nível de angstroms) a topografia de superfícies, foi analisada a rugosidade da superfície dos filmes em imagens tridimensionais no equipamento Nanosurf Easyscan 2 AFM, Nanosurf (Suíça). O modo de operação foi o *tapping-mode* e as superfícies dos filmes ficaram expostas ao ar.

### 3.3.4. Planejamento de Experimentos (DoE)

O planejamento de experimentos é uma ferramenta com base estatística para determinar quais fatores têm maior impacto sobre uma determinada resposta. É ainda possível verificar, com certo nível de precisão ( $\alpha$ ), se esse fator afeta estatisticamente a resposta de forma significativa. A seguir, são apresentados alguns conceitos úteis para o entendimento do planejamento experimental aplicado a este trabalho.

- ❖ Fator: São as variáveis independentes do sistema em estudo. Dois fatores foram avaliados: o **pH** e a **força iônica** das soluções polieletrólíticas.
- ❖ Resposta: São as variáveis dependentes do sistema em estudo. As respostas obtidas foram **espessura**, **rugosidade** e **disponibilidade de grupos funcionais**.
- ❖ Sistema: Foram avaliados dois sistemas: **ALG/CHI** e **HA/CHI**

- ❖ Nível: Condição de operação de cada um dos fatores de controle investigadas nos experimentos. São comumente identificados como nível baixo (–) e nível alto (+). Para os experimentos realizados nesta seção, foram verificados a influência do pH (**3,0 vs. 5,0**) e força iônica (**0,0 M vs. 0,2 M [NaCl]**).
- ❖ Efeito: Variação ocorrida na resposta quando se muda do nível baixo (–) para o nível alto (+). O valor do efeito é uma forma de quantificar a influência das variáveis independentes sobre a resposta de interesse.
  - Efeito principal: É a diferença média observada na resposta quando se muda o nível das variáveis independentes investigado.
  - Efeito de interação: A interação entre as variáveis independentes não é negligenciada quando se aplica o *DoE*. Dois ou mais fatores afetam a resposta de forma dependente, como vai ser discutido na seção de resultados.
- ❖ Erro–padrão: Medida da variação da média amostral calculada.

### 3.3.5. UV-VIS

A escolha dos polieletrólitos e dos parâmetros de deposição, tal como variação de pH e força iônica, pode ser utilizada para se obter uma propriedade específica dos recobrimentos de interesse, como a disponibilidade de grupos funcionais livres, como o  $\text{COO}^-$  e o  $\text{NH}_3^+$ . A literatura oferece diversos trabalhos que utilizaram corantes iônicos, capazes de interagir com grupos carregados de filmes finos, como indicativo de potencial para incorporação de partículas metálicas ou interação com células [9, 29, 64, 84-87].

Os primeiros estudos envolvendo corantes iônicos e filmes *LbL* foram conduzidos por Yoo *et al.* (1998) que verificaram que é possível monitorar mudanças de ângulo de contato (hidrofilicidade) na última camada de filmes de PAA/PAH por meio da incorporação do corante azul de metileno (AM) [14].

As soluções dos corantes iônicos rosa de bengala e azul de alciano (0,01 mol/L) foram preparadas solubilizando-se os corantes em água Milli-Q<sup>®</sup> e o pH das soluções foi ajustado para 7. As amostras foram imersas durante 15 min em soluções contendo os corantes. Posteriormente,

as amostras foram extensivamente lavadas com água Milli-Q<sup>®</sup> (com pH igual ao pH do corante) durante 2 min em duas vezes consecutivas. As leituras de absorvância foram feitas no espectrômetro HP-8453, Hewlett-Packard (EUA). Estes corantes são conhecidos por interagirem apenas com grupos funcionais livres, não sendo capazes de deslocarem ou interagirem com os complexos polieletrólíticos formados [14, 29].

O corante azul de alciano é um corante catiônico capaz de se ligar a grupos livres de ácido carboxílico (grupos  $\text{COO}^-$  que não tem ligações iônicas com grupos amino de CHI) presentes no HA e no ALG. Os picos do azul de alciano são observados no comprimento de onda de 617 nm.

A avaliação da disponibilidade dos grupamentos iônicos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) foi feita a partir da incorporação do corante rosa de bengala, cujo pico de absorvância é observado no comprimento de onda de 567 nm. A incorporação destes corantes foi realizada de acordo com procedimento utilizado por Vasconcellos e colaboradores [29].

### 3.3.6. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

As alterações químicas que ocorrem na superfície durante a formação de recobrimentos multicamadas podem ser seguidas *in situ* utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Um espectro de infravermelho representa uma impressão digital de uma amostra com picos de absorção, que correspondem às frequências de vibrações entre as ligações dos átomos que constituem o material. Como cada material diferente é uma combinação única de átomos, não há como dois compostos produzirem exatamente o mesmo espectro de infravermelho. Portanto, a espectroscopia de infravermelho pode resultar em uma identificação positiva (análise qualitativa) de cada tipo diferente de material.

Essa caracterização é particularmente útil para um comparativo entre filmes compostos por materiais diferentes, visando detectar em qual amostra há maior disponibilidade de grupos funcionais livres, como  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ . O equipamento utilizado é o modelo Nicolet 6700 FT-IR, da marca Thermo Scientific (Estados Unidos), alocado no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (LRAC/FEQ).

### 3.3.7. Incorporação de íons prata às PEMs de biopolímeros

As PEMs (HA/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub> e (ALG/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub> foram imersas em solução 1000 ppm de acetato de prata (Sigma – EUA) por 60 minutos e submetidas a 3 lavagens com água por 2, 1 e 1 min respectivamente. As soluções de AgCH<sub>3</sub>COO e de lavagem das PEMs apresentavam pH = 7,00 ± 0,10. Para avaliar se o processo levou a incorporação de partículas de prata, utilizaram-se as técnicas de FTIR, AFM, UV-Vis e de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

### 3.3.8. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com Módulo de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

O Microscópio Eletrônico de Varredura convencional é utilizado para análise de superfície e, por meio de um integrador de EDS, permite uma microanálise elementar da amostra. Com o sistema EDS é possível identificar elementos de Carbono a Urânio com limite de detecção de 0,5 % em massa. Utilizou-se a técnica de EDS para fazer o mapeamento de íons de prata nos filmes de (HA/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub> e (ALG/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub>, após a etapa de incorporação de Ag<sup>+</sup> aos mesmos.

Apesar das medidas realizadas por EDS serem de caráter qualitativo, a mesma pode ser utilizada na análise de regiões (~1 μm<sup>3</sup>) a título de comparação da presença de determinado elemento. O mapeamento foi feito no LRAC (Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração) da FEQ/Unicamp utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo: Leo 440i) com integrador de EDS (espectroscopia por dispersão de energia de raios X) (modelo: 6070) da marca LEO ElectronMicroscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). Os parâmetros para análise foram 20kV de tensão, para um tempo de mapeamento de 2 minutos e aumento de 100 vezes.

### 3.3.9. Efeito dos filmes de biopolímeros frente à espécie *Candida albicans*

#### 3.3.9.1. Micro-organismos

Para a realização dos testes, foi utilizada a cepa *Candida albicans* (CEMM 05-4-032) pertencente à micoteca do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

#### 3.3.9.2. Recobrimentos

Foram testados 8 tipos de filmes de biopolímeros e lâminas de vidro com e sem a pré-camada de PEI, além das amostras com prata. Cada tipo foi cedido ao menos em triplicata, sendo os mesmos mantidos em laminário a 25-28 °C, até o momento do uso (**Tabela 3.1**).

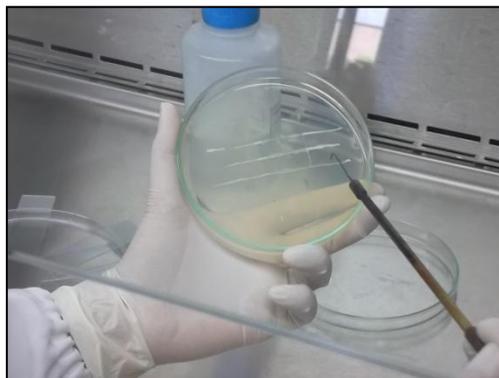
**Tabela 3.1** – PEMs utilizadas nos testes com *C. albicans*

Numeração das laminas	Recobrimentos
2 / 3 / 4	(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>
6 / 7 / 8	(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>
10 / 11 / 12	(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> 200mM NaCl
14 / 15 / 16	(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> 200mM NaCl
22 / 23 / 24	(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>
26 / 27 / 28	(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>
30 / 31 / 32	(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> 200mM NaCl
34 / 35 / 36	(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> 200mM NaCl
38 / 39 / 40	PEI <sub>4</sub> 500mM NaCl
42 / 43 / 44	Vidro
169/171/172/198/200	(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> Ag <sup>+</sup>
181/182/184/215/216	(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> Ag <sup>+</sup>

### 3.3.9.3. Prova do microcultivo de levedura

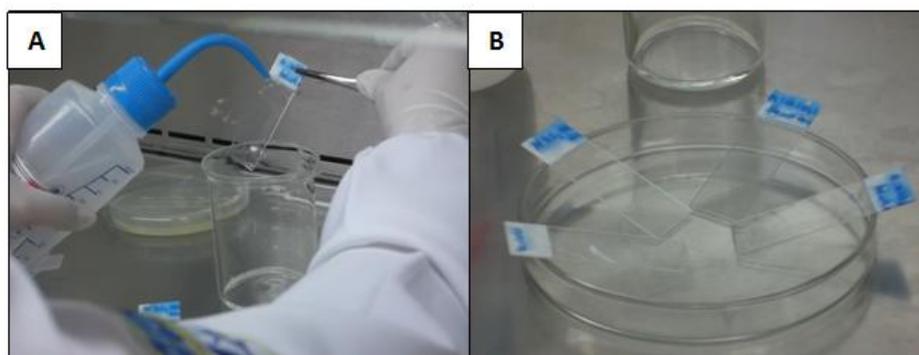
O efeito inibitório dos polímeros frente à *Candida albicans* foi avaliado a partir da técnica de microcultivo de levedura segundo Sidrim e Rocha (2004) [88]. A prova de microcultivo possibilita o estudo micromorfológico das leveduras em ágar *corn-meal* com Tween 80.

Em cabine de fluxo laminar, a cepa de *Candida albicans* foi repicada em ágar batata e incubada a 30°C, por 24h. Após o crescimento, com o auxílio de uma agulha estéril, foi retirada uma única colônia da levedura, a qual foi levada para uma placa de Petri, contendo meio ágar *corn-meal* acrescido de tween 80. Foram feitas três estrias paralelas, medindo em torno de 6 a 7 cm de extensão e equidistantes 1 cm umas das outras (**Figura 3.3**).

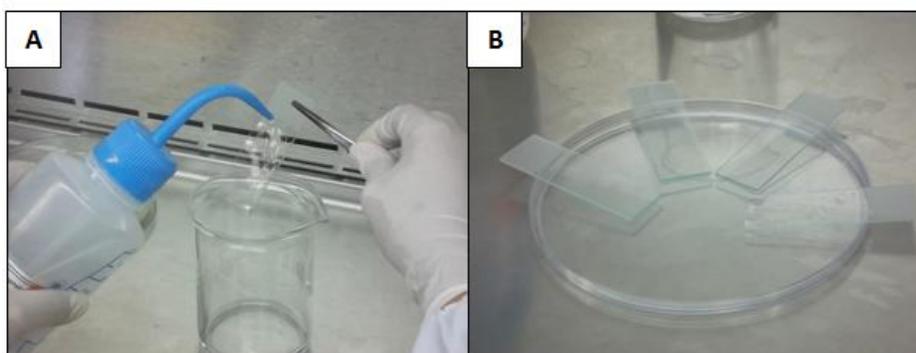


**Figura 3.3** – Estrias com *Candida albicans* em placa de Agar Corn-Meal Tw80

As lâminas de vidro contendo os polímeros, bem como lâminas de vidro controle (sem recobrimento dos polímeros) foram embebidas com álcool 70% (**Figuras 3.4A e 3.5A**) e foram deixadas em repouso em um suporte até a secagem das mesmas dentro do fluxo laminar (**Figuras 3.4B e 3.5B**).

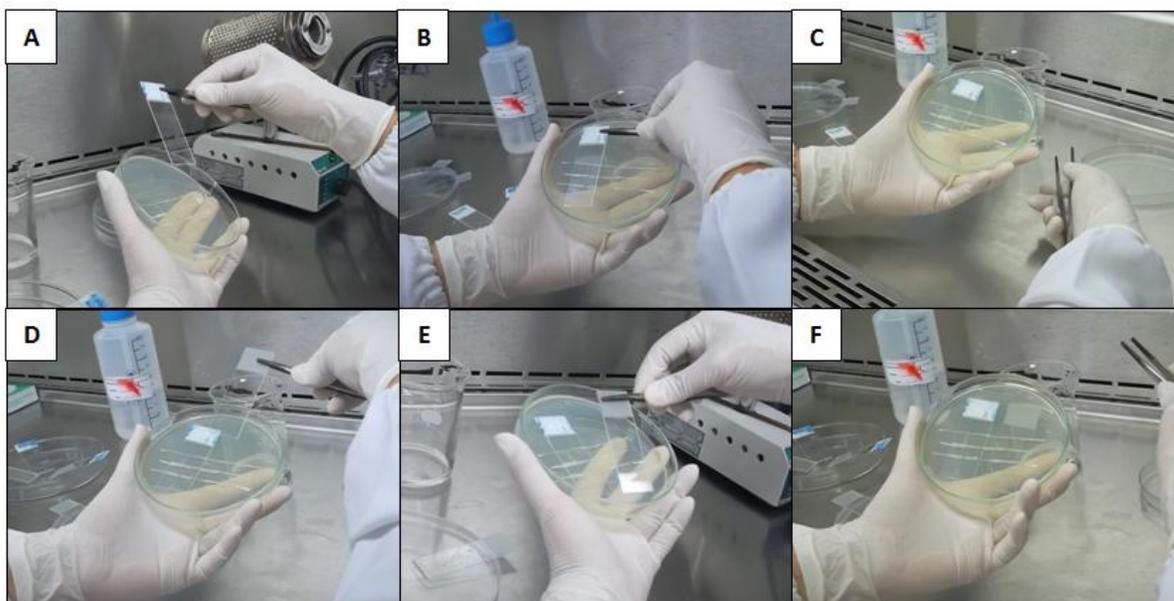


**Figura 3.4** – Lâminas com polímeros lavadas com álcool 70% (A) e deixadas em repouso para secagem (B).



**Figura 3.5** – Lâminas controle (sem polímero) lavadas com álcool 70% (A) e deixadas em repouso para secagem (B).

Posteriormente, as lâminas foram transferidas para as placas contendo ágar *corn-meal* com tween 80, sendo posicionadas sobre as três estrias feitas no meio e pressionadas delicadamente com uma pinça, para retirar o ar retido entre a lâmina e a superfície do ágar. Foram utilizadas 1 lâmina recoberta com os polímeros e 1 lâmina controle para cada placa (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** – A/B/C: Lâmina com polímero sendo posicionada sobre as estrias no meio ágar;  
D/E/F: Lâmina controle sendo posicionada sobre as estrias no meio ágar.

As placas foram armazenadas a temperatura de 30°C, durante 20 horas e re-incubadas durante 7 dias para posterior leitura em microscópio.

# Capítulo 4 – Resultados e Discussão

## 4.1. Espessura dos Filmes

Foi avaliada a influência das condições de pH e força iônica das soluções no processo de preparação das *PEMs* de biopolímeros, sendo os resultados obtidos mostrados na **Tabela 4.1**. São apresentados os valores de média e desvio padrão das medidas de espessura de amostras obtidas em três bateladas distintas em cada uma das condições experimentais estudadas.

**Tabela 4.1** – Espessura dos filmes de biopolímeros. DP é o desvio-padrão, F.I. é a força iônica das soluções de polímeros e Am. é a amostra.

<i>Espessura (Å)</i>							
<i>Filme</i>	<i>pH</i>	<i>F.I. (M NaCl)</i>	<i>Am. 1</i>	<i>Am. 2</i>	<i>Am. 3</i>	<i>Média (Å)</i>	<i>DP (Å)</i>
ALG/CHI	3	0,0	427	404	395	408	17
ALG/CHI	3	0,2	459	476	556	497	52
ALG/CHI	5	0,0	110	129	119	119	09
ALG/CHI	5	0,2	336	346	323	335	12
HA/CHI	3	0,0	6592	7865	6321	6926	825
HA/CHI	3	0,2	3039	2714	2775	2843	173
HA/CHI	5	0,0	550	522	614	562	47
HA/CHI	5	0,2	1598	1872	1759	1743	138

Realizou-se uma análise estatística da influência (efeitos) do pH e força iônica na espessura dos filmes (resposta), a partir do *software* Minitab<sup>®</sup>, sendo os resultados obtidos apresentados na **Tabela 4.2** para o sistema ALG/CHI e **Tabela 4.3** para os filmes de HA/CHI. Optou-se por realizar uma análise dos efeitos separadamente para os recobrimentos de ALG e HA, ao invés de considerar o tipo de poliânion como outro fator, uma vez que a força iônica apresentou um comportamento distinto de acordo com os pares de polieletrólitos estudados. Com nível de significância  $\alpha$  de 0,05, os valores de  $p < \alpha$  indicam que os efeitos são significativos [89].

**Tabela 4.2**– Efeito do pH e F.I. sobre a espessura dos filmes de ALG/CHI.

	<i>Efeito</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
<i>Média</i>	340	8,13	41,84	0,0000
<i>pH</i>	-225	16,26	-13,86	0,0000
<i>F.I.</i>	152	16,26	9,38	0,0000
<i>pH x F.I</i>	64	16,26	3,92	0,0044

**Tabela 4.3**– Efeito do pH e F.I. sobre a espessura dos filmes de HA/CHI.

	<i>Efeito</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
<i>Média</i>	3018	123,42	24,46	0,0000
<i>pH</i>	-3732	246,85	-15,12	0,0000
<i>F.I.</i>	-1451	246,84	-5,88	0,0004
<i>pH x F.I</i>	2632	246,84	10,66	0,0000

Para uma maior compreensão dos efeitos apontados nas tabelas acima, é preciso avaliar o grau de ionização dos polieletrólitos fracos e a necessidade da compensação de cargas durante deposição de cada *PEM*. A **Tabela 4.4** apresenta uma estimativa do percentual de grupos amino da quitosana e carboxila do ALG e do HA ionizados nas diferentes condições de pH estudadas (ver **Anexo 1**). Estas estimativas foram obtidas considerando-se o pKa da quitosana igual a 6,0 e o pKa do ALG e do HA iguais a, respectivamente, 3,0 e 2,9 [10].

**Tabela 4.4** – Percentual de grupos funcionais ionizados dos polieletrólitos em diferentes pH

	pH	2	3	4	5	6
CHI	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>2</sub>	99,99%	<b>99,90%</b>	99,01%	<b>90,91%</b>	50,00%
ALG	COO <sup>-</sup> /COOH	9,09%	<b>50,00%</b>	90,91%	<b>99,01%</b>	99,90%
HA	COO <sup>-</sup> /COOH	11,18%	<b>55,73%</b>	92,64%	<b>99,21%</b>	99,92%

A grande diferença entre o percentual de grupos funcionais ionizados dos polieletrólitos em pH 3,0 sugere a necessidade da deposição de um grande número de cadeias de ALG ou HA (pouco carregadas negativamente) para promover a compensação das cargas positivas das cadeias

de quitosana altamente protonadas, resultando na deposição de *PEMs* contendo camadas de poliânion bem espessas. Ao aumentarmos o pH do processo de deposição para 5,0, nota-se que os poliânions se encontram altamente carregados negativamente. Embora este aumento do pH requeira agora um maior número de cadeias de quitosana para compensar as cadeias altamente ionizadas de ALG ou HA, as cadeias de quitosana apresentam-se consideravelmente bem ionizadas nesta condição. Assim, a compensação de cargas das cadeias de poliânions não requer a deposição de um grande número de cadeias de quitosana, o que desfavorece o aumento da espessura dos filmes com a mudança do pH de 3,0 para 5,0.

O ácido hialurônico é um polieletrólito maior e menos linear que o alginato, o que faz com que os filmes de HA/CHI sejam mais espessos que os de ALG/CHI.

Os resultados das **Tabelas 4.2 e 4.3** sugerem ainda que a força iônica das soluções é um fator capaz de alterar consideravelmente a espessura dos filmes, sendo observados dois comportamentos distintos para este parâmetro:

1º caso – Para filmes de ALG, independente do pH, e para filmes de HA construídos em pH 5 ocorre um aumento da espessura com o aumento da força iônica das soluções. Segundo von Klitzing (2006) [90] o aumento da espessura dos recobrimentos observado para os filmes estes filmes é atribuído ao aumento das interações entre a nuvem de contraíons presentes na solução e os terminais carregados dos polieletrólitos (condensação iônica). Este fenômeno também tende a reduzir as repulsões eletrostáticas intracadeias, reduzindo o volume hidrodinâmico dos polieletrólitos e favorecendo conformações mais enoveladas das cadeias [91]. Novamente, as cadeias nesta conformação depositam-se formando *PEMs* mais espessas e com morfologias mais rugosas, como será apresentado na seção de microscopia de força atômica [19].

2º caso – Para filmes de HA construídos em pH 3 o aumento da força iônica causa reduções na espessura dos filmes. Há poucos estudos na literatura reportando o efeito negativo da força iônica das soluções sobre a espessura dos filmes [28, 41, 92].

Neste caso, a diminuição da espessura dos filmes ocorre devido às reduções das interações eletrostáticas entre os complexos que formam a PEM. Este processo permite uma maior mobilidade dos segmentos das cadeias polieletrólíticas para dentro e fora do filme (*in and*

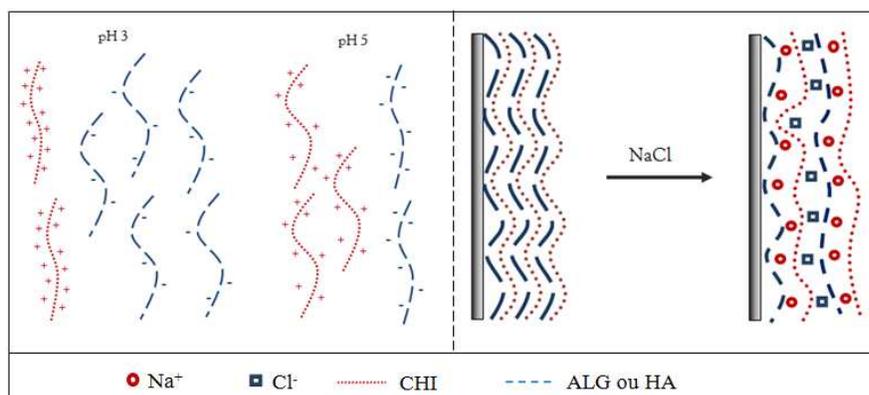
*out diffusion* [12]) e o rearranjo dos complexos em conformações mais estáveis, com um maior grau de empacotamento [92].

A presença de sal altera substancialmente a configuração das cadeias em solução e a influência da força iônica será dependente dos pares de polieletrólitos utilizados. Ren *et. al* [28] avaliaram a influência da força iônica em filmes multicamadas de poli-L-lisina/DNA e reportaram que quando a concentração de NaCl é maior que 0,5M, há redução na quantidade de DNA depositado no filme. O processo de montagem eletrostático é prejudicado porque grupos de moléculas do DNA são “blindados” pelos íons de sal presentes na solução.

Como resultado, pós-tratamentos podem ser usados para forçar a dessorção de polieletrólitos uma vez que a exposição dos filmes multicamadas a ambientes de força iônica elevada pode remover material de forma controlada [42] e reduzir a espessura dos filmes [93].

É provável que este efeito de “blindagem” ocorra para todos os filmes, mas seu efeito é mais pronunciado para os filmes mais espessos. Em filmes menos espessos, este efeito deve ser suprimido pelo aumento da espessura em virtude da deposição de segmentos da cadeia dos polímeros em conformações mais enoveladas, que também são resultado do aumento da força iônica.

Sumarizando, a **Figura 4.1** esquematiza a influência do pH e da força iônica sobre as cadeias dos polieletrólitos estudados. No pH 3, temos as cadeias da quitosana bastante protonadas e lineares. Já os segmentos de ALG e HA estão menos carregados negativamente e mais enovelados. Para compensar a grande quantidade de cargas positivas, mais ALG ou HA deve ser depositado durante a formação do filme.



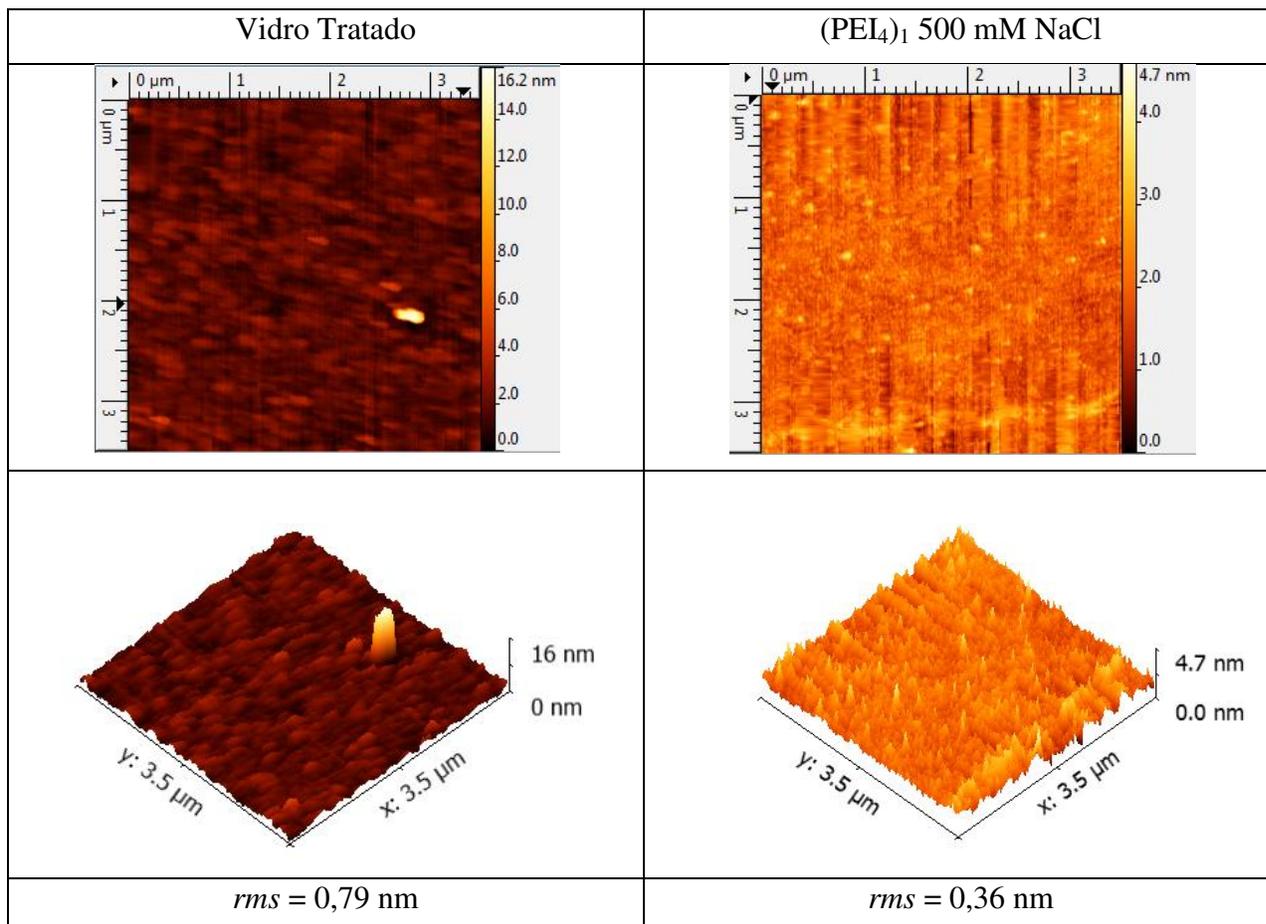
**Figura 4.1** – Conformação das cadeias de CHI, ALG e HA em diferentes pH e força iônica.

Quando o processo de montagem do filme ocorre em pH 5, temos ALG e HA bastante carregados negativamente, em arranjos mais lineares, enquanto a quitosana está menos protonada (**Tabela 4.4**). Já a presença de sal nas soluções de polieletrólitos leva os filmes a apresentarem morfologias mais vermiculares e acidentadas.

#### 4.2. Topografia dos Filmes

Os valores de rugosidade rms (rugosidade média quadrática), o tratamento das imagens e a obtenção das projeções das microscopias foram obtidos pelo software Gwyddion<sup>®</sup>.

Imagens de AFM mostram que a rugosidade do vidro diminui com a deposição da pré-camada de PEI (**Figura 4.2**). Esse resultado é positivo porque mostra que os valores de rms apresentados para os filmes de biopolímeros são pouco afetados pela topografia do substrato.



**Figura 4.2** – Imagens obtidas por AFM em 2D e 3D para o vidro tratado e para o vidro recoberto com PEI.

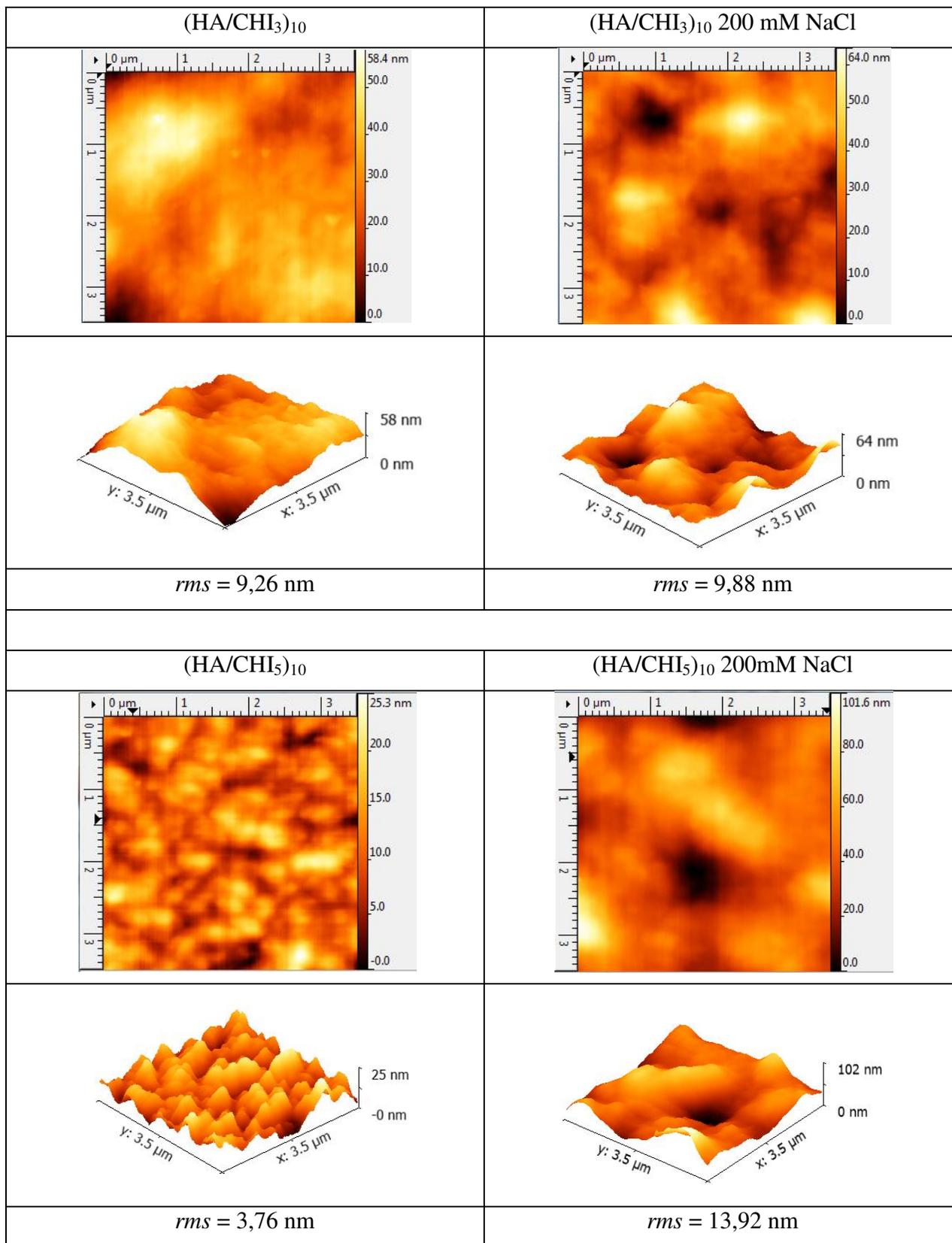
É importante avaliar a influência do pH e força iônica sobre a rugosidade das *PEMs* (**Figuras 4.3 e 4.4**) por DOE (*design of experiments*) devido ao fato de que é possível verificar a importância do efeito cruzado entre as variáveis (**Tabelas 4.5 e 4.6**). Individualmente, o método detectou, ao nível de 5% de significância, que o efeito individual do pH sobre a rugosidade dos filmes de HA/CHI não é significativo. Porém, o efeito pHxF.I. deve ser considerado. Há uma forte interação entre pH e F.I pois ambos influenciam, em conjunto, no grau de carga dos polieletrólitos em solução. Assim, o pH, mesmo para o sistema HA/CHI, continua sendo um fator-chave para modificação do grau de ionização de polieletrólitos fracos em solução. Para o filme de ALG/CHI, todas as variáveis são significativas.

**Tabela 4.5** – Valores de RMS para filmes de HA/CHI e cálculo dos efeitos de pH e F.I. sobre a rugosidade dos filmes de HA/CHI. *Rep.* é a replicata e *EP* é o erro-padrão.

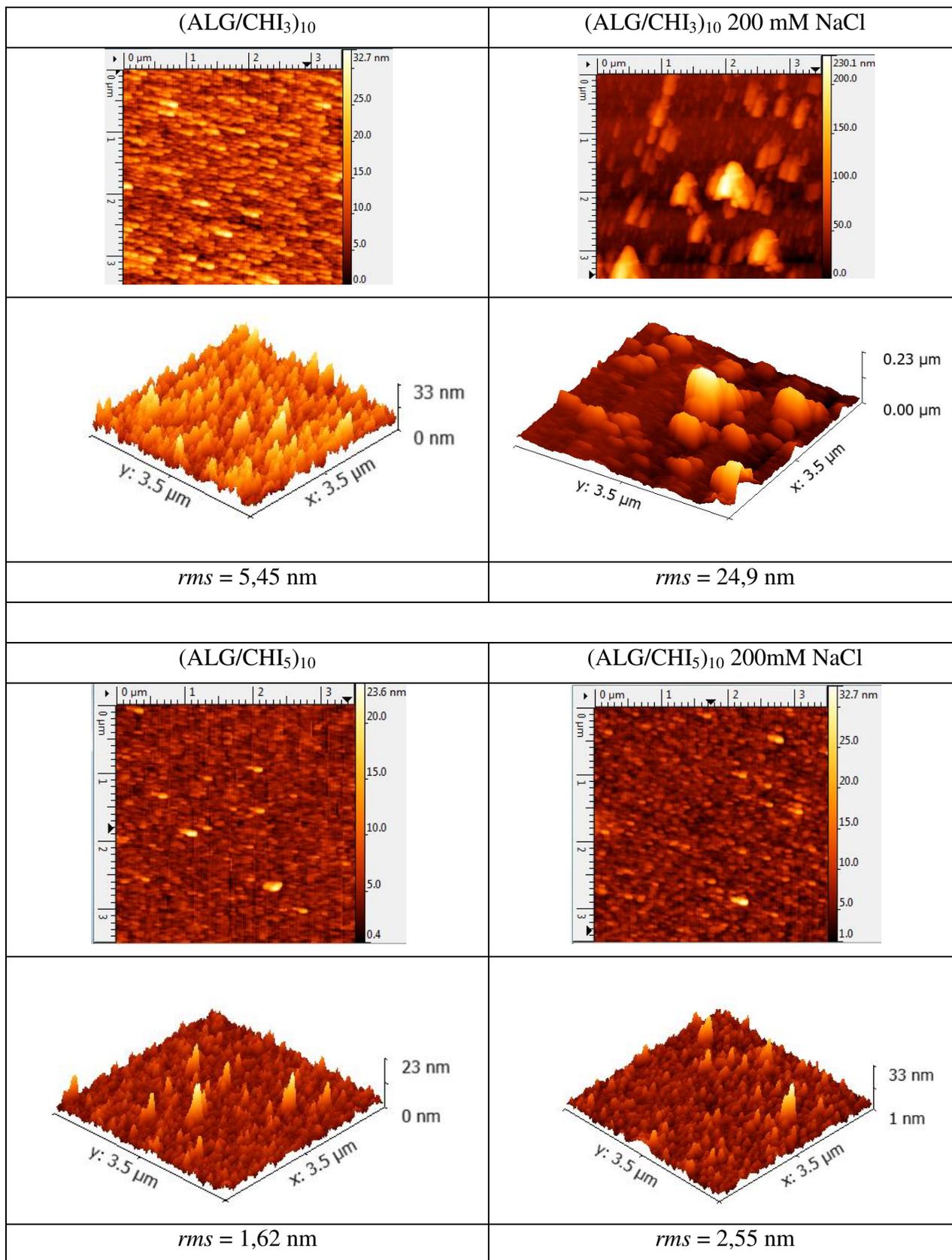
<i>Valores de RMS</i>			<i>Cálculo dos Efeitos</i>				
<i>Filme</i>	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>EP</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	9,47	9,26	Média	9,39	0,22	43,34	0,00
(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	9,88	9,83	<b>pH</b>	<b>-0,21</b>	<b>0,43</b>	<b>-0,47</b>	<b>0,66</b>
(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>	3,76	3,86	F.I.	5,62	0,43	12,96	0,00
(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	13,92	15,6	pH x F.I.	5,34	0,43	12,32	0,00

**Tabela 4.6** – Valores de RMS para filmes de ALG/CHI e cálculo dos efeitos de pH e F.I. sobre a rugosidade dos filmes de ALG/CHI. *Rep.* é a replicata e *EP* é o erro-padrão.

<i>Valores de RMS</i>			<i>Cálculo dos Efeitos</i>				
<i>Filme</i>	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Fator</i>	<i>Efeito</i>	<i>EP</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	4,27	4,51	Média	8,15	0,31	26,55	0,00
(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	24,9	22,5	pH	-11,80	0,61	-19,23	0,00
(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>	1,62	1,92	F.I.	10,13	0,61	16,51	0,00
(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	2,55	2,89	pH x F.I.	-9,18	0,61	-14,96	0,00



**Figura 4.3** – AFM dos filmes de HA/CHI em diferentes valores de pH e F.I.



**Figura 4.4** – AFM dos filmes de ALG/CHI em diferentes valores de pH e F.I.

É possível verificar que os filmes construídos em pH mais baixos são consideravelmente mais rugosos. Este comportamento pode ser atribuído ao efeito do pH na conformação das cadeias de ALG e HA em solução, uma vez que este polieletrólito apresenta grandes variações na quantidade de grupos ionizados com a variação do pH nesta faixa. Em valores de pH mais altos, as cadeias destes polieletrólitos estão mais carregadas, o que leva à formação de estruturas mais regulares dos complexos polieletrólíticos, resultando em superfícies mais uniformes e menos rugosas [39].

Pelas imagens de AFM, os segmentos dos polímeros parecem ser depositados em formatos de ilhas, que aumentam progressivamente quando há a presença de NaCl nas soluções poliméricas. Resultados semelhantes foram encontrados para outros sistemas de polieletrólitos, tanto naturais [4, 12, 28, 37, 82, 94] quanto sintéticos [41, 43].

O efeito da força iônica sobre a rugosidade dos filmes se assemelha a resultados obtidos por McAloney *et al.* [43] com filmes de PDAC/SPS. O aumento da concentração de NaCl nas soluções de polieletrólitos levaram a modificações na morfologia dos filmes analisados. Para concentrações de 0,3 M e 1 M NaCl, as imagens de AFM mostraram padrões de estruturas enoveladas e vermiculares, resultando em superfícies mais rugosas.

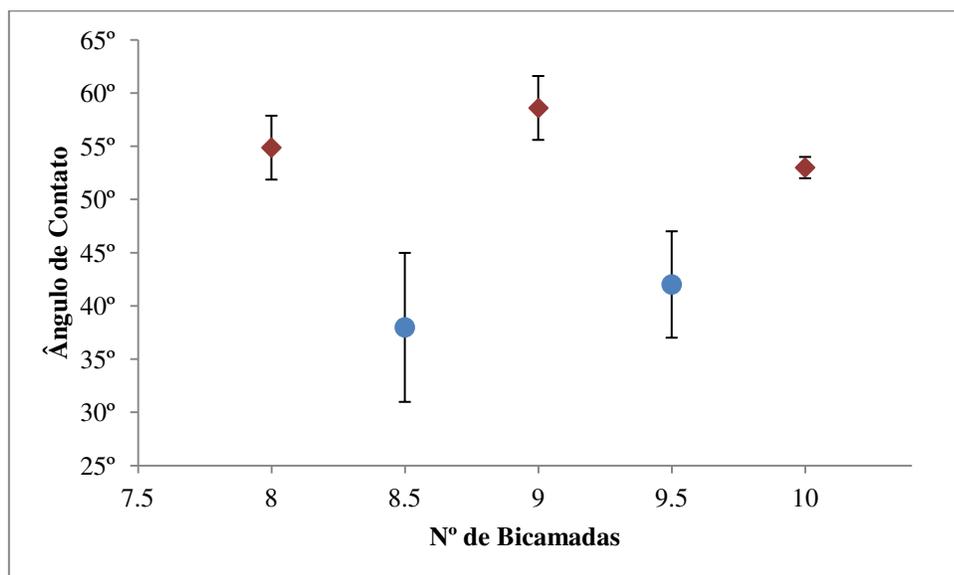
A adição de sal nas soluções de imersão faz com que segmentos dos polímeros, que se encontravam em conformações estendidas devido a repulsão entre cargas iguais de suas cadeias, passem a apresentar configurações de espirais, formando loops que se assemelham a uma estrutura de bobina [95]. É possível que as cadeias poliméricas preservem sua configuração em solução ao serem adsorvidas pelo substrato e, conseqüentemente, os detalhes estruturais dos recobrimentos formados são fortemente influenciados pela concentração de sal nas soluções polieletrólíticas [37, 96].

#### 4.3. Ângulo de Contato (AC)

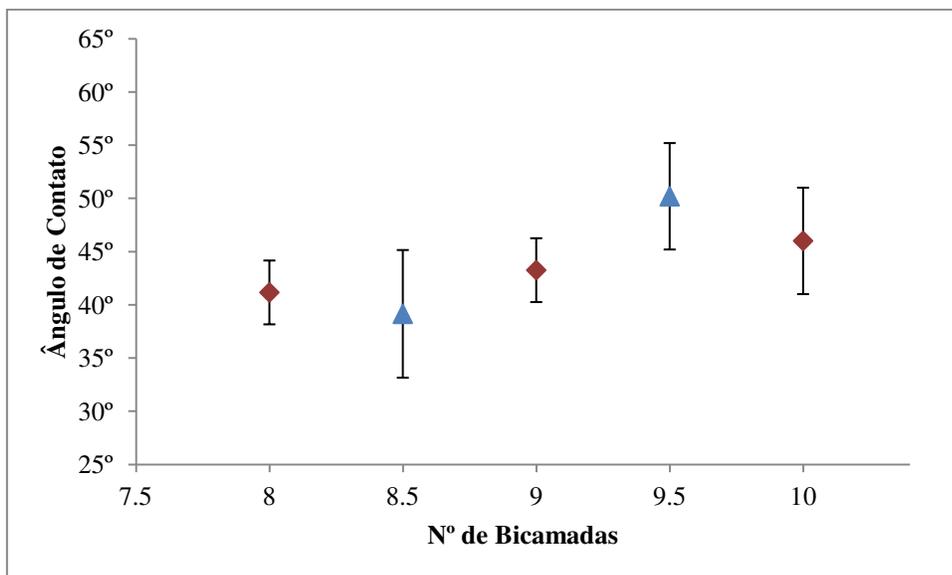
Camadas sequencialmente adsorvidas de polieletrólitos podem ser usadas sistematicamente para alterar e controlar o caráter hidrofílico de qualquer superfície de substrato por uma simples mudança na natureza do polímero adsorvido na camada mais externa. A

alteração da hidrofiliicidade que ocorre quando há mudanças na camada mais externa vai depender de fatores como a composição química do polímero adsorvido devido à hidrofiliicidade de seus grupos funcionais e o nível de interpenetração da camada mais externa por segmentos de camadas de polímeros previamente adsorvidas. Como resultado, ao monitorar mudanças que ocorrem na hidrofiliicidade durante o processo de montagem de filmes *layer-by-layer* de diferentes materiais, é possível estabelecer o entendimento básico necessário para alterar a molhabilidade da superfície de maneira a se obter informações importantes sobre o nível de interpenetração presentes nas multicamadas sequencialmente adsorvidas.

As **Figuras 4.5** e **4.6** mostram a variação do ângulo de contato de filmes de ALG/CHI e HA/CHI, respectivamente. As medidas foram feitas para monitorar a mudança de hidrofiliicidade com o aumento do número de bicamadas depositadas. O ângulo de contato da lâmina de vidro com a água é de  $53^\circ \pm 2^\circ$  e  $30^\circ \pm 2^\circ$ , com e sem o recobrimento de PEI, respectivamente.



**Figura 4.5** – Ângulo de contato em função do número de bicamadas. O símbolo  $\blacklozenge$  representa filmes com CHI na última camada e  $\bullet$  representa filmes com ALG na última camada.



**Figura 4.6** – Ângulo de contato em função do número de bicamadas. O símbolo  $\blacklozenge$  representa filmes com CHI na última camada e  $\blacktriangle$  representa filmes com HA na última camada.

Dos resultados de ângulo de contato, duas observações podem ser feitas:

1 – Influência do poliânion de topo sobre a hidrofiliicidade: Filmes que contém alginato no topo são mais hidrofílicos do que aqueles que contém HA como última camada. Esta diferença pode ser atribuída às propriedades dos polieletrólitos que compõe a camada mais externa de cada filme: enquanto apenas alguns dos monômeros que compõe as cadeias do ácido hialurônico possuem grupamentos carboxila (altamente hidrofílicos), todos os monômeros que compõe as cadeias de alginato possuem este grupo funcional [97]. Logo, recobrimentos contendo ALG na última camada possuem mais grupos funcionais capazes de interagir com a água e, portanto, são mais hidrofílicos que aqueles que contém HA na última camada.

2 – Nível de interpenetração das cadeias de ácido hialurônico sobre as camadas de quitosana: Para o sistema ALG/CHI, a variação do ângulo de contato em função do número de bicamadas variou segundo a forma par/ímpar reportada na literatura para filmes bem estratificados, para os quais a composição do topo dos recobrimentos é formada basicamente por segmentos do último polieletrólito adsorvido (*even/odd effect*). Dessa forma, filmes com camadas de topo distintas apresentam, invariavelmente, diferentes ângulos de contato com a água. Porém, em alguns tipos

de filmes, como os de HA/CHI, o ângulo de contato, aparentemente, não depende apenas da composição da última camada. O acompanhamento do crescimento do filme por ângulo de contato fornece indícios de que há um alto nível de interpenetração das cadeias de quitosana sobre as camadas de ácido hialurônico. Por esse motivo, não houve variação do grau de hidrofiliicidade com o aumento do número de bicamadas, assim como não se observa mudança do AC com a sequência dos polímeros adsorvidos.

No caso do ácido hialurônico, um polieletrólito fraco de natureza aniônica, assume-se que as cadeias do polímero tendem a ser adsorvidas como camadas finas com conformações de cadeia planas quando elas estão altamente carregadas (pH elevado) e mais espessas, com estruturas enoveladas (*loops and tails*) quando são menos carregadas negativamente (pH baixo). Além disso, a quantidade de polieletrólito adsorvido a uma superfície aumenta com o aumento da densidade superficial de carga uma vez que mais material é necessário para equilibrar e compensar a densidade de carga mais elevada da superfície de carga oposta.

Assim, tal como seria de se esperar, os dois parâmetros mais importantes que regem a adsorção em superfícies de polieletrólitos de cargas opostas (na ausência de sal adicionado) são a densidade de carga linear da cadeia de polímero absorvente e a densidade de carga da superfície.

Isto, por sua vez, fornece uma oportunidade de controlar sistematicamente a quantidade de polieletrólito adsorvido numa superfície e a organização resultante em função da conformação das cadeias adsorvidas.

Uma vez que o grau de ionização de um polieletrólito fraco pode ser controladamente variado através de alterações de pH, é possível controlar sistematicamente tanto a densidade de carga linear de uma cadeia de polímero absorvente como a densidade de carga de superfície. Este tipo de controle é particularmente útil durante um processo de adsorção *LbL*, uma vez que proporciona um meio muito poderoso para controlar a composição, espessura e organização das bicamadas.

Yoo *et al.* [14] verificaram que a molhabilidade de superfícies de filmes *LbL* de polieletrólitos sintéticos fracos tem forte relação com a espessura das camadas que compõe as *PEMs*. Fazendo uma analogia para filmes de HA/CHI em pH 3,0, temos cadeias de CHI bastante protonadas e lineares, ao passo que as cadeias de HA, além de serem bem maiores que as de CHI, estão pouco carregadas e apresentam conformações bastante enoveladas. Assim, temos deposição

de camadas de CHI finas e lineares enquanto as camadas de HA são mais vermiculares e rugosas. Esta grande diferença estrutural e de densidade de carga entre os pares de polímeros é o fator-chave para que ocorra o fenômeno de interpenetração das camadas de *LbL*. Tipicamente, sempre que uma camada fina (CHI) é depositada sobre uma camada enovelada (HA), um grande número dos segmentos da cadeia de HA penetram na superfície do recobrimento. Assim como, quando uma camada de HA, mais espessa, é depositada sobre uma camada de CHI, o topo do recobrimento será formado basicamente de HA, pois poucos segmentos de CHI serão capazes de penetrar a camada mais externa.

#### 4.4. Identificação de grupos funcionais por FTIR-ATR

Biomateriais interagem com as células e tecidos através de suas interfaces. Portanto, uma estratégia para transpor a utilização de materiais tradicionais no campo biomédico é a realização de alterações físicas/químicas adequadas na superfície dos dispositivos. Diferentes estratégias têm sido utilizadas para esta tarefa, acompanhada por métodos de caracterização adequados [98-101]. Neste trabalho, em específico, há interesse em identificar grupos funcionais dos polímeros utilizados nos filmes construídos pela técnica *LbL*.

De fato, a presença desses grupos funcionais,  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ , são importantes em dois momentos distintos do processo de construção do filme antimicrobiano: (i) na formação das multicamadas e (ii) na funcionalização dos revestimentos formados. No primeiro caso, é a presença destes grupos carregados opostamente que gera a força motriz necessária para o crescimento do filme. No segundo, a interação desses grupos funcionais com compostos de interesse molda o revestimento à função desejada.

Os espectros referentes aos filmes apresentam bandas de absorção características dos espectros de ambos os biopolímeros que compõe as *PEMs* e do complexo formado. A identificação dos grupos funcionais presentes nos filmes de acordo com os picos de absorbância verificados por FTIR foi baseada em trabalhos que também utilizaram os sistemas HA/CHI [11, 102] e ALG/CHI [103-105]. Os espectros de IV dos filmes estudados e as regiões de interesse são

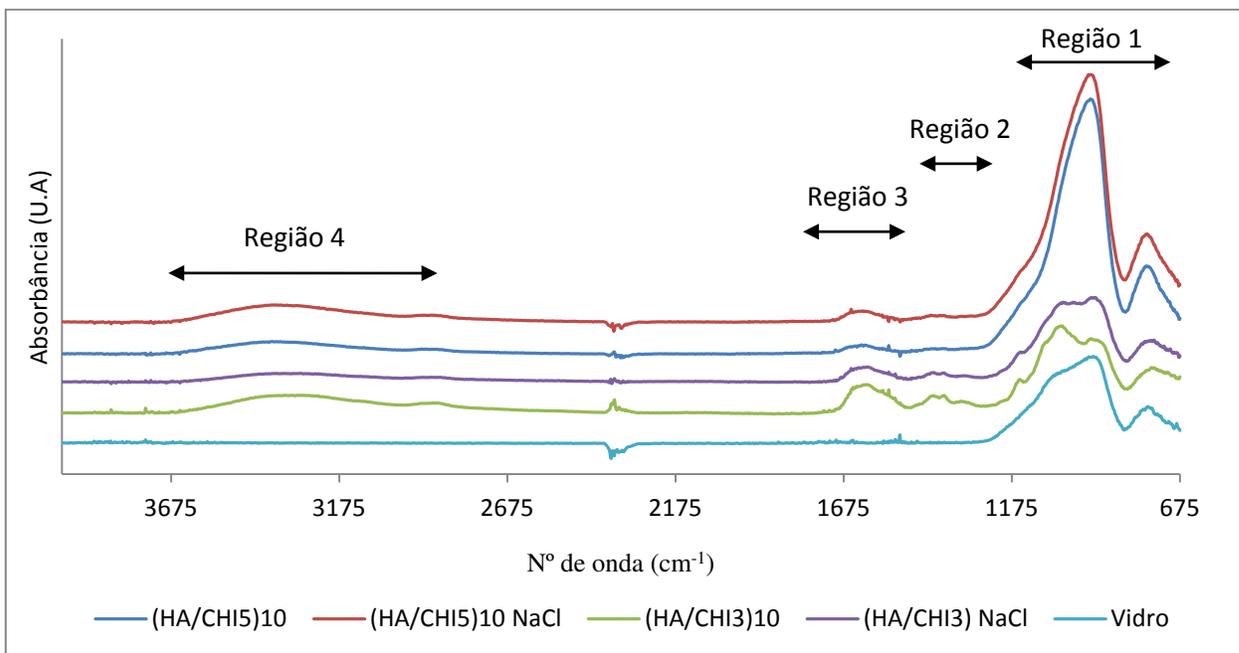
mostrados nas **Figuras 4.7 e 4.8** para filmes de HA/CHI e nas **Figuras 4.9 e 4.10** para filmes de ALG/CHI.

Região 1 (950 a 1250  $\text{cm}^{-1}$ ): região que mostra as ligações simples, representativas das vibrações esqueléticas dos sacarídeos e envolve os estiramentos C – O, C – C e C – N em 1210, 1130 e 989  $\text{cm}^{-1}$ . Esses picos podem ser observados nos espectros dos filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  e  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  NaCl. Para os demais filmes, houve sobreposições, formando uma banda mais intensa na qual não é possível verificar a presença individual dos tipos de vibração citados acima.

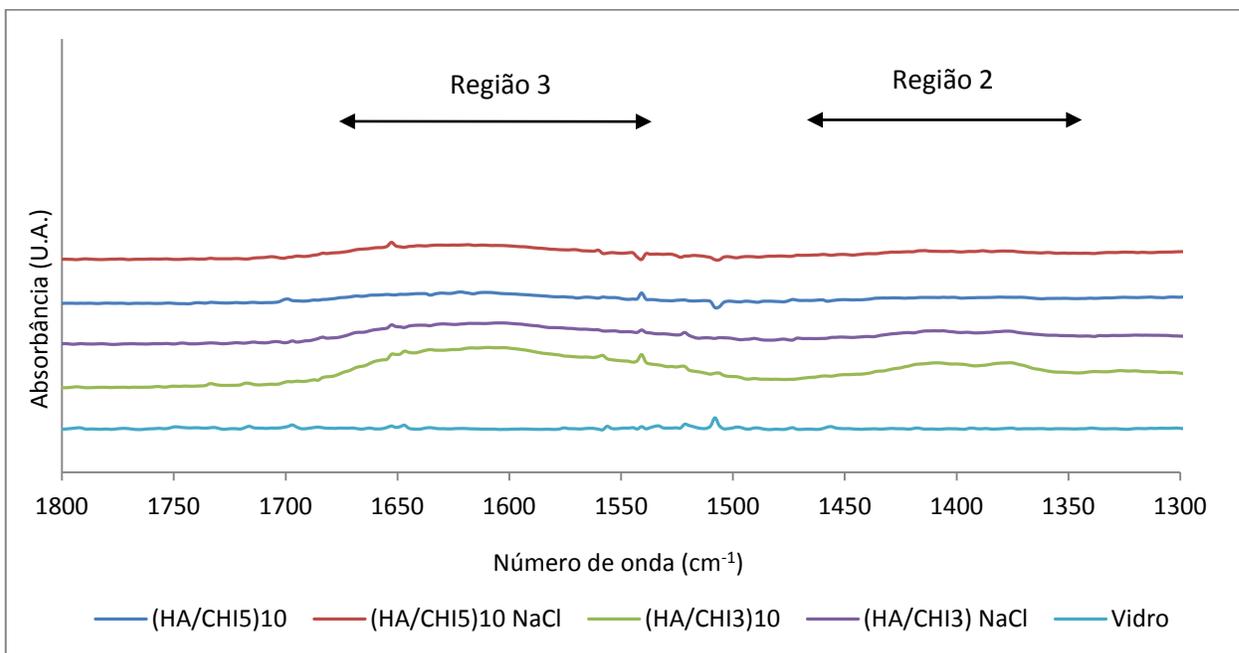
Região 2 (1370 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ ): contém as bandas de amida II do HA e da CHI (1370–1400  $\text{cm}^{-1}$ ) e o pico atribuído ao estiramento assimétrico do  $-\text{COO}^-$  do HA em 1410  $\text{cm}^{-1}$ . Para filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI})_5$  e filmes contendo ALG essa região é pouco definida, apresentando uma banda larga e tênue.

Região 3 (1630 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ ): região correspondente as vibrações do grupo amida I do HA e da CHI, o pico atribuído ao estiramento simétrico do  $-\text{COO}^-$  do HA em e a banda C = O da quitosana, que aparece entre 1620 e 1660  $\text{cm}^{-1}$ . Essa região é bem visualizada para todos os filmes, com exceção do filme de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ .

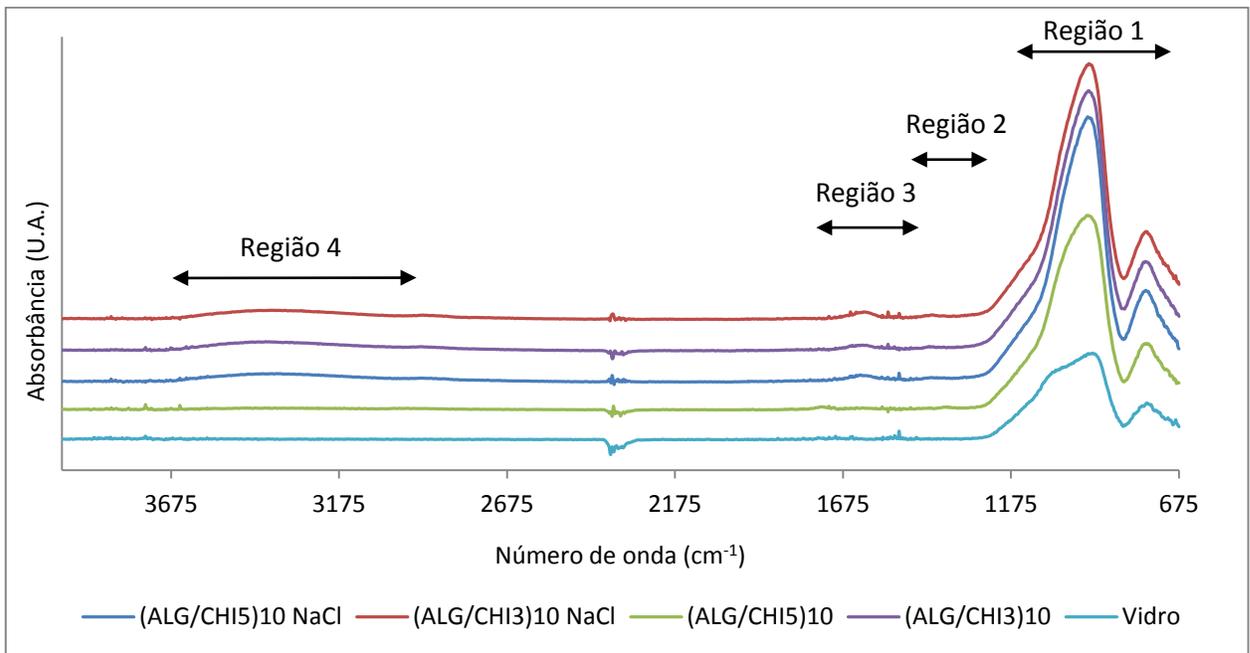
Região 4 (2700 a 3675  $\text{cm}^{-1}$ ): nestes casos, observam-se bandas características da quitosana entre 3530-2960  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente às deformações axiais das ligações OH e NH e na mesma região há sobreposição devido a deformações axiais das ligações OH do grupo carboxila do ALG e HA. A banda de 2933-2792  $\text{cm}^{-1}$  é correspondente à deformação axial da ligação CH. Novamente, essa região é bem visualizada para todos os filmes, com exceção do filme de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ .



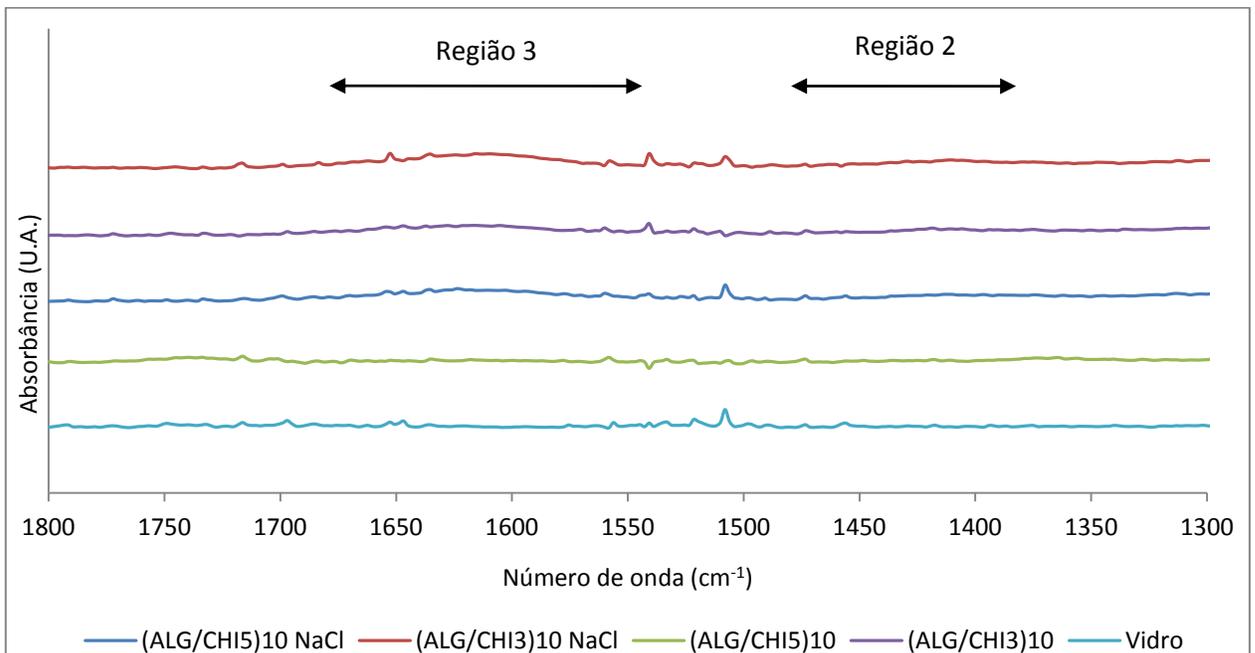
**Figura 4.7** – Espectro de FTIR para recobrimentos de HA/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$  de 675 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 4.8** – Espectro de FTIR para recobrimentos de HA/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$  de 1300 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 4.9** – Espectro de FTIR para recobrimentos de ALG/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$  de 675 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 4.10** – Espectro de FTIR para recobrimentos de ALG/CHI em diferentes condições de pH e F.I. ( $\lambda$  de 1300 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ ).

Além da presença de grupos característicos de ambos os polieletrólitos que compõem as *PEMs*, a formação do complexo entre os sítios negativos dos poliânions e positivos da quitosana apresentou sua banda característica em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que representa uma sobreposição do estiramento  $\text{C}=\text{O}$  e da vibração amida  $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ . É interessante notar que as principais alterações observadas nos espectros com o aumento do pH foram a redução do pico de absorvância em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo uma diminuição dos grupamentos amino complexados e um aumento na quantidade de grupos amino livres e o surgimento de uma banda mais acentuada na região 1. Os espectros referentes aos filmes de HA/CHI apresenta picos de absorvância mais intensos quando comparados aos de ALG/CHI. Esse resultado concorda com àqueles vindos da perfilometria, mostrando a maior deposição de material para a formação das multicamadas para filmes que contém ácido hialurônico.

#### 4.5. Identificação de grupos funcionais livres por incorporação de corantes iônicos

Uma grande vantagem do método de automontagem *LbL* reside na possibilidade de se incorporar diversos compostos em diferentes sítios dentro das estruturas multicamadas formadas. No cenário atual, a utilização de corantes iônicos pode fornecer uma ideia geral sobre o potencial de cada estrutura multicamada para incorporação de agentes ativos.

As análises de UV-Vis permitem avaliar a capacidade de incorporação/interação do filme em meio fisiológico ou em solução de compostos (*e.g.* metais ou fármacos) que apresentam pH na faixa do neutro. Além disso, podem fornecer informações sobre a disponibilidade de grupos funcionais no momento da montagem do filme. Assim, seria possível verificar se há maior incorporação de corante por parte dos filmes formados nas condições em que as soluções de polímeros apresentam maior disponibilidade de grupos funcionais livres.

O corante azul de alciano (AA) é um corante iônico positivo utilizado como indicador de grupos carboxila do alginato e do ácido hialurônico. Já o corante rosa de bengala (RB) é negativo e se liga aos grupos amino livres da quitosana. As curvas de absorvância são mostradas nas **Figuras 4.11 e 4.12** para o azul de alciano ( $\lambda = 617\text{ nm}$ ) e nas **Figuras 4.13 e 4.14** para o rosa de bengala ( $\lambda = 567\text{ nm}$ ). Os resultados de incorporação são mostrados na **Tabela 4.7** e os efeitos de

pH e força iônica sobre a disponibilidade de grupos funcionais livres são mostrados na **Tabela 4.8**. Os valores de absorvância foram divididos pela espessura do filme (valores normalizados).

**Tabela 4.7** – Valores de absorvância para testes realizados com os corantes azul de alciano (AA) ( $\lambda = 617$  nm) e rosa de bengala (RB) ( $\lambda = 567$  nm).

Recobrimento	Absorvância (U.A.)		Abs/Espessura (U.A./nm)	
	AA	RB	AA	RB
(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	0,0953	0,0205	0,0023	0,00050
(ALG/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	0,1115	0,0047	0,0022	0,00009
(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub>	1,5626	2,1274	0,0023	0,17877
(HA/CHI <sub>3</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	1,1870	0,5377	0,0042	0,01605
(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>	0,0708	0,0304	0,0060	0,00004
(ALG/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	0,0780	0,0155	0,0023	0,00005
(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub>	0,4812	0,2117	0,0086	0,00377
(HA/CHI <sub>5</sub> ) <sub>10</sub> NaCl	0,4582	0,2799	0,0026	0,00161

**Tabela 4.8** – Efeito do pH e força iônica (F.I.) sobre a incorporação dos corantes azul de alciano (AA) e rosa de bengala (RB) em filmes de ALG/CHI e HA/CHI. Os efeitos foram calculados com base nos valores de absorvância normalizados pela espessura.

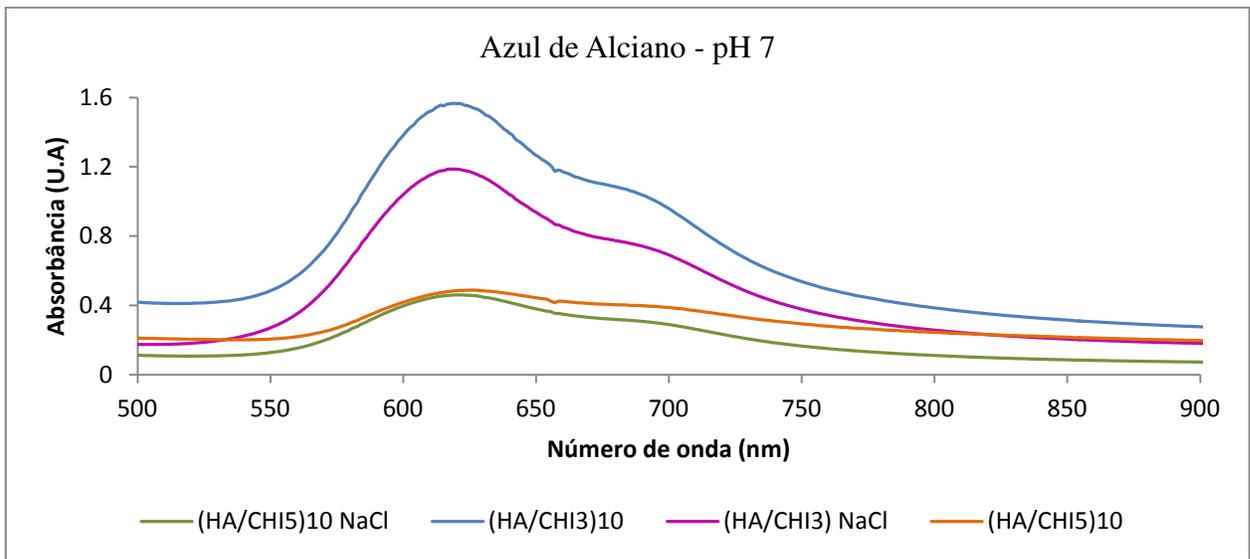
	ALG/CHI		HA/CHI	
	AA	RB	AA	RB
Média	0,003214	0,000174	0,004406	0,050050
pH	0,001849	-0,000249	0,002380	-0,094726
F.I.	-0,001857	-0,000198	-0,002007	-0,082443
pH x F.I.	-0,001764	0,000209	-0,003926	0,080281

Da análise dos efeitos de pH e força iônica sobre a disponibilidade de grupos funcionais, segue que a presença de sal no meio reduz a quantidade de grupos amino e carboxila livres. Além disso, o aumento de pH do meio leva à maior presença de COO<sup>-</sup> e diminui a quantidade de NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Esse resultado está de acordo com o percentual de grupos ionizados em função do pH do meio de deposição, como discutido na seção de perfilometria (**Tabela 4.4**).

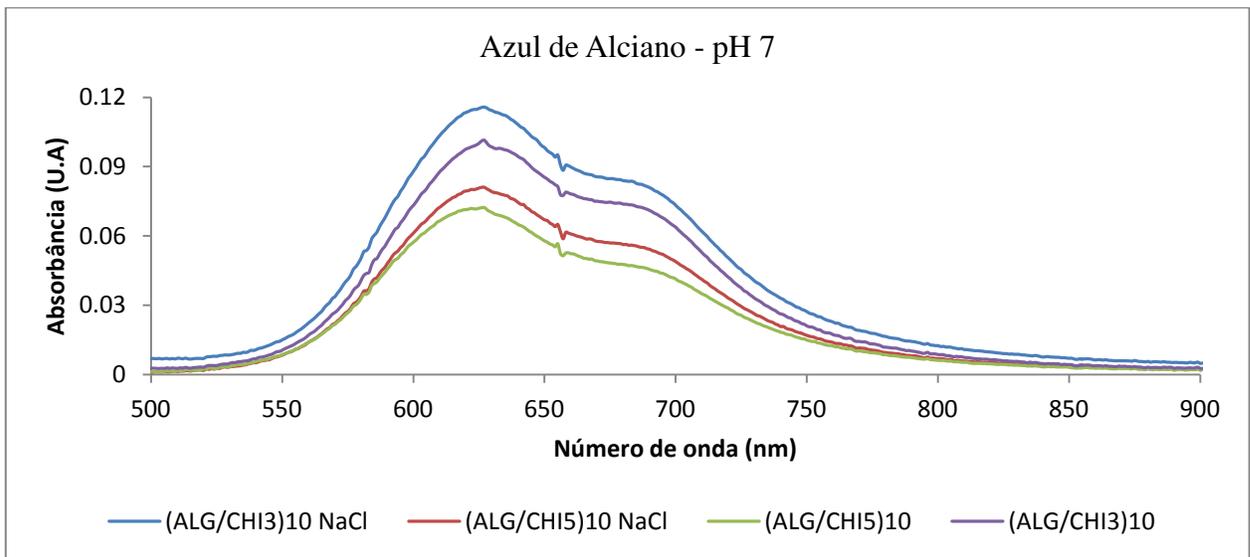
Yamaanlar e Sant (2011) [9] utilizaram o corante azul de metileno (MB) para detecção de grupos carboxila em hidrogéis de HA modificados com recobrimentos *LbL* de poli-L-lisina(PLL)/ácido hialurônico para incorporação de fibroblastos. Géis sem modificação apresentaram coloração azulada pouco acentuada ao passo que géis recobertos pelos filmes *LbL* exibiram colorações que se tornavam mais intensas com o aumento do número de bicamadas de PLL/HA. Esse resultado é esperado porque o aumento do número de bicamadas leva ao aumento da quantidade de moléculas de HA depositadas e, possivelmente, nem todos os grupos carboxila do HA estão ligados ionicamente aos grupos amino da PLL, sendo então tingidos pelo corante iônico. Assim, parte das moléculas de HA pode estar envolvida em interações eletrostáticas com a PLL e alguns grupos carboxila do HA podem estar desemparelhados levando a adsorção de MB no interior da estrutura de múltiplas camadas [87]. Estas observações contribuem para o entendimento da maior incorporação de corante por parte dos filmes de HA/CHI, comparados com filmes de ALG/CHI, já que filmes que contém ácido hialurônico são mais espessos que aqueles que contém alginato. Além disso, os resultados mostram que o acréscimo de NaCl comprometeu a disponibilidade de grupos carboxila livres nos filmes. Esses grupos foram “blindados” por íons  $\text{Na}^+$ , como discutido anteriormente.

Filmes construídos em pH mais baixo e sem sal são os que apresentam mais disponibilidade de  $\text{NH}_3^+$  livres. Muitos trabalhos relatam a ação dos grupos protonados da quitosana como um agente capaz de romper a membrana celular de micro-organismos, inativando-os. Assim, os filmes que incorporam mais rosa de bengala são, *a priori*, a alternativa de sucesso mais provável em testes que visam o não crescimento destas células.

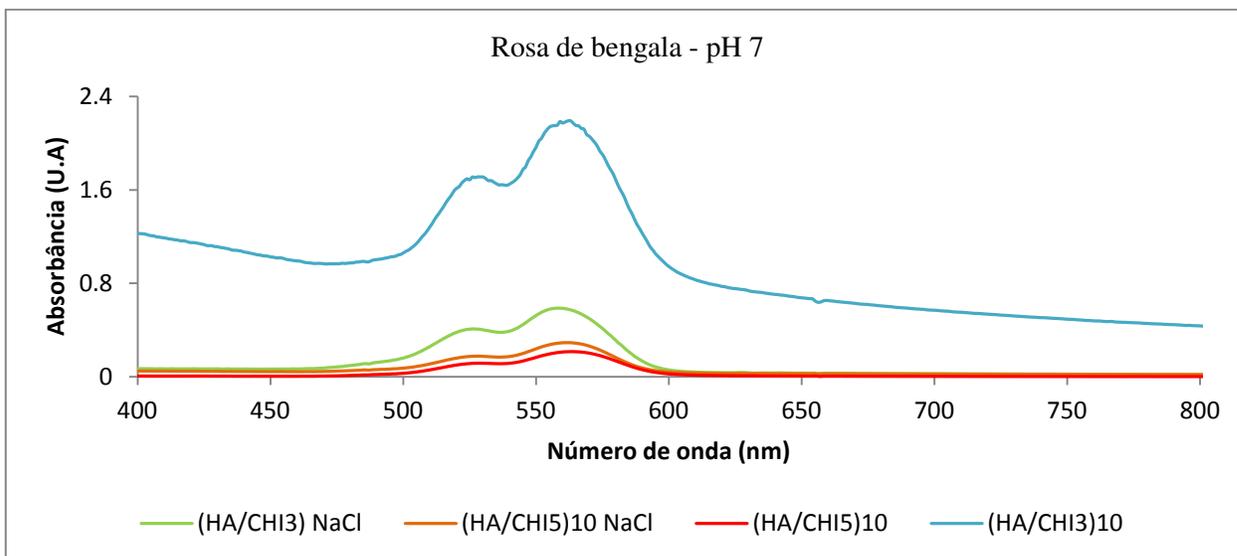
Lichter e Rubner (2009) [13] utilizaram o corante aniônico rosa de bengala para confirmar a presença de cargas catiônicas livres em filmes finos de SPS/PAH. Dentre os filmes submetidos a diferentes condições de deposição e pós-tratamento, aqueles que apresentaram maior incorporação do corante e, conseqüentemente, maior quantidade de grupamentos amino livres, foram também os recobrimentos que tiveram maior interação com células bacterianas. Isso porque polications livres são capazes de interagir com a membrana celular bacteriana, destruindo-a [51].



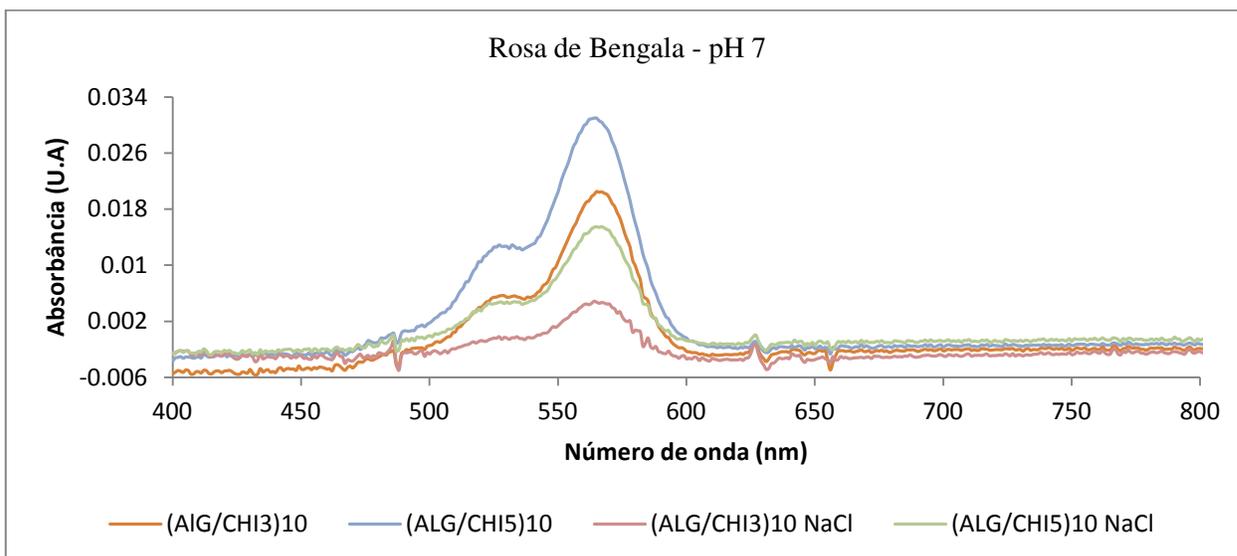
**Figura 4.11** – Espectro de UV para filmes de HA/CHI com o corante azul de alciano em pH 7.



**Figura 4.12** – Espectro de UV para filmes de ALG/CHI com o corante azul de alciano em pH 7.



**Figura 4.13** – Espectro de UV para filmes de HA/CHI com o corante rosa de bengala em pH 7.



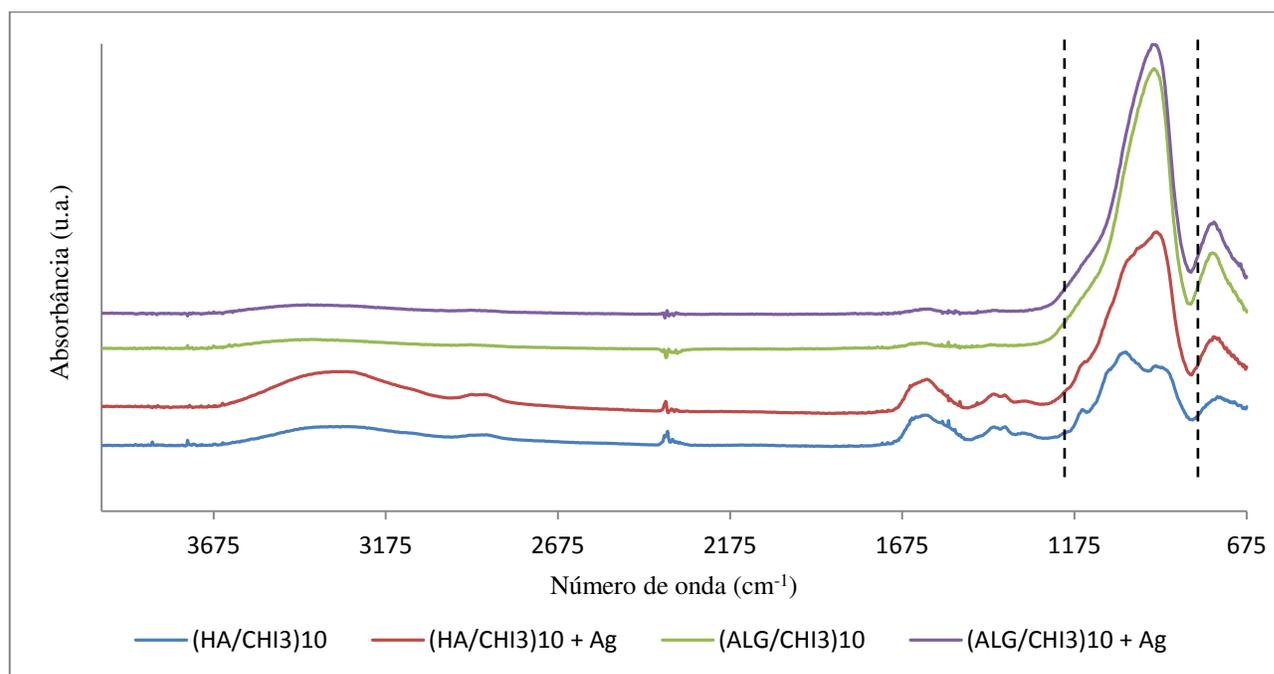
**Figura 4.14** – Espectro de UV para filmes de ALG/CHI com o corante rosa de bengala em pH 7.

#### 4.6. MEV, EDS e UV-Vis de recobrimentos contendo íons de prata ( $\text{Ag}^+$ )

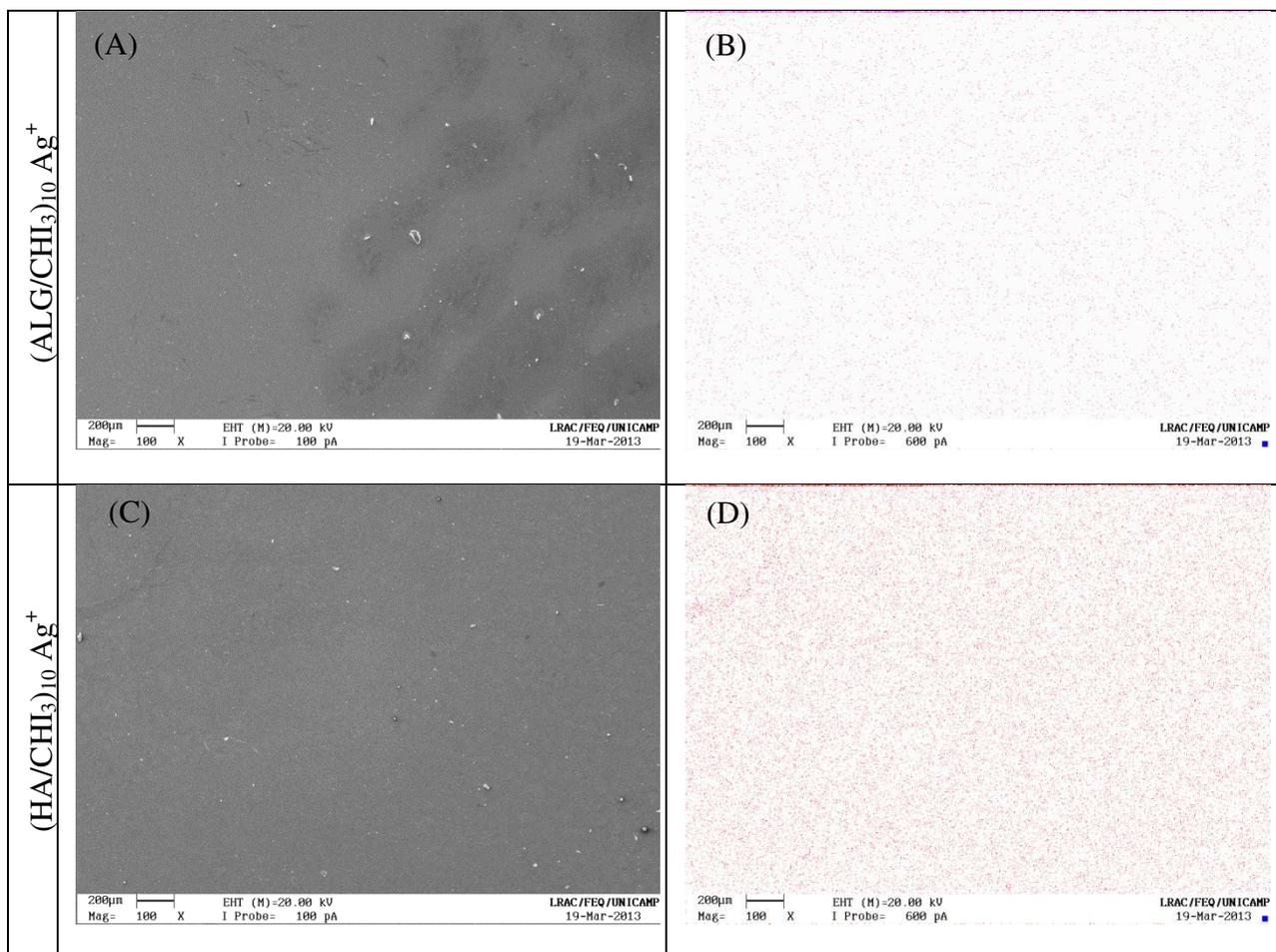
Filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  e de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$  contendo íons de prata tiveram a sua estrutura avaliada por UV-Vis, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e

energia dispersiva de raio X (EDS). A superfície foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM).

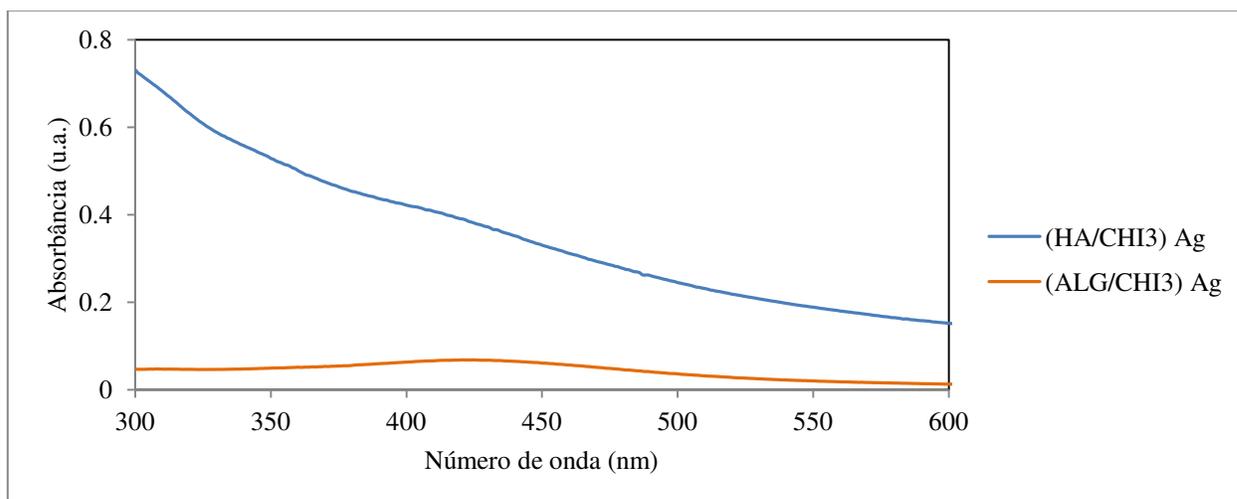
A região do espectro de FTIR referente às ligações simples, representativas das vibrações esqueléticas dos sacarídeos e envolve os estiramentos C – O, C – C e C – N em 1210, 1130 e 989  $\text{cm}^{-1}$  foram as que sofreram alteração para os filmes contendo HA, mostrando que o  $\text{Ag}^+$  pode ter se ligado eletrostaticamente a estes grupos [106-108] (**Figura 4.15**). Para filmes de ALG não houve modificação no espectro, mesmo havendo incorporação de  $\text{Ag}^+$ , como mostrado por EDS (**Figura 4.16**), o que leva à possibilidade de outras formas de interação (não–eletrostáticas) entre polímeros/metal. No entanto, o percentual de prata é bem maior em filmes de HA (4,31% elementar) quando comparados aos sistemas contendo ALG (0,19% elementar). O resultado de FTIR concorda com o ensaio de UV-Vis (**Figura 4.17**), que mostra que a intensidade do espectro é bem maior para os filmes que contém ácido hialurônico.



**Figura 4.15** – Espectro de FTIR para filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  e  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$  com e sem  $\text{Ag}^+$ .

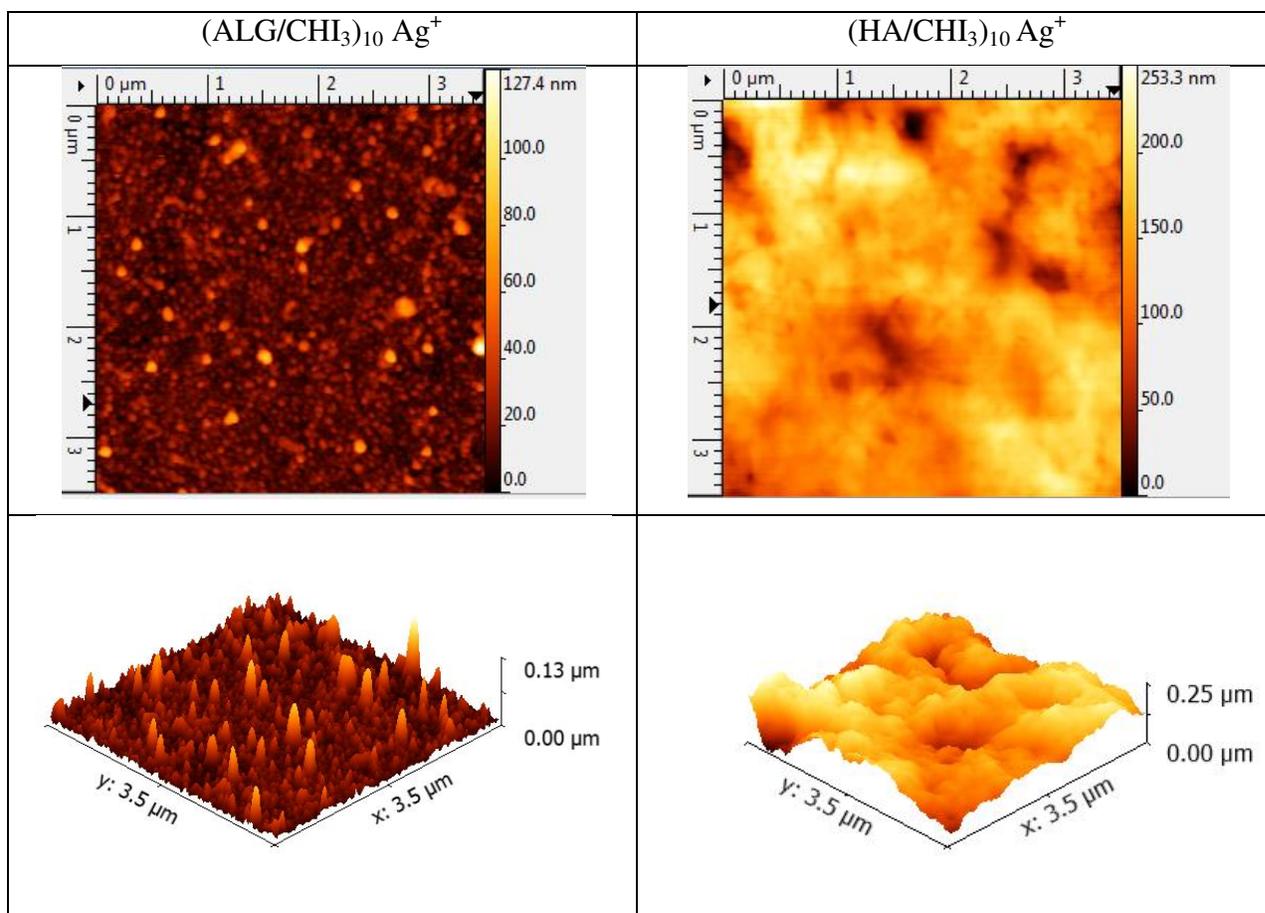


**Figura 4.16** – (A/C) MEV da superfície dos filmes de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$  e  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$  e EDS (B/D) para mapeamento de prata. Os pontos vermelhos indicam a presença do metal na superfície analisada.



**Figura 4.17** – Espectro de UV-Vis para os filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  e  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$  contendo íons de prata.

A morfologia das PEMs foi bastante alterada após a incorporação de íons prata, como mostram as imagens de AFM (**Figura 4.18**).



**Figura 4.18** – Projeções 2D e 3D da microscopia de força atômica dos filmes de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$  e  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  contendo  $\text{Ag}^+$ .

Para o recobrimento  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ , o valor de rms passou de 5,45 nm para 9,60 nm. Para o filme de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ , esse valor aumentou de 9,26 nm para 38,4 nm após a incorporação. Isso porque o acetato de prata, por ser um sal, tem efeito similar ao aumento da força iônica e é capaz de aumentar a rugosidade dos filmes, como discutido anteriormente.

#### 4.7. Filmes de biopolímeros frente à *Candida albicans*

No momento da observação, a placa teve a sua tampa removida e foi posicionada no

microscópio óptico. A área estriada foi examinada com aumento adequado visando detectar as estruturas.

Foram realizadas leituras após 20 horas de cultivo e após 7 dias de cultivo. Com apenas 20 horas de cultivo, tanto para as lâminas com polímeros sem íons de prata quanto para as lâminas controle (sem polímero), foi possível observar a filimentação da levedura. Com relação às leituras feitas após 7 dias de cultivo, foi possível observar uma maior proliferação da levedura no meio, com a presença de blastoconídios em cachos e uma grande quantidade de clamidoconídios terminais. Estes resultados foram registrados através de imagens que revelam os aspectos macro e microscópicos da levedura em contato com cada polímero (ver **Anexo 2**).

Estes resultados foram verificados para todas as PEMs sem  $\text{Ag}^+$ , o que indica que os mesmos não apresentam nenhuma atividade inibitória frente à espécie *Candida albicans*.

Recobrimentos contendo  $\text{Ag}^+$  apresentaram resultados satisfatórios frente à cepa. Filmes contendo alginato reduziram o crescimento do fungo após 7 dias de contato e filmes de HA/CHI, por apresentarem um maior teor de íons de prata, inibiram o crescimento da *Candida albicans*.

O conjunto de resultados obtidos dos testes com *Candida albicans* estão sumarizados na **Tabela 4.9**.

O modo de ação da prata envolve a inativação de proteínas ligadas à membrana celular dos micro-organismos, a interferência com os sistemas de transporte de solutos e de elétrons e a inibição de enzimas respiratórias que promovem a geração de espécies reativas de oxigênio[109].

A penetração de  $\text{Ag}^+$  em células pode também prejudicar o processo de replicação das mesmas. A ligação de  $\text{Ag}^+$  à célula provoca o enrolamento de DNA numa estrutura condensada que apresenta baixa capacidade de replicação, o que leva à inibição da função de células vitais[56, 110].

Filmes sem acetato de prata não apresentaram a funcionalidade antimicótica desejada. O efeito antimicrobiano da quitosana, na forma de solução, filmes ou nanopartículas [48, 67-69, 73, 77, 106, 111] é real, porém a disponibilidade de grupos funcionais livres capazes de interagir com a membrana celular dos micro-organismos é um desafio na construção de dispositivos antimicrobianos. Soma-se a isso que a principal desvantagem dos recobrimentos antimicrobianos utilizando polímeros naturais está na presença de resíduos orgânicos, que formam contraditoriamente ambiente propício para a multiplicação de microrganismos [57]. Assim, os

filmes de biopolímeros não foram capazes de apresentar quantidade de quitosana suficiente para interagir com a cepa de *Candida albicans*. No entanto, esses recobrimentos permitiram a incorporação de  $\text{Ag}^+$  de uma forma simples e funcional, possibilitando a construção de uma superfície antimicrobiana que reduziu e, em alguns casos, inibiu completamente o crescimento do micro-organismo de teste.

**Tabela 4.9** – Resultados observados dos testes com *Candida albicans* frente aos recobrimentos de polímeros naturais e influência da incorporação de metal sobre a ação antifúngica dos filmes.

<i>Tipo de Amostra</i>	<i>Observações em 20 horas</i>	<i>Observações em 7 dias</i>
– Vidro – $(\text{PEI}_4)_1$ – $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ – $(\text{HA}/\text{CHI}_5)_{10}$ – $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ – $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ – $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ NaCl – $(\text{HA}/\text{CHI}_5)_{10}$ NaCl – $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ NaCl – $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ NaCl	Observa-se na intersecção da lâmina a filimentação da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir dos recobrimentos contendo os polímeros naturais.	Filimentação da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir do filme de biopolímeros, demonstrando blastoconídios em cachos e pseudohifas com clamidoconídios terminais.
– $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$ $\text{Ag}^+$	Observa-se na intersecção da lâmina a filimentação da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir dos recobrimentos contendo os polímeros naturais.	Observa-se na intersecção da lâmina a redução do crescimento e da filimentação da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir do filme.
– $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ $\text{Ag}^+$	Diminuição do crescimento e da filimentação da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir do filme.	Não houve crescimento da cepa de <i>Candida albicans</i> a partir do filme.

## Capítulo 5 – Conclusões

---

A técnica LbL é largamente desenvolvida para fornecer dispositivos adequados para necessidades precisas em diversos campos da ciência. Isso porque é possível controlar com grande precisão as propriedades químicas e estruturais dos filmes multicamadas formados. Neste trabalho, avaliou-se a influência de variáveis operacionais (pH e força iônica das soluções de polieletrólitos) sobre filmes LbL de diferentes materiais.

✓ A força iônica atua como um agente capaz de fazer com que segmentos da cadeia polimérica que se encontravam em arranjos lineares passem a apresentar conformações vermiculares, o que pode fazer com que os filmes fiquem mais espessos conforme essas cadeias enoveladas são depositadas, como foi verificado para o sistema ALG/CHI. Porém, a força iônica também oferece um mecanismo de blindagem dos segmentos de polieletrólitos em solução, impedindo a sua adsorção pelo substrato. Além disso, pode ocorrer o fenômeno de desdoração/desconstrução dos filmes quando estes são submetidos em meios de elevada concentração de NaCl. Esse fenômeno de redução de espessura com aumento da força iônica foi observado para filmes de HA/CHI em pH 3.

✓ A ausência de NaCl nas soluções faz com que ocorra mais repulsão entre os segmentos das cadeias dos polieletrólitos, adotando assim conformações mais lineares. A presença de sal no meio de deposição faz com que essas cadeias apresentem conformações com mais *loops* e *tails* e esse arranjo das cadeias em solução é transmitido para os filmes, que se tornam mais rugosos.

✓ A força motriz para a construção de recobrimentos LbL, quando as interações entre as moléculas formadoras do filme é eletrostática, é a disponibilidade de grupos funcionais carregados por parte dos polieletrólitos em solução, em concentração suficiente para que ocorra o processo de inversão de cargas da superfície do recobrimento que está sendo montado após cada etapa do processo de imersão. Foi verificado que para condições em que tanto o polycation quanto

o poliânion encontravam-se bastante carregados (% de grupos ionizados > 90%), foram obtidos filmes menos espessos. Porém, dependendo do tamanho das cadeias dos polieletrólitos, mesmo em condições de alta densidade de cargas, pode haver o fenômeno de interpenetração de camadas, e é possível que isso tenha ocorrido para o filme de HA/CHI, como verificado para os testes de ângulo de contato.

✓ Pelas análises de FTIR foi possível verificar a inserção de grupos funcionais de interesse sobre as lâminas de vidro. Essa análise é fundamental porque confirma, de fato, que o método de *layer-by-layer* é uma técnica de modificação química de superfícies.

✓ O azul de alciano se mostrou como um excelente indicador do processo de montagem e crescimento dos filmes com relação ao grau de carga original da solução polieletrólítica de ALG ou HA. O corante rosa de bengala é útil para o reconhecimento dos grupos catiônicos livres. Esses grupos são capazes de interagir com células de micro-organismos, podendo destruí-las. Esse conceito é particularmente útil para o design de superfícies antimicóticas ou antibacterianas, por exemplo.

✓ Filmes de biopolímeros não foram capazes de apresentar quantidade de quitosana suficiente para interagir com a cepa de *Candida albicans* o que permitiu o crescimento e proliferação do fungo sobre as amostras. No entanto, recobrimentos contendo íons de prata reduziram e, em alguns casos, inibiram completamente o crescimento do micro-organismo de teste.

# Capítulo 6 — Sugestões para trabalhos futuros

---

Como sugestão de trabalhos futuros, segue:

- ✓ Obter um revestimento, via *layer-by-layer*, com capacidades antibacterianas, testando tipos de bactérias presentes nos alimentos (*e.g.* *Escherichia coli* (*E. coli* "gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, gram-positivas)), e que podem causar intoxicação alimentar, além de requererem diferentes mecanismos bactericidas.
  
- ✓ Uso do *spray coating* para montagem de recobrimentos LbL. O *spray* tem se mostrado um método cerca de 40 vezes mais rápido que o tradicional *dip coating*.
  
- ✓ Utilizar quitosanas com diferentes massas molares e grau de desacetilação, visando obter materiais com elevados níveis de grupamentos amino funcionais.
  
- ✓ Realizar testes de adesão dos filmes de biopolímeros frente à cepa de *Candida albicans*.

# Referências bibliográficas

---

- [1] J.C. Tiller, Antimicrobial Surfaces, in: H.G. Borner, J.F. Lutz (Eds.) *Bioactive Surfaces*, Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2011, pp. 193-217.
- [2] J.C. Tiller, C.J. Liao, K. Lewis, A.M. Klibanov, Designing surfaces that kill bacteria on contact, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 5981-5985.
- [3] P.-H. Chua, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, W. Wang, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, 29 (2008) 1412-1421.
- [4] J. Fu, J. Ji, W. Yuan, J. Shen, Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan, *Biomaterials*, 26 (2005) 6684-6692.
- [5] Y. Yang, Q. He, L. Duan, Y. Cui, J. Li, Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application, *Biomaterials*, 28 (2007) 3083-3090.
- [6] W. Yuan, H. Dong, C. Li, X. Cui, L. Yu, Z. Lu, Q. Zhou, pH-Controlled construction of chitosan/alginate multilayer film: Characterization and application for antibody immobilization, *Langmuir*, 23 (2007) 13046-13052.
- [7] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 1457-1465.
- [8] W.R. Gombotz, S. Wee, Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 (1998) 267-285.
- [9] S. Yamanlar, S. Sant, T. Boudou, C. Picart, A. Khademhosseini, Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials*, 32 (2011) 5590-5599.
- [10] M. Rinaudo, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polymer International*, 57 (2008) 397-430.

- [11] F.C. Vasconcellos, Produção de nanoestruturas de biopolímeros através de deposição "Layer-by-Layer" com propriedades antibacterianas e de imobilização de linfócitos, in, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2011.
- [12] L. Richert, P. Lavalle, E. Payan, X. Shu, G. Prestwich, J. Stoltz, P. Schaaf, J. Voegel, C. Picart, Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects, *Langmuir*, 20 (2004) 448-458.
- [13] J.A. Lichter, M.F. Rubner, Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations, *Langmuir*, 25 (2009) 7686-7694.
- [14] D. Yoo, S.S. Shiratori, M.F. Rubner, Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes, *Macromolecules*, 31 (1998) 4309-4318.
- [15] J.A. Lichter, M.T. Thompson, M. Delgadillo, T. Nishikawa, M.F. Rubner, K.J. Van Vliet, Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1571-1578.
- [16] O. Etienne, C. Gasnier, C. Taddei, J.-C. Voegel, D. Aunis, P. Schaaf, M.-H. Metz-Boutigue, A.-L. Bolcato-Bellemin, C. Egles, Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films, *Biomaterials*, 26 (2005) 6704-6712.
- [17] A.J. Karlsson, R.M. Flessner, S.H. Gellman, D.M. Lynn, S.P. Palecek, Polyelectrolyte Multilayers Fabricated from Antifungal  $\beta$ -Peptides: Design of Surfaces that Exhibit Antifungal Activity Against *Candida albicans*, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 2321-2328.
- [18] P. Berndt, K. Kurihara, T. Kunitake, Adsorption of poly(styrenesulfonate) onto an ammonium monolayer on mica: a surface forces study, *Langmuir*, 8 (1992) 2486-2490.
- [19] U. Voigt, V. Khrenov, K. Thuer, M. Hahn, W. Jaeger, R. von Klitzing, The effect of polymer charge density and charge distribution on the formation of multilayers, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 15 (2003) S213-S218.
- [20] U. Voigt, W. Jaeger, G.H. Findenegg, R.v. Klitzing, Charge Effects on the Formation of Multilayers Containing Strong Polyelectrolytes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (2003) 5273-5280.
- [21] G. Decher, Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, *Science*, 277 (1997) 1232-1237.

- [22] B. Schoeler, G. Kumaraswamy, F. Caruso, Investigation of the Influence of Polyelectrolyte Charge Density on the Growth of Multilayer Thin Films Prepared by the Layer-by-Layer Technique, *Macromolecules*, 35 (2002) 889-897.
- [23] S. Yang, Y. Zhang, X. Zhang, Y. Guan, J. Xu, X. Zhang, From Cloudy to Transparent: Chain Rearrangement in Hydrogen-Bonded Layer-by-Layer Assembled Films, *ChemPhysChem*, 8 (2007) 418-424.
- [24] T. Cassier, K. Lowack, G. Decher, Layer-by-layer assembled protein/polymer hybrid films: nanoconstruction via specific recognition, *Supramolecular Science*, 5 (1998) 309-315.
- [25] T. Serizawa, K. Nanameki, K. Yamamoto, M. Akashi, Thermoresponsive Ultrathin Hydrogels Prepared by Sequential Chemical Reactions, *Macromolecules*, 35 (2002) 2184-2189.
- [26] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption, *Journal of the American Chemical Society*, 117 (1995) 6117-6123.
- [27] F.J. Pavinatto, L. Caseli, O.N. Oliveira, Chitosan in Nanostructured Thin Films, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 1897-1908.
- [28] K. Ren, Y. Wang, J. Ji, Q. Lin, J. Shen, Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: Effect of ionic strength, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46 (2005) 63-69.
- [29] F.C. Vasconcellos, A.J. Swiston, M.M. Beppu, R.E. Cohen, M.F. Rubner, Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: Hyaluronic Acid Mediated B Lymphocyte Adhesion, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 2407-2414.
- [30] S.T. Dubas, P. Kumlangdudsana, P. Potiyaraj, Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 289 (2006) 105-109.
- [31] D. Yoo, S. Shiratori, M. Rubner, Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes, *Macromolecules*, 31 (1998) 4309-4318.
- [32] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers, *Macromolecules*, 32 (1999) 8153-8160.
- [33] S.S. Shiratori, M.F. Rubner, pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes, *Macromolecules*, 33 (2000) 4213-4219.

- [34] K. Ariga, J.P. Hill, Q. Ji, Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9 (2007) 2319-2340.
- [35] D.T. Haynie, L. Zhang, W. Zhao, J.S. Rudra, Protein-inspired multilayer nanofilms: science, technology and medicine, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2 (2006) 150-157.
- [36] M. Elzbieciak, M. Kolasinska, P. Warszynski, Characteristics of polyelectrolyte multilayers: The effect of polyion charge on thickness and wetting properties, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 321 (2008) 258-261.
- [37] P. Lavalle, C. Gergely, F.J.G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.C. Voegel, C. Picart, Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study, *Macromolecules*, 35 (2002) 4458-4465.
- [38] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. Prestwich, P. Schaaf, J. Voegel, P. Lavalle, Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 12531-12535.
- [39] M. Elzbieciak, M. Kolasinska, S. Zapotoczny, R. Krastev, M. Nowakowska, P. Warszyński, Nonlinear growth of multilayer films formed from weak polyelectrolytes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343 (2009) 89-95.
- [40] R. Advincula, E. Aust, W. Meyer, W. Knoll, In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy, *Langmuir*, 12 (1996) 3536-3540.
- [41] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction, *Macromolecules*, 34 (2001) 3736-3740.
- [42] O.J. Rojas, P.M. Claesson, D. Muller, R.D. Neuman, The Effect of Salt Concentration on Adsorption of Low-Charge-Density Polyelectrolytes and Interactions between Polyelectrolyte-Coated Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 205 (1998) 77-88.
- [43] R.A. McAloney, M. Sinyor, V. Dudnik, M.C. Goh, Atomic Force Microscopy Studies of Salt Effects on Polyelectrolyte Multilayer Film Morphology, *Langmuir*, 17 (2001) 6655-6663.

- [44] M. Delcea, H. Möhwald, A.G. Skirtach, Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 730-747.
- [45] Y. Tsuge, J. Kim, Y. Sone, O. Kuwaki, S. Shiratori, Fabrication of transparent TiO<sub>2</sub> film with high adhesion by using self-assembly methods: Application to super-hydrophilic film, *Thin Solid Films*, 516 (2008) 2463-2468.
- [46] J. Han, Y. Dou, M. Wei, D.G. Evans, X. Duan, Antireflection/antifogging coatings based on nanoporous films derived from layered double hydroxide, *Chemical Engineering Journal*, 169 (2011) 371-378.
- [47] M. Cowan, K. Abshire, S. Houk, S. Evans, Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (2003) 102-106.
- [48] P.K. Dutta, S. Tripathi, G.K. Mehrotra, J. Dutta, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chemistry*, 114 (2009) 1173-1182.
- [49] C.H. Ho, J. Tobis, C. Sprich, R. Thomann, J.C. Tiller, Nanoseparated Polymeric Networks with Multiple Antimicrobial Properties, *Advanced Materials*, 16 (2004) 957-961.
- [50] K. Lewis, A.M. Klibanov, Surpassing nature: rational design of sterile-surface materials, *Trends in Biotechnology*, 23 (2005) 343-348.
- [51] Z. Li, D. Lee, X. Sheng, R.E. Cohen, M.F. Rubner, Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities, *Langmuir*, 22 (2006) 9820-9823.
- [52] R. Tankhiwale, S.K. Bajpai, Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69 (2009) 164-168.
- [53] S.Y. Liao, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell, Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions, *Letters in Applied Microbiology*, 25 (1997) 279-283.
- [54] H.M.C.d. Azeredo, Nanocomposites for food packaging applications, *Food Research International*, 42 (2009) 1240-1253.
- [55] C. Damm, H. Münstedt, A. Rösch, The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites, *Materials Chemistry and Physics*, 108 (2008) 61-66.

- [56] C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (2010) 1531-1551.
- [57] M. Katsikogianni, I. Spiliopoulou, D.P. Dowling, Y.F. Missirlis, Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17 (2006) 679-689.
- [58] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J.-B. Roulet, Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2008) 869-876.
- [59] E. Falletta, M. Bonini, E. Fratini, A. Lo Nostro, G. Pesavento, A. Becheri, P. Lo Nostro, P. Canton, P. Baglioni, Clusters of Poly(acrylates) and Silver Nanoparticles: Structure and Applications for Antimicrobial Fabrics, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 11758-11766.
- [60] L.L. Woodyard, T.L. Bowersock, J.J. Turek, G.P. McCabe, J. Deford, A comparison of the effects of several silver-treated intravenous catheters on the survival of staphylococci in suspension and their adhesion to the catheter surface, *Journal of Controlled Release*, 40 (1996) 23-30.
- [61] V. Sambhy, M.M. MacBride, B.R. Peterson, A. Sen, Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 9798-9808.
- [62] R. Hauert, A review of modified DLC coatings for biological applications, *Diamond and Related Materials*, 12 (2003) 583-589.
- [63] M. Ishihara, T. Kosaka, T. Nakamura, K. Tsugawa, M. Hasegawa, F. Kokai, Y. Koga, Antibacterial activity of fluorine incorporated DLC films, *Diamond and Related Materials*, 15 (2006) 1011-1014.
- [64] J.A. Lichter, K.J. Van Vliet, M.F. Rubner, Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform, *Macromolecules*, 42 (2009) 8573-8586.
- [65] A.M. Abdel-Mohsen, R. Hrdina, L. Burgert, R.M. Abdel-Rahman, M. Hašová, D. Šmejkalová, M. Kolář, M. Pekar, A.S. Aly, Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 92 (2013) 1177-1187.

- [66] L. Richert, P. Lavalle, E. Payan, X.Z. Shu, G.D. Prestwich, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel, C. Picart, Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects, *Langmuir*, 20 (2004) 448-458.
- [67] W. Ye, M.F. Leung, J. Xin, T.L. Kwong, D.K.L. Lee, P. Li, Novel core-shell particles with poly(n-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles, *Polymer*, 46 (2005) 10538-10543.
- [68] H.-J. Tseng, S.-h. Hsu, M.-W. Wu, T.-H. Hsueh, P.-C. Tu, Nylon textiles grafted with chitosan by open air plasma and their antimicrobial effect, *Fibers and Polymers*, 10 (2009) 53-59.
- [69] A.A. Tayel, S. Moussa, W.F. El-Tras, D. Knittel, K. Opwis, E. Schollmeyer, Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47 (2010) 454-457.
- [70] M.M.G. Fouda, A. El Shafei, S. Sharaf, A. Hebeish, Microwave curing for producing cotton fabrics with easy care and antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009) 651-655.
- [71] X. Tao, H. Chen, X.-J. Sun, J.-F. Chen, W.H. Roa, Formulation and cytotoxicity of doxorubicin loaded in self-assembled bio-polyelectrolyte microshells, *International Journal of Pharmaceutics*, 336 (2007) 376-381.
- [72] F. Seyfarth, S. Schliemann, P. Elsner, U.C. Hipler, Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*, *International Journal of Pharmaceutics*, 353 (2008) 139-148.
- [73] A. Palmeira-de-Oliveira, L.A. Passarinha, C. Gaspar, R. Palmeira-de-Oliveira, B. Sarmiento, J. Martinez-de-Oliveira, C. Pina-Vaz, A.G. Rodrigues, J.A. Queiroz, The relationship between *Candida* species charge density and chitosan activity evaluated by ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 3749-3751.
- [74] J. Knapczyk, A.B. Macura, B.s. Pawlik, Simple tests demonstrating the antimycotic effect of chitosan, *International Journal of Pharmaceutics*, 80 (1992) 33-38.
- [75] K. Ziani, I. Fernández-Pan, M. Royo, J.I. Maté, Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi, *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 2309-2314.
- [76] S. Roller, N. Covill, The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice, *International Journal of Food Microbiology*, 47 (1999) 67-77.

- [77] M. Aider, Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2010) 837-842.
- [78] H.K. No, N. Young Park, S. Ho Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74 (2002) 65-72.
- [79] A. Haug, B. Larsen, Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates, *Acta Chemica Scandinavica*, 16 (1962) 1908-1918.
- [80] C.J. Knill, J.F. Kennedy, J. Mistry, M. Mirafteb, G. Smart, M.R. Grocock, H.J. Williams, Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings, *Carbohydrate Polymers*, 55 (2004) 65-76.
- [81] R.D. Price, M.G. Berry, H.A. Navsaria, Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60 (2007) 1110-1119.
- [82] Q. Feng, G. Zeng, P. Yang, C. Wang, J. Cai, Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 257–258 (2005) 85-88.
- [83] R.-H. Jin, J.-J. Yuan, Biomimetically Controlled Formation of Nanotextured Silica/Titania Films on Arbitrary Substrates and Their Tunable Surface Function, *Advanced Materials*, 21 (2009) 3750-3753.
- [84] P. Ahmadiannamini, X. Li, W. Goyens, N. Joseph, B. Meesschaert, I.F.J. Vankelecom, Multilayered polyelectrolyte complex based solvent resistant nanofiltration membranes prepared from weak polyacids, *Journal of Membrane Science*, 394–395 (2012) 98-106.
- [85] S. Tomita, K. Sato, J.-i. Anzai, Layer-by-layer assembled thin films composed of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer as a pH-sensitive nano-device, *Journal of Colloid and Interface Science*, 326 (2008) 35-40.
- [86] M.M. de Villiers, D.P. Otto, S.J. Strydom, Y.M. Lvov, Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 701-715.
- [87] A.J. Chung, M.F. Rubner, Methods of Loading and Releasing Low Molecular Weight Cationic Molecules in Weak Polyelectrolyte Multilayer Films, *Langmuir*, 18 (2002) 1176-1183.
- [88] J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha, *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos Guanabara Koogan*, 2004.

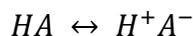
- [89] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*, Wiley, 1978.
- [90] R. von Klitzing, Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8 (2006) 5012-5033.
- [91] R. CHEN, W. LIN, J. LIN, EFFECTS OF PH, IONIC-STRENGTH, AND TYPE OF ANION ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF CHITOSAN SOLUTIONS, *Acta Polymerica*, 45 (1994) 41-46.
- [92] R. v. Klitzing, Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8 (2006).
- [93] A.J. Nolte, N. Takane, E. Hindman, W. Gaynor, M.F. Rubner, R.E. Cohen, Thin Film Thickness Gradients and Spatial Patterning via Salt Etching of Polyelectrolyte Multilayers, *Macromolecules*, 40 (2007) 5479-5486.
- [94] C. Picart, P. Lavallo, P. Hubert, F.J.G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.C. Voegel, Buildup Mechanism for Poly(l-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface, *Langmuir*, 17 (2001) 7414-7424.
- [95] M.R. Bohmer, O.A. Evers, J.M.H.M. Scheutjens, Weak polyelectrolytes between two surfaces: adsorption and stabilization, *Macromolecules*, 23 (1990) 2288-2301.
- [96] A. Fery, B. Schöler, T. Cassagneau, F. Caruso, Nanoporous Thin Films Formed by Salt-Induced Structural Changes in Multilayers of Poly(acrylic acid) and Poly(allylamine), *Langmuir*, 17 (2001) 3779-3783.
- [97] A. Ikeda, A. Takemura, H. Ono, Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis, *Carbohydrate Polymers*, 42 (2000) 421-425.
- [98] D.W. Grainger, D.G. Castner, 3.301 - Surface Analysis and Biointerfaces: Vacuum and Ambient In Situ Techniques, in: D. Editor-in-Chief: Paul (Ed.) *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, Oxford, 2011, pp. 1-22.
- [99] M. Tirrell, E. Kokkoli, M. Biesalski, The role of surface science in bioengineered materials, *Surface Science*, 500 (2002) 61-83.
- [100] L.L. Kazmerski, Analysis and characterization of thin films: A tutorial, *Solar Cells*, 24 (1988) 387-418.
- [101] B.D. Ratner, Chapter 8 Characterization of biomaterial surfaces, *Cardiovascular Pathology*, 2 (1993) 87-100.

- [102] C. Picart, A. Schneider, O. Etienne, J. Mutterer, P. Schaaf, C. Egles, N. Jessel, J.C. Voegel, Controlled Degradability of Polysaccharide Multilayer Films In Vitro and In Vivo, *Advanced Functional Materials*, 15 (2005) 1771-1780.
- [103] N.M. Alves, C. Picart, J.F. Mano, Self Assembling and Crosslinking of Polyelectrolyte Multilayer Films of Chitosan and Alginate Studied by QCM and IR Spectroscopy, *Macromolecular Bioscience*, 9 (2009) 776-785.
- [104] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, L. Grøndahl, Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 2533-2541.
- [105] R.G. Paiva, Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre, in: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas - SP, 2009.
- [106] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339 (2004) 2693-2700.
- [107] K. Vimala, Y.M. Mohan, K.S. Sivudu, K. Varaprasad, S. Ravindra, N.N. Reddy, Y. Padma, B. Sreedhar, K. MohanaRaju, Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76 (2010) 248-258.
- [108] S. Lin, R. Huang, Y. Cheng, J. Liu, B.L.T. Lau, M.R. Wiesner, Silver nanoparticle-alginate composite beads for point-of-use drinking water disinfection, *Water Research*.
- [109] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*, 33 (2007) 139-148.
- [110] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (2000) 662-668.
- [111] S. Ye, C. Wang, X. Liu, Z. Tong, Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16 (2005) 909-923.
- [112] D.A. Skoog, D.M. West, *Fundamentals of analytical chemistry*, Saunders College Pub., 1982.

## Anexo 1 – Grau de ionização dos polieletrólitos

---

Da dissociação de ácidos fracos temos:



A constante de dissociação dos ácidos ( $K_a$ ) é dada por:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Rearranjando:

$$\frac{K_a}{[H^+]} = \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Aplicando logaritmo na base 10:

$$\log\left(\frac{K_a}{[H^+]}\right) = \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

Das propriedades logarítmicas obtém-se:

$$\log K_a - \log[H^+] = \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

Como  $pK_a = -\log K_a$  e  $pH = -\log[H^+]$ , tem-se:

$$-pK_a + pH = \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

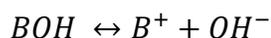
Solucionando o logaritmo:

$$10^{-pK_a+pH} = \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Rearranjando:

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{pH-pK_a}$$

Da dissociação de bases fracas temos:



A constante de dissociação das bases ( $K_b$ ) é dada por:

$$K_b = \frac{[B^+][OH^-]}{[BOH]}$$

Rearranjando:

$$\frac{K_b}{[OH^-]} = \frac{[B^+]}{[BOH]}$$

Aplicando o logaritmo:

$$\log K_b - \log[OH^-] = \log\left(\frac{[B^+]}{[BOH]}\right)$$

Como  $pK_b = -\log K_b$  e  $pOH = -\log[OH^-]$ , tem-se:

$$-pK_b + pOH = \log\left(\frac{[B^+]}{[BOH]}\right)$$

Sendo  $pH + pOH = pK_w$

$$-pK_b + pK_w - pH = \log\left(\frac{[B^+]}{[BOH]}\right)$$

Sendo  $K_a \times K_b = K_w$  e  $pK_a + pK_b = pK_w$ , obtém-se:

$$pK_a - pH = \log\left(\frac{[B^+]}{[BOH]}\right)$$

Resolvendo o logaritmo:

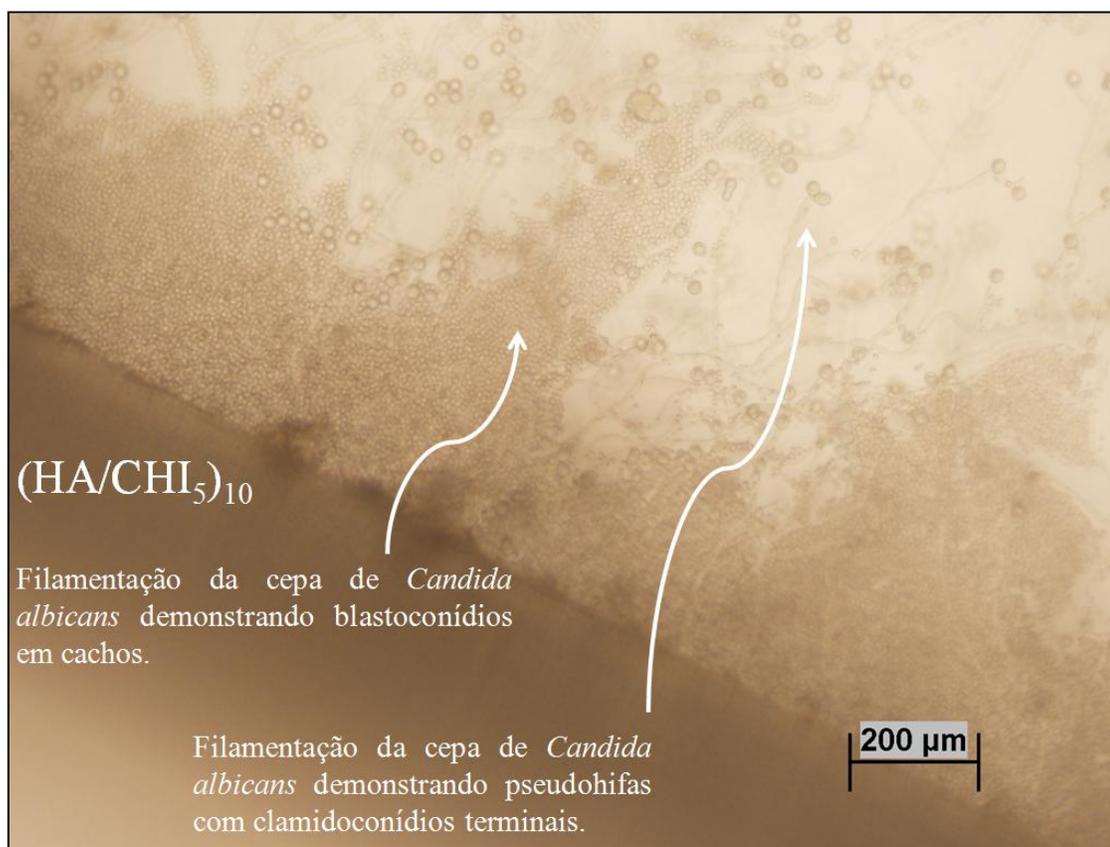
$$\frac{[B^+]}{[BOH]} = 10^{pK_a - pH}$$

Referência: Skoog, D.A., and D.M. West. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Saunders College Pub., 1982.

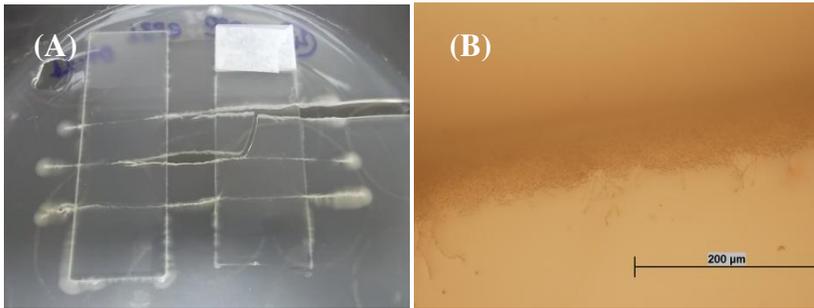
## Anexo 2 – Macro/Microscopia dos testes com *Candida albicans*

---

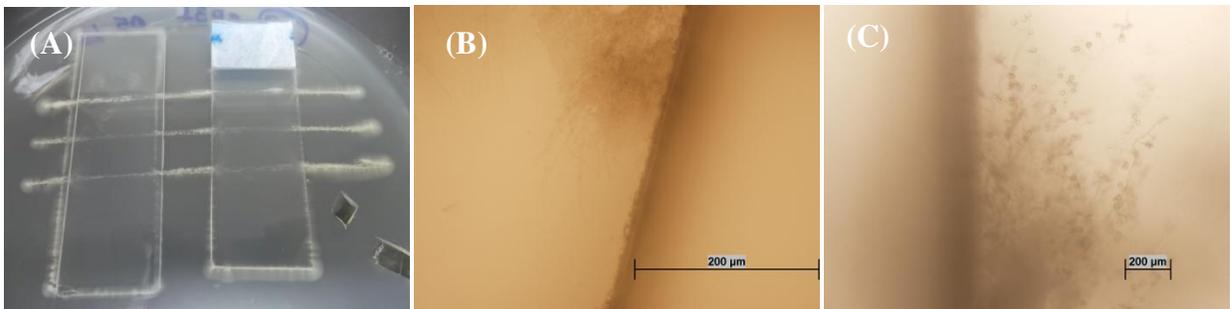
As **Figuras A.1** até **A.11** mostram as macro/microscopias dos testes de atividade dos filmes contendo polímeros naturais frente à *Candida albicans*. Houve um pronunciado crescimento do micro-organismo quando em contato com os recobrimentos, não havendo praticamente distinção entre as lâminas testes (com polímeros) e as lâminas controle (apenas vidro). Com 20 horas já foi possível visualizar o início do crescimento do fungo e com 7 dias foram detectadas estruturas de clamoconídios em cachos e pseudohifas, que identificam a instalação da cepa no meio de cultura.



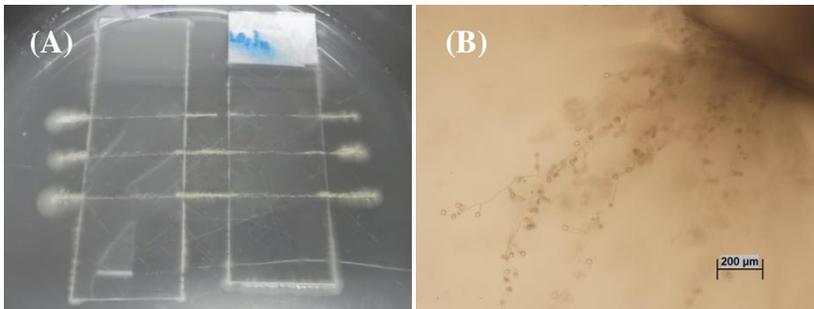
**Figura A.1** – Microscopia do filme de (HA/CHI5)10 indicando o crescimento de *Candida albicans* na amostra.



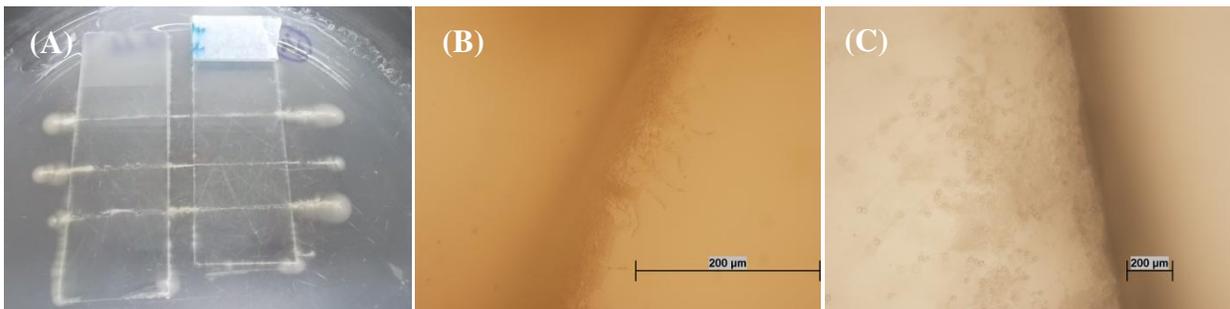
**Figura A.2** – Vidro. (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.



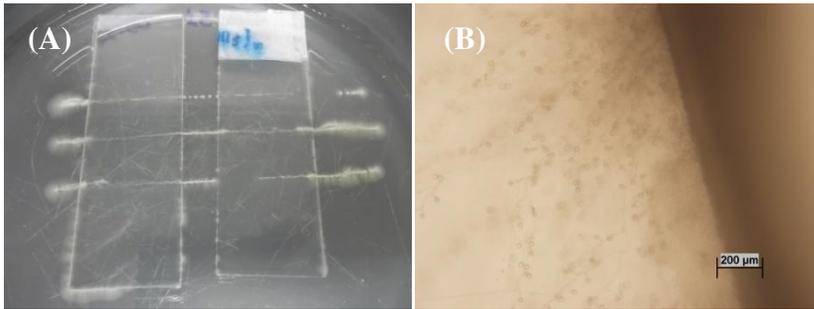
**Figura A.3** – PEI<sub>4</sub> NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.



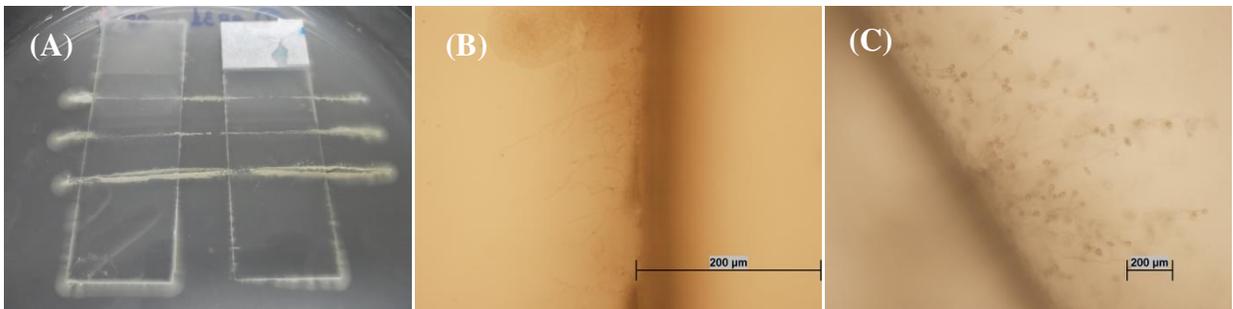
**Figura A.4** – (ALG/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub>. (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.



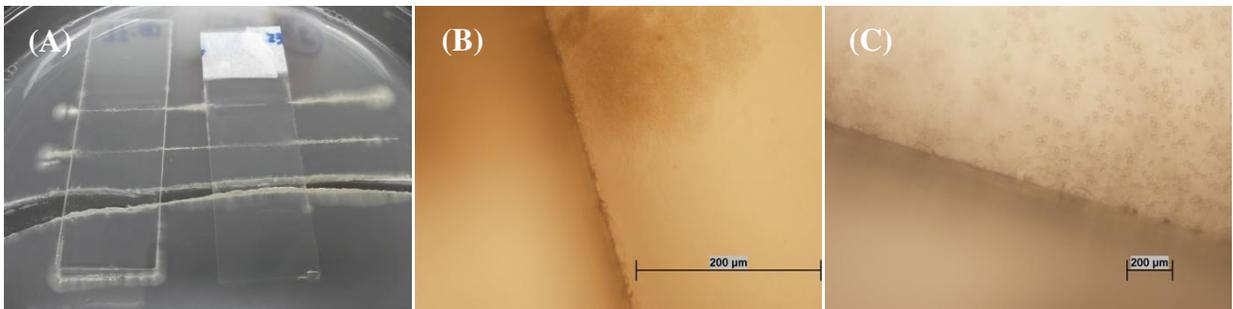
**Figura A.5** – (ALG/CHI<sub>3</sub>)<sub>10</sub> NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) dias.



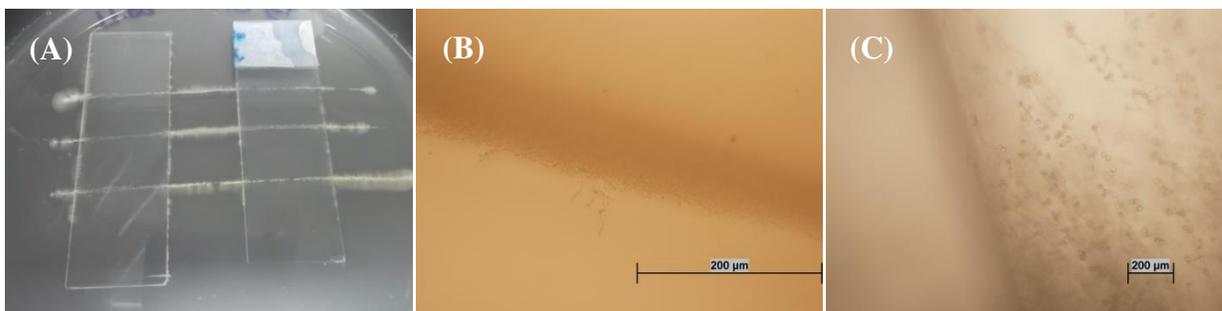
**Figura A.6** –  $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, (B) Microscopia de 7 dias.



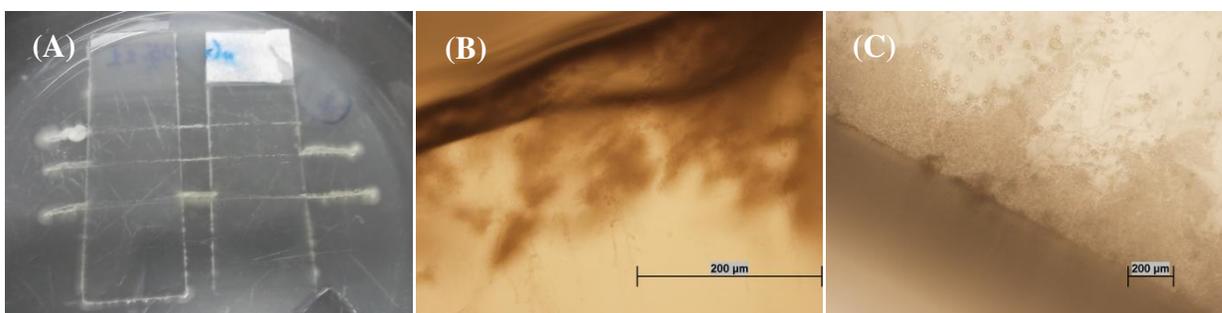
**Figura A.7** –  $(\text{ALG}/\text{CHI}_5)_{10}$  NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.



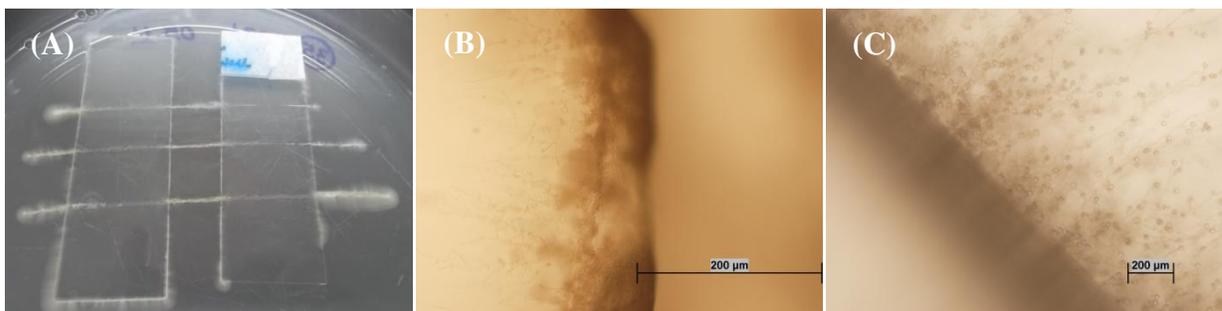
**Figura A.8** –  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.



**Figura A.9** –  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$  NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.



**Figura A.10** –  $(\text{HA}/\text{CHI}_5)_{10}$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.



**Figura A.11** –  $(\text{HA}/\text{CHI}_5)_{10}$  NaCl. (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.

As **Figuras A.12** e **A.13** mostram as macro/microscopias dos testes de atividade dos filmes contendo íons de prata frente à *Candida albicans*. Filmes de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10}$   $\text{Ag}^+$  exibem maior atividade de inibição quando comparado aos de  $(\text{ALG}/\text{CHI}_3)_{10}$   $\text{Ag}^+$ . Como foi explicado na seção de resultados, a arquitetura dos filmes de ácido hialurônico permitiu maior incorporação de íons de prata, que é o agente ativo responsável pela função antimicótica dos mesmos.

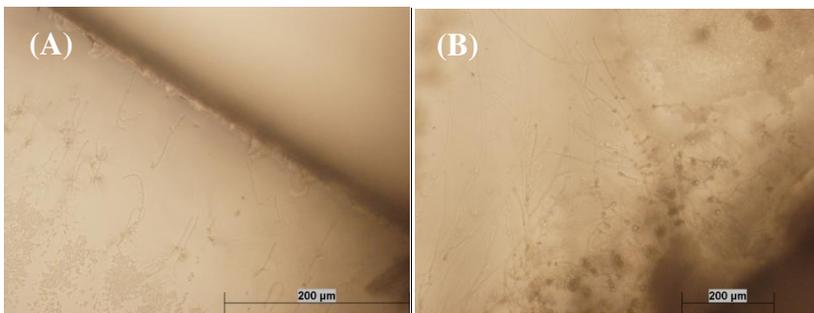


Figura A.12 –  $(\text{ALG/CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ . Microscopia de (A) 20 horas e (B) 7 dias.

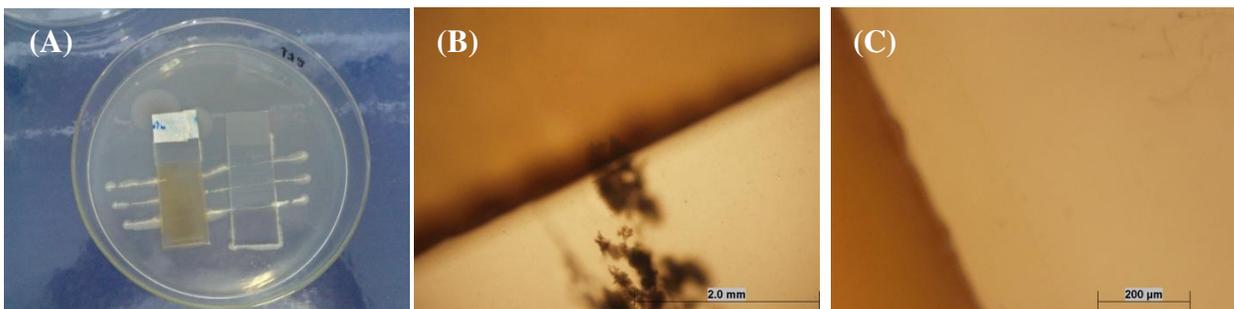
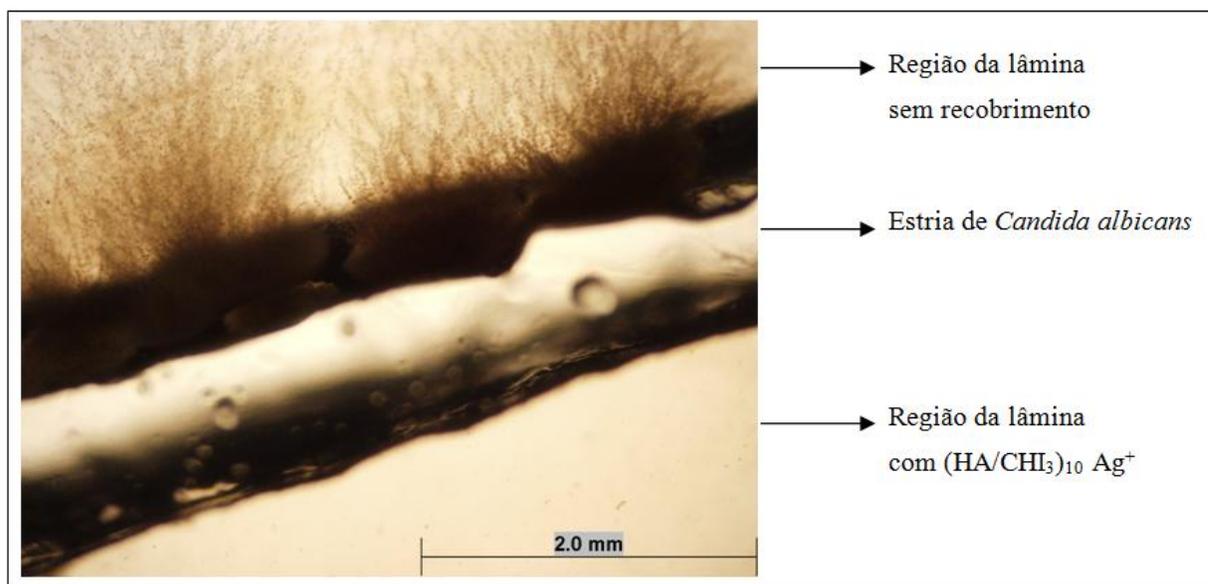
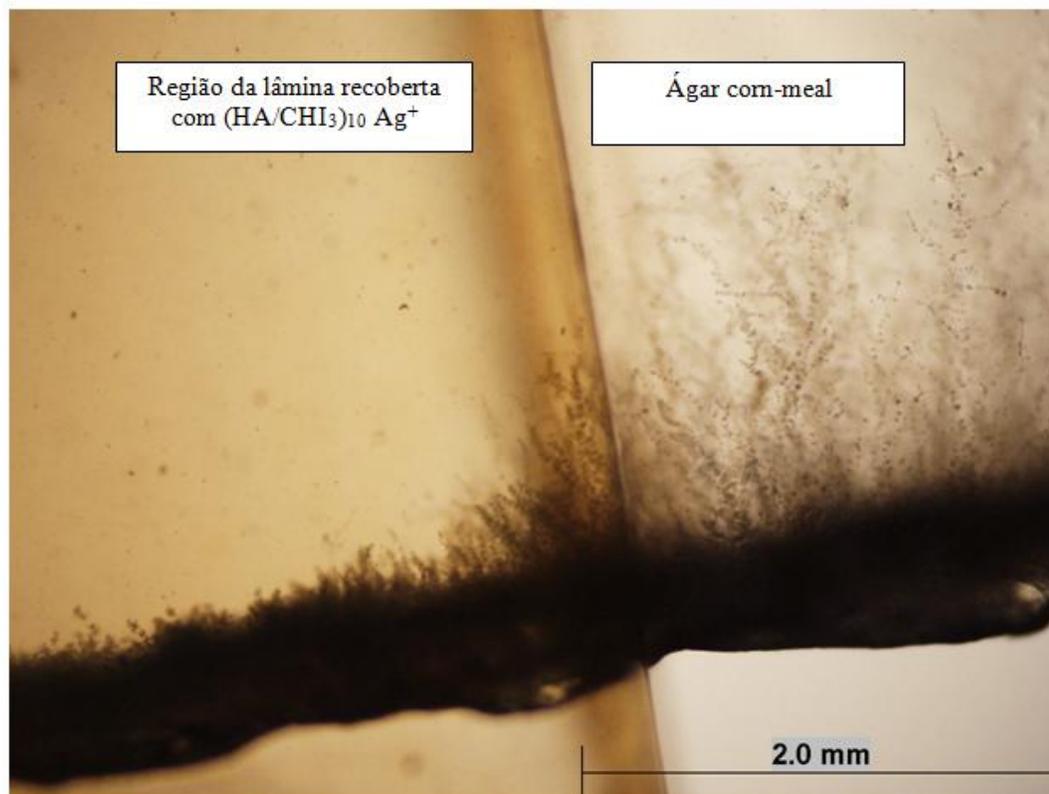


Figura A.13 –  $(\text{HA/CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ . (A) Macroscopia de 7 dias, Microscopia de (B) 20 horas e (C) 7 dias.

Nas **Figuras A.14 e A.15**, é possível ver que o fungo não cresce na região contendo o filme *LbL* de  $(\text{HA/CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ , pois há ausência de pseudohifas com clamoconídios terminais e blastoconídios em cachos na área recoberta. Em alguns casos foi possível verificar na macroscopia a ausência da estria de *Candida albicans* aplicada inicialmente no ágar.



**Figura A.14** – Estria no limite superior do filme de  $(\text{HA}/\text{CHI}_3)_{10} \text{Ag}^+$ . Campo acima: fora de contato com o filme, observa-se focos de filamentação. Abaixo: contato com o filme, ausência de crescimento fúngico. Microscopia de 96 horas de contato.



**Figura A.15** – Efeito do recobrimento sobre o fungo. Na região abaixo da lâmina não há crescimento do micro-organismo. Na região do ágar, o crescimento é pronunciado.