



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

MARCELLE BRUNA DE MENDONÇA SPERA

**CRESCIMENTO DE FILMES DE BIOPOLÍMEROS DEPOSITADOS POR
LAYER-BY-LAYER: DINÂMICA DE RUGOSIDADE E INTERAÇÃO**

CAMPINAS

2017

MARCELLE BRUNA DE MENDONÇA SPERA

**CRESCIMENTO DE FILMES DE BIOPOLÍMEROS DEPOSITADOS POR
LAYER-BY-LAYER: DINÂMICA DE RUGOSIDADE E INTERAÇÃO**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestra em Engenharia Química.*

Orientadora: Prof. Dra. MARISA MASUMI BEPPU

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARISA MASUMI BEPPU

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 133603/2015-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Sp36c Spera, Marcelle Bruna de Mendonça, 1991-
Crescimento de filmes de biopolímeros depositados por layer-by-layer :
dinâmica de rugosidade e interação / Marcelle Bruna de Mendonça Spera. –
Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Biopolímeros. 2. Rugosidade. 3. Quitosana. I. Beppu, Marisa
Masumi, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biopolymer thin film growth by layer-by-layer deposition :
roughness dynamic and interaction

Palavras-chave em inglês:

Biopolymers

Roughness

Chitosan

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Celso Aparecido Bertran

Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Data de defesa: 20-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Marcelle Bruna de Mendonça Spera e aprovada em 20 de fevereiro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dra. Marisa Masumi Beppu

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

A Ata da Defesa consta no processo de vida acadêmica da aluna.

*Para minha família e meu noivo,
Que me possibilitaram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem o qual nada teria sentido.

A meus pais, Geraldo e Cristina: que passaram uma vida toda investindo em mim e me apoiando. Essa conquista também é de vocês.

À minha irmã, Natalia: pela força e paciência durante esses 2 anos, me ajudando a distrair quando eu mais precisava.

A meu noivo e melhor amigo, Franco: não tenho palavras para agradecer o apoio e a força em toda essa caminhada. A distância física não me deixou nenhum momento desamparada dos seus carinhos e atenção.

Ao melhor cachorro do mundo, Bilbo: obrigada por dormir aos meus pés por todos os dias que precisei ficar escrevendo esse texto. Me fez sentir menos só e mais motivada.

À Neli Eliane Parra: obrigada por me acolher em sua casa sempre que precisei e me facilitar muito o processo de conclusão desse trabalho.

À Professora Marisa Beppu: obrigada pelos conselhos e paciência. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu acreditava e por respeitar meu jeito de ser. Sem você esse trabalho não seria possível.

À Thiago Taketa: muito obrigada pela ajuda na deposição dos filmes. Você deu uma enorme contribuição a esse trabalho e fez com que a qualidade dele fosse muito melhor do que eu esperava.

À equipe do layer-by-layer, Thiago, Rogério, Jacobo, João, Reginaldo, Vicente e Kleber: sempre dispostos a ajudar e trocar ideias, facilitando a jornada.

Ao pessoal do LEQUIP, Carla, Laise, Cynthia, Giovana, Luciana e Bruno: Obrigada pelo bom ambiente de trabalho. Agradeço também a Silvia Valles pela ótima recepção e acolhimento.

Ao LAMULT/IFGW: Por possibilitar a realização das análises.

Aos Professores da banca de qualificação, Prof. Dr. Celso Bertran e Prof. Dr. Marcos Akira: obrigada pelos conselhos e pela avaliação crítica que permitiu crescimento e melhoria do trabalho.

Aos Professores da banca de defesa, Prof. Dr. Celso Bertran e Prof. Dr. Pedro Pessôa Filho: obrigada por aceitarem o convite e participarem da conclusão desse estudo.

Ao órgão de fomento, CNPq: pelo financiamento da pesquisa.

*“Palavras são, na minha nada humilde opinião,
nossa inesgotável fonte de magia.”*

J. K. Rowling

RESUMO

Utilizados para recuperar funções ou partes do corpo humano, os biomateriais estão cada vez mais presentes na medicina. Quando não-absorvíveis, suas interações com o sistema biológico ocorrem em sua superfície, pois nela acontece o contato direto com o organismo e a criação de uma interface com o meio. Desta maneira, a rugosidade e morfologia da superfície têm grande importância no desempenho desses biomateriais, influenciando a adesão celular, bacteriana e de biomoléculas. O presente trabalho procura estudar a dinâmica de formação da rugosidade através da modelagem do crescimento da superfície por equações matemáticas contínuas. Para isso, partiu-se de modelos de crescimento de filmes derivados do conceito de escalonamento de fractais *self-affine*, a fim de encontrar parâmetros que permitam descrever o sistema. Foram estudados nanofilmes de polímeros naturais, com camadas contendo quitosana e carboximetilcelulose, ambas não-tóxicas e biocompatíveis com o sistema biológico humano. A formação dos filmes foi realizada por deposição *layer-by-layer*, na qual os polímeros se atraem majoritariamente por interações eletrostáticas. Essa técnica tem como objetivo a formação de filmes multicamadas, reproduzíveis, estáveis e que possam ser compostos por diferentes materiais de interesse. Possui ampla aplicação na biomedicina, podendo ser utilizada para criação de superfícies antibacterianas, biossensores e na criação de recobrimentos para melhorar a biocompatibilidade. A caracterização foi feita por microscopia de força atômica e o estudo permitiu concluir que mesmo utilizando polímeros naturais, os quais apresentam variações inclusive entre lotes, foi possível obter resultados condizentes com a literatura. Com base nos parâmetros de rugosidade e altura, além das características de interação entre as bicamadas, sugere-se que seja utilizado um modelo não-linear para analisar o crescimento dos filmes.

Palavras-chave: *crescimento de filmes; rugosidade; deposição layer-by-layer; biomateriais.*

ABSTRACT

Used to recover function or body parts, biomaterials are nowadays more and more present in medicine. Most of its important interactions with the biological system take place at the surface, due to the direct contact with the organism, creating an interface with the media. The roughness and morphology of the surface have great impact on the biomaterial performance, affecting cell, bacterial and biomolecules adhesion. The present work intends to study the dynamics of roughness formation through mathematical modelling of the surface growth by continuous equations. To do so, models for film growth based on scaling concepts of self-affine fractals were used to find parameters that could describe the system. It was analyzed a natural polymer nanofilm, with layers of chitosan and carboxymethylcellulose, both non-toxic and biocompatible with human biological system. The technique to make the films was layer-by-layer deposition, where the polymers are attracted to each other by electrostatic interactions to form reproducible and stable thin films. This technique has broad application in biomedicine, been applied on the creation of antibacterial surfaces, biosensors and coatings for improvement of biocompatibility. The data was obtained by atomic force microscopy and the results were compatible with the literature. Based on the roughness parameters and interaction between the layer of the film, it is suggested a non-linear model to describe the film growth.

Key-words: film growth; roughness; layer-by-layer deposition; biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitina e da quitosana	21
Figura 2 - Celulose e carboximetil celulose (CMC).....	23
Figura 3 - Deposição <i>layer-by-layer</i>	26
Figura 4 - Métodos de deposição <i>layer-by-layer</i>	27
Figura 5 - Curva de Koch (flocos de neve).....	31
Figura 6 - Escalonamento <i>self-similar</i> (a) e <i>self-affine</i> (b)	33
Figura 7 - Ilustração da dimensão fractal de uma superfície	34
Figura 8 - Dimensão fractal da curva de Koch.....	35
Figura 9 - Importância do estudo de interfaces	37
Figura 10 - Ilustração da camada em estudo	38
Figura 11 - Ilustração do número de camadas efetivamente depositadas	38
Figura 12 - Regimes de espessura durante crescimento da interface	39
Figura 13 - Deposição randômica	42
Figura 14 - Interface formada por RD.....	43
Figura 15 - Deposição randômica com relaxamento de superfície	45
Figura 16 - Interface formada por RDSR.....	46
Figura 17 - Suavização da superfície	48
Figura 18 - Deposição balística.....	49
Figura 19 - Interface formada por BD.....	50
Figura 20 - Alteração da altura média da interface	51
Figura 21 - Modelo de Eden.....	52
Figura 22 - Componentes do AFM	54
Figura 23 - Comportamento CMC e CHI com a mudança de pH da solução.....	58
Figura 24 - Equipamento de deposição <i>layer-by-layer</i> e esquema de deposição	60
Figura 25 - Imagens de microscopia de força atômica dos filmes de CMC/CHI depositados em pH 4, 5 e 6 contendo 3, 7 e 15 bicamadas.....	65
Figura 26 - Reprodutibilidade das amostras obtidas em pH 4 com 40 bicamadas.....	65
Figura 27 - Enovelamento <i>versus</i> % ionização.....	66
Figura 28 - Obtenção do perfil diagonal das amostras para cálculo da dimensão fractal	67
Figura 29 - Resultados de dimensão fractal em função do número de bicamadas.....	68

Figura 30 - Perfil de rugosidade dos filmes de CMC/CHI em função do número de bicamadas	70
Figura 31 - Altura média de cada bicamada.....	72
Figura 32 - Fases de crescimento do filme.....	74
Figura 33 - Evolução da rugosidade do filme CMC/CHI proveniente da literatura	76
Figura 34 - Coalescência de ilhas	77
Figura 35 - Rugosidade do filme POMA/PVS avaliada por AFM	77
Figura 36 - Evolução da espessura do filme POMA/PVS	78
Figura A1 - Reação segundo a síntese de Williamson	87
Figura B1 - Dimensões geométricas clássicas.....	88
Figura B2 - Irregularidades de formato	88
Figura C1 - Evolução da espessura para sistemas de diferentes tamanhos (L)	89
Figura C2 - Representação gráfica das transformações matemáticas para relação de escalonamento	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da quitosana.....	22
Tabela 2 - Aplicações biomédicas da quitosana.....	22
Tabela 3 - Expoentes da teoria não-linear	50
Tabela 4 - Resumo dos modelos de crescimento de superfícies por deposição atômica.....	53
Tabela 5 - Ionização dos biopolímeros	58
Tabela 6 - Planejamento experimental	59
Tabela 7 - Adaptação de modelos de crescimento atômico para <i>layer-by-layer</i>	62
Tabela 8 – Valores teóricos dos parâmetros de crescimento para dimensão topológica $d=2$	63
Tabela 9 - Dados experimentais de rugosidade	69
Tabela 10 - Parâmetros de crescimento calculados	71
Tabela 11 - Dados experimentais de altura	72

ABREVIATÓES

AFM – Microscopia de força atômica

BD – Deposição balística

BSA – Albumina bovina

CHI – Quitosana

CMC – Carboximetilcelulose

DS – Grau de substituição

EW – Edwards-Wilkinson

KPZ – Kandar-Parisi-Zhang

LB – Langmuir-Blodgett

LbL – *Layer-by-layer*

PEI – Polietilenoimina

PET – Polietileno tereftalato

POMA – Poli(o-metoxianilina)

PVP - Polivinilpirrolidona

PVS – Ácido polivinilsulfônico

RD – Deposição randômica

RDRS – Deposição randômica com relaxamento de superfície

RMS – Raiz do valor quadrático médio

STM – Microscopia por corrente de tunelamento

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
1.1 Introdução	16
1.2 Objetivos	18
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biomateriais.....	19
2.1.1 Quitosana	20
2.1.2 Carboximetilcelulose.....	23
2.2 Deposição <i>layer-by-layer</i>	25
2.3 Superfícies e Interfaces	29
2.3.1 Rugosidade de superfícies.....	30
2.3.1.1 Fractais.....	30
2.3.1.2 Comportamento da interface	36
2.3.2 Modelos de crescimento de superfície	41
2.3.2.1 Deposição randômica	42
2.3.2.2 Teoria linear.....	44
2.3.2.3 Teoria não-linear	48
2.3.3 Caracterização da rugosidade	53
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 Materiais.....	56
3.2 Método de preparo dos filmes	56
3.2.1 Preparo das soluções de biopolímeros	56
3.2.2 Preparo do substrato.....	57
3.3 Planejamento experimental	57
3.4 Deposição dos filmes	59
3.5 Caracterização	60
3.6 Estudo teórico	61
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5 – CONCLUSÕES	79
6 – SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	80
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

APÊNDICE A.....	87
APÊNDICE B.....	88
APÊNDICE C.....	89
APÊNDICE D.....	91

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Desde a antiguidade são utilizados materiais na medicina para substituição e/ou restauração de partes do corpo humano. Ao utilizar conchas para a realização de implantes dentários e linho ou ouro para realização de suturas, procurava-se materiais não-biológicos aos quais o corpo apresentava ao menos certa tolerância, a fim de, em contato com o organismo, provocar o mínimo possível de rejeição e infecções (Ratner et al., 2012). Conhecidos atualmente como biomateriais, têm o objetivo de interagir com o sistema biológico para restaurar as funções de tecidos e órgãos do corpo, sendo para isso importante o conhecimento de suas propriedades, funções e estruturas (Park, 1984). Apesar de décadas atrás serem majoritariamente utilizados para a realização de implantes, é crescente sua importância na medicina em campos como liberação controlada de medicamentos, engenharia tecidual, terapia celular, métodos de imagem e sistemas de diagnóstico (Willians, 2009).

As respostas biológicas a esses materiais, quando não absorvíveis, são governadas pelas características do bulk e da superfície, onde ocorrem os principais fenômenos da biomedicina. O conhecimento das interações que ocorrem nas interfaces é necessário para a compreensão dos fenômenos macroscópicos e abre caminho para a criação e aprimoramento dos materiais. (Herbers et al., 2013; Picart, 2015)

A capacidade do material em interagir como organismo apropriadamente, isto é, com o mínimo de reação adversa, é chamada de biocompatibilidade. Para tal, a interface deve possuir propriedades adequadas à aplicação desejada, como morfologia e composição. Suas características em contato com o ambiente influenciam o desempenho dos materiais e o risco a eles associado, o que incentiva o aprimoramento dos materiais através do estudo e modificações das propriedades da superfície. Essas propriedades influenciam na imobilização de biomoléculas, inibição/melhoria da adesão e proliferação celular, resistência a proteínas, propriedades antibacterianas e compatibilidade com o fluxo sanguíneo. (Chang et al., 2015; Ratner & Costner, 1997).

Francois et al. (1996) observou em seu estudo com cateteres de poliuretano que através do seu recobrimento com polivinilpirrolidona (PVP) houve diminuição da rugosidade da superfície e aumento do seu caráter hidrofílico. Essas características diminuíram o risco de colonização bacteriana e infecções. Motamediam et al. (2015) adicionou moléculas bioativas e nanopartículas à superfície de *scaffolds* e obteve melhoras na adesão celular.

As características da superfície e, conseqüentemente, da interface são determinadas pela morfologia resultante da sua formação. Essa morfologia, por sua vez, é determinada pelas propriedades dos materiais utilizados, pelas condições experimentais e pelas condições do ambiente. Entretanto, apesar de suas diferenças, é possível encontrar relações estatísticas entre superfícies a partir de sua caracterização matemática (Pentland, 1984).

Para estudar interfaces formadas a partir de processos de deposição, Barabási & Stanley (1995) propõem modelos para o crescimento dos filmes, baseados no conceito de escalonamento de fractais. Esses modelos tentam obter uma conexão entre teoria e resultados experimentais que permita a determinação da força motriz por trás da morfologia da interface.

Entre os modelos de deposição mais simples conhecidos estão o modelo randômico, a teoria linear e a teoria não-linear. Esses são classes universais que propõem padrões de crescimento através da análise probabilística da variação da espessura com o número de camadas depositadas. São obtidos parâmetros gráficos e numéricos que fornecem informações sobre a correlação da superfície e a rugosidade final. (Barabási & Stanley, 1995)

Ciente da importância de interfaces na biomedicina, o presente trabalho estuda a dinâmica da rugosidade no crescimento de filmes finos de carboximetilcelulose e quitosana, dois polímeros naturais com características adequadas para aplicações médicas, como biocompatibilidade e não-toxicidade. Os filmes foram depositados segundo a técnica *layer-by-layer* e analisados por microscopia de força atômica. Foram obtidos parâmetros de altura e rugosidade que permitiram estudar o crescimento e sugerir um modelo matemático que forneça informações sobre a morfologia da superfície e sobre a interação entre as bicamadas durante a sua formação.

1.2 Objetivos

O objetivo geral do trabalho é estudar a dinâmica da rugosidade ao longo do crescimento de filmes de biopolímeros formados por deposição *layer-by-layer*, a fim de obter uma descrição matemática da interação entre as camadas que compõem o filme. Para isso, serão utilizados os biopolímeros carboximetilcelulose (CMC) e quitosana (CHI), ambos com diversas aplicações na biomedicina.

Os objetivos específicos são:

- Deposição de filmes de CMC/CHI pela técnica *layer-by-layer*, variando o número de bicamadas;
- Caracterização física dos filmes quanto à topografia por microscopia de força atômica;
- Determinação da correlação entre as bicamadas depositadas;
- Sugestão de modelo teórico para descrição da dinâmica de rugosidade no crescimento dos filmes através de equações contínuas.

“É preciso ter em mente que, apesar da observação próxima de qualquer objeto geralmente levar à descoberta de uma estrutura altamente irregular, podemos frequentemente aproximar suas propriedades por funções contínuas com bons resultados.”

Perrin, 1916 (tradução livre).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

Biomateriais são substâncias utilizadas para interagir com sistemas vivos (Park, 1984) e atraem pesquisadores de diversas áreas, como química, farmácia, biologia e engenharia, devido a sua grande aplicação na medicina e biotecnologia. Nesses materiais estão incluídos metais, cerâmicas, polímeros sintéticos, polímeros naturais, nanopartículas e nanotubos de carbono (Williams, 2009). Alguns exemplos de equipamentos fabricados com biomateriais são próteses cardiovasculares, cateteres, implantes ósseos e dispositivos para coração artificial (Dumitriu, 1994).

Ao serem implantados no corpo do paciente podem ocorrer reações e inflamações, gerando riscos inesperados (Sarmiento & Neves, 2012). Assim, os pré-requisitos para um biomaterial são biocompatibilidade e desempenho da função desejada, o que explica o constante estudo para melhorias e otimização dos materiais para a biomedicina. Entre eles encontram-se os biopolímeros, polímeros naturais ou sintéticos utilizados em aplicações biomédicas com o intuito de interagir com o meio biológico.

Polímeros naturais são moléculas de origem biológica, com estrutura macromolecular composta pela repetição de unidades monoméricas específicas. O uso de polímeros naturais para aplicações biomédicas não é algo recente (Oréfice et al., 2006), pois, devido à sua origem, possuem grande potencial para serem compatíveis com os tecidos vivos.

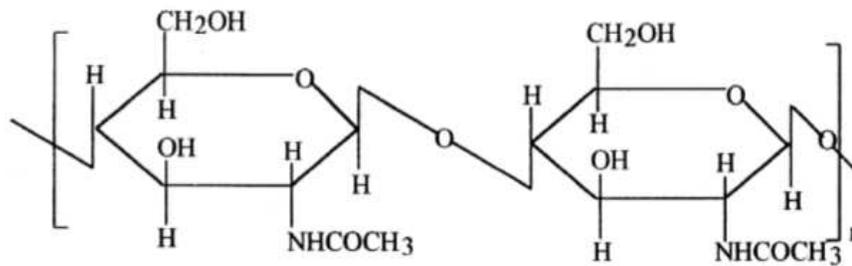
Entre os polímeros naturais encontra-se a quitosana, um polímero passível de formar complexos intermoleculares, como filmes multicamadas, com vários poliânions como ácido hialurônico, alginato e carboximetilcelulose. Esses complexos polieletrólíticos apresentam futuro promissor na liberação controlada de proteínas, peptídeos e outras aplicações biomédicas (Sarmiento & Neves, 2012).

2.1.1 Quitosana

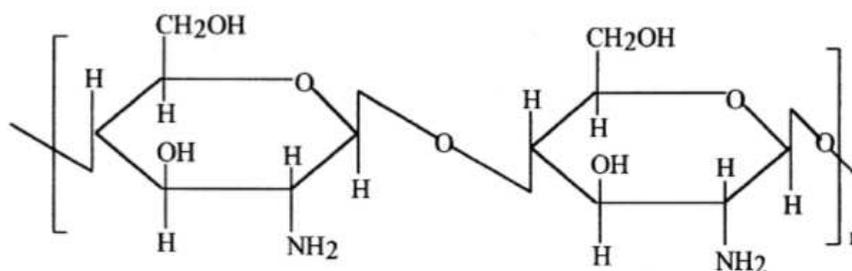
Biomateriais baseados em quitosana possuem diversas aplicações na biomedicina, como regeneração tecidual, dispositivos de liberação controlada de medicamentos, sistemas de imobilização de células em gel e biossensores para diagnóstico clínico (Laranjeira & de Fávère, 2009).

A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina. Essa, por sua vez, é um dos polímeros naturais mais abundante e extraída principalmente do exoesqueleto de crustáceos, como camarões e caranguejos (Rinaudo, 2006). É um polímero com estrutura cristalina altamente organizada, sendo insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, o que limita sua utilização (Laranjeira & de Fávère, 2009). Quando o grau de desacetilação da quitina chega a aproximadamente 50%, torna-se solúvel em meio aquoso ácido e é chamada de quitosana. A solubilização ocorre pela protonação dos grupos $-NH_2$ presentes na molécula, convertendo o polissacarídeo em polieletrólito em meio aquoso (Rinaudo, 2006). A quitosana com grau de desacetilação de 70% é a mais indicada para utilização biomédica pois é mais suscetível à biodegradação pela enzima lisozima (Dumitriu, 1994).

Formada por unidades monoméricas de N-acetilglucosamina e glucosamina, a quitosana é não-tóxica e biocompatível com o tecido vivo. Ainda, pode ser hidrolisada pela lisozima, o que a caracteriza como biodegradável. Seus produtos de degradação são não-tóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (Sarmiento & Neves, 2012). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas da quitina e da quitosana.

Figura 1 - Estrutura química da quitina e quitosana

Quitina



Quitosana

Adaptado de Kumar (2000)

A massa molecular média da quitosana encontra-se entre 100 e 1000 kDa. Assim como os outros polímeros naturais é um polieletrólito fraco, ou seja, sua ionização é muito influenciada pelo pH, possuindo potencial de ionização $pK_a = 6,5$ (Chen & Fan, 2007). É importante lembrar que suas propriedades em solução dependem do grau de desacetilação, da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia e também da massa molecular da quitosana utilizada (Rinaudo, 2006).

A maior aplicação da quitosana em comparação à quitina se deve ao fato desta última ser insolúvel em água e quimicamente inerte. A Tabela 1 sumariza as principais propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana. (Sarmiento & Neves, 2012; Rinaudo, 2006)

Tabela 1 - Propriedades da quitosana

Propriedades físico-químicas	Propriedades biológicas
Poliamina linear	Biocompatível
Grupos amino disponíveis	Biodegradável (Hidrolisada por lisozima)
Grupos hidroxila disponíveis	Não-tóxica
Age como anti-ácido	Atividade antimicrobiana e antitumoral
Agente hidratante	Propriedades de cicatrização

A quitosana possui aplicações em alimentos e nutrição, biotecnologia, agricultura, veterinária, proteção ambiental e, principalmente, na biomedicina. Pode ser utilizada em curativos, *scaffolds* para engenharia de tecido e dispositivos de liberação de medicamentos, uma de suas principais aplicações. (Busilacchi et al., 2013; Goosen, 1997; Laranjeira & de Fávère, 2009; Sarmiento & Neves, 2012; Vasiliu et al., 2005)

Yunxiao Liu et al. (2005) utilizou a técnica *layer-by-layer* para a criação de recobrimentos contendo quitosana em substratos de PET, obtendo superfícies estáveis e com maior biocompatibilidade. Estudando células endoteliais, observou que a possibilidade de adesão celular foi aumentada, assim como a manutenção de suas funções. A interface criada também possibilitou a imobilização de fatores de crescimento.

Na Tabela 2 encontra-se resumidas suas principais aplicações na biomedicina.

Tabela 2 - Aplicações biomédicas da quitosana.

Potenciais aplicações biomédicas
Implantes dentários
Tecido artificial
Regeneração de ossos
Liberação controlada de medicamentos em humanos e animais
Materiais para encapsulamento

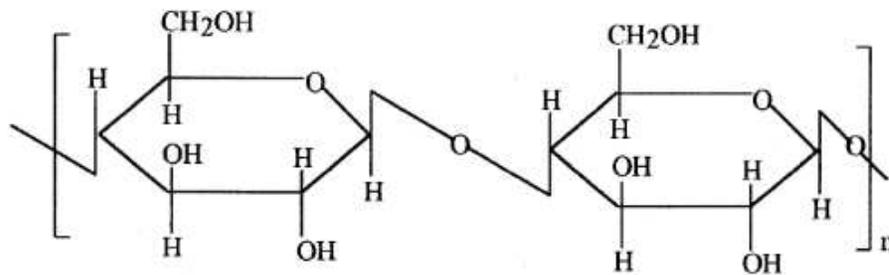
Adaptado de Rinaudo, 2006

2.1.2 Carboximetilcelulose

Celulose é citada como o polímero natural mais abundante no planeta. Esse polímero e seus derivados atraem interesse para a utilização em aplicações biomédicas devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Ogushi et al., 2007).

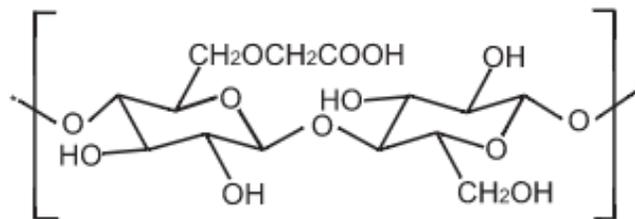
Na Figura 2 encontra-se a estrutura molecular da celulose e de um de seus derivados, a carboximetilcelulose (CMC), na qual foram introduzidos randomicamente grupos carboximetil ao longo da cadeia principal. O processo é realizado a partir da ativação da celulose com hidróxido de sódio e conversão em carboximetilcelulose com ácido cloroacético (Heinze & Koschella, 2005), de acordo com a síntese de Williamson (Apêndice A).

Figura 2 - Celulose e carboximetilcelulose (CMC)



Celulose

Adaptado de Kumar (2000)



CMC

Ogushi et al. (2007)

O número médio de grupos carboximetil por unidade de celulose é chamado de grau de substituição – DS (Ginkel & Gayton, 1996). Para determinar o DS é possível utilizar titulação de retorno, convertendo o sal sódico do polímero em ácido livre,

adicionando uma quantidade conhecida de NaOH e por fim titulando a quantidade restante (Heinze & Koschella, 2005). Assim, utilizando a acidez dos grupos carboxílicos é possível estimar o grau de substituição da CMC.

Um dos maiores objetivos na modificação da celulose é obter derivados solúveis em água. A carboximetilação permite obter um polímero solúvel e que se comporta como polieletrólito. Seu potencial de ionização depende do grau de substituição e da distância dos grupos carboxílicos da cadeia principal (Heinze & Koschella, 2005), encontrando-se geralmente em uma faixa de 3,0 a 4,0 (Arguëlles-Monal & Peniche-Covas, 1988; Heinze & Koschella, 2005). Para a continuidade do estudo será adotado o valor médio de $pK_a = 3,5$.

A CMC possui aplicação em vários campos, inclusive na biomedicina. Hidrogéis de CMC foram estudados por Ogushi et al. (2007) e Singh et al. (2004), obtendo bons resultados com células para aplicações na engenharia de tecido e no estudo de tumores no sistema nervoso central, respectivamente. Outra potencial aplicação na biomedicina é no tratamento pós-cirúrgico. Mais de 68% dos pacientes que passam por operações abdominais sofrem com a adesão dos tecidos aos órgãos. Essas adesões podem causar obstrução intestinal, dores crônicas e até infertilidade. Utilizando uma membrana composta por CMC e ácido hialurônico, Vrijland et al. (2002) comprovou que a severidade das adesões diminuiu, sem efeitos colaterais causados pela barreira.

A formação de complexos polieletrólíticos entre quitosana e CMC tem sua estequiometria dependente do pH, com composição equimolar em $pH = 4,0$ (Arguëlles-Monal et al., 1990). Esse fato motivou o estudo do sistema em três valores de pH diferentes, baseando a escolha em diferenças de características de ionização e enovelamento das moléculas.

O complexo formado por esses biopolímeros foi investigado por Chen & Fan (2007) como possível material para engenharia de tecido aplicada à odontologia. Em seu estudo, comprovaram que o *scaffold* obtido apresentou melhoras na adesão, espalhamento e capacidade celular quando comparado à matriz contendo apenas quitosana.

Esses complexos podem ser obtidos em forma de filmes multicamadas. Qiu et al (2001) estudou a liberação controlada de medicamentos, abordando a encapsulação de ibuprofeno (anti-inflamatório) por deposição *layer-by-layer*, obtendo cápsulas com espessuras programadas. Os resultados mostram que é possível controlar a liberação do medicamento utilizando CMC e quitosana e que a taxa de liberação é influenciada pela espessura da cápsula. Esses exemplos comprovam a importância desses polímeros naturais e seu potencial para aplicações biomédicas.

2.2 Deposição *layer-by-layer*

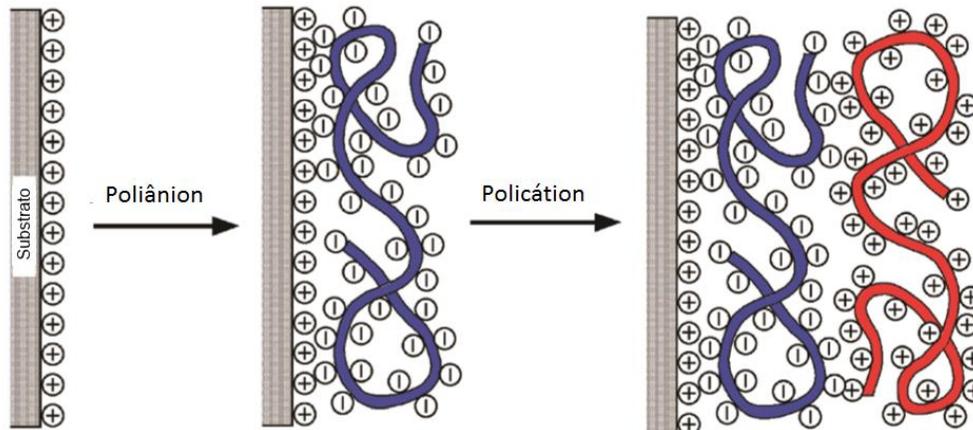
As propriedades do material resultam da interação de seus componentes, assim como de sua organização estrutural. Por essa razão, torna-se interessante a obtenção de materiais hierarquicamente organizados com propriedades desejadas. Ao invés de obter melhores propriedades por tentativa e erro, variando-se as concentrações experimentais, surge a estratégia de controlar a organização do material através de filmes multicamadas.

Por mais de 60 anos, a técnica mais utilizada para fabricação de nanoestruturas de múltiplas camadas foi a técnica de Langmuir-Blodgett (LB), na qual são formadas monocamadas em superfície aquosa e posteriormente transferidas para um suporte sólido. Apesar de ter possibilitado tanto a separação quanto o contato de camadas com precisão na escala de Angstroms, a técnica possui algumas limitações. Isso porque, além de alto custo de instrumentação, há apenas alguns componentes adequados para deposição LB e as moléculas não são firmemente aderidas devido à fraca atração física entre as camadas. Outro ponto é o alto custo do equipamento de deposição e longo tempo de preparação dos filmes (Decher & Schlenoff, 2012; Tang et al., 2006).

A técnica de deposição chamada *layer-by-layer* (LbL) é uma abordagem mais recente para a fabricação de filmes finos e modificação de superfícies. Seu conceito se baseia na interação entre os materiais de interesse através de múltiplas interações intermoleculares (Tang et al., 2006). Essas interações podem ser do tipo atração

eletrostática, interação doador/receptor, ligações de hidrogênio, ciclos de adsorção/secagem ou ainda ligações covalentes (Decher & Schlenoff, 2012). A interação predominante na maioria dos filmes é a atração eletrostática, representada na Figura 3.

Figura 3 - Deposição *layer-by-layer*

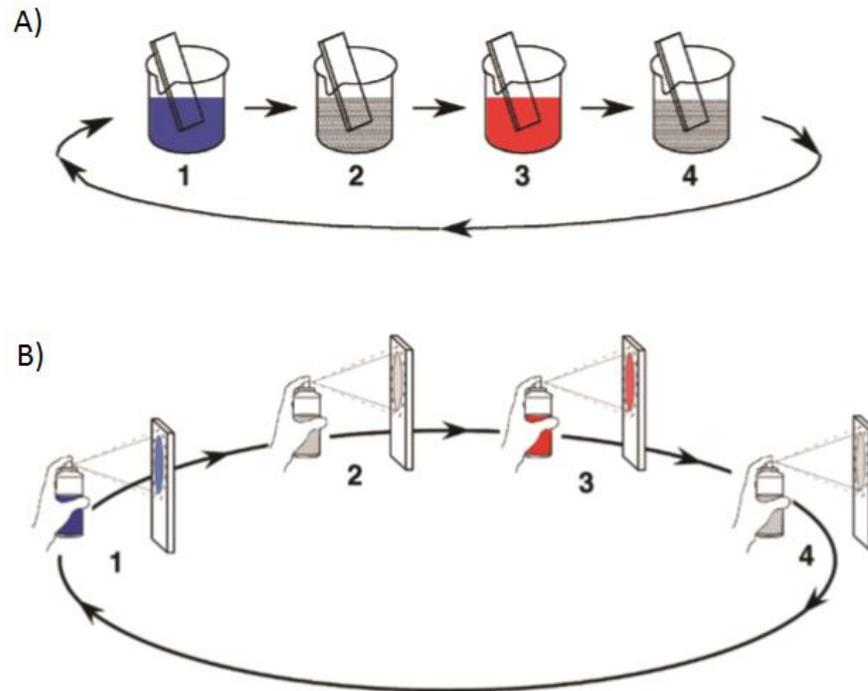


Adaptado de Decher & Schlenoff (2012)

Antes do início da deposição, o substrato tem sua superfície ativada e recoberta com uma camada de eletrólito forte, a fim de conferir homogeneidade e boa aderência do filme ao substrato. É possível formar filme multicamadas por imersão do substrato no líquido contendo o material de interesse ou através de spray, no qual o líquido entra em contato com o substrato no qual formará a camada. A Figura 4 apresenta um esquema do processo de deposição, na qual após cada contato com o material há uma etapa de lavagem para remoção dos polieletrólitos fracamente aderidos.

Ao fim de cada ciclo representado nas Figuras 3 e 4, são formadas bicamadas pela interação dos polieletrólitos de cargas opostas. Essas, tipicamente, possuem espessura menor que 1 nm, permitindo controle da espessura dos filmes finos em escala nanométrica (Tang et al., 2006).

Figura 4 - Métodos de deposição *layer-by-layer*



A) Deposição por imersão. B) Deposição por spray.
 Etapas: 1) Polianion, 2) Lavagem, 3) Policátion, 4) Lavagem

Decher & Schlenoff (2012)

Para a deposição é possível utilizar uma grande variedade de materiais orgânicos ou inorgânicos e os substratos podem possuir diferentes tamanhos e formatos, contanto que sejam acessíveis a solventes. Ainda, é uma técnica ambientalmente correta e de baixo custo.

A estrutura de cada camada, sua espessura e as propriedades do filme dependem de vários parâmetros, como concentração das soluções, força iônica, pH e tempo de adsorção. Quanto à reprodutibilidade das características do filme, mantendo-se constante as condições experimentais e as condições de obtenção das medidas é possível obter propriedades médias com alta reprodutibilidade (Decher & Schlenoff, 2012), permitindo que os dados experimentais possam ser obtidos a partir de amostras diferentes.

A deposição *layer-by-layer* é muito aplicada na biomedicina, sendo uma de suas aplicações a imobilização de biomoléculas no filme e utilização desses filmes em

sensores, liberação controlada de medicamentos, engenharia de tecidos e implantes. Com a fixação de proteínas nos filmes foi possível aumentar sua tolerância ao ambiente e estabilidade. (Tang et al., 2006)

Também foi utilizado *layer-by-layer* para biomimética, aproveitando-se de uma característica importante em comum com os materiais naturais: organização espontânea. Além de filmes multicamadas com excelentes propriedades mecânicas, já foi reportado a obtenção de membranas artificiais fotossintéticas através da técnica. (Tang et al., 2006)

Uma aplicação importante encontra-se no campo de modificações de superfície. A maioria dos materiais não possui todas as propriedades desejáveis, o que leva à necessidade do desenvolvimento de alternativas para melhorar as propriedades dos materiais já existentes (Lee, 1987). A modificação de superfícies é uma técnica utilizada para adequar o material à função pretendida, a qual permite a realização de alterações nas características da camada superficial mantendo as propriedades mecânicas e funcionais intrínsecas do material (Wu et al., 2015). A possibilidade de estruturar o material permite o design de superfícies funcionais através de recobrimentos formados por deposição *layer-by-layer*.

Algumas características são desejadas na criação de recobrimentos para modificação de superfícies. Primeiro, deve-se evitar modificações espessas, pois podem influenciar nas propriedades mecânicas e funcionais do material. Segundo, as camadas depositadas devem ser resistentes a delaminação, estando firmemente ligadas ao substrato. Essa ligação pode ser atingida através de ligação covalente entre a primeira camada de deposição e o substrato, criação de uma camada primária compatibilizante na interface substrato-filme ou incorporando grupos funcionais que facilitam a adesão intermolecular (Ratner & Castner, 1997). Essas superfícies podem possuir aplicação para uso industrial, como as superfícies superhidrofóbicas aplicadas a materiais nos quais se deseja auto-limpeza (Blossey, 2003) ou aplicação biomédica.

O recobrimento por *layer-by-layer* pode ser utilizado para a preparação de biossensores, no controle de adesão celular e na engenharia de tecidos, procurando melhorar a interação da superfície do material com o ambiente. Outro ponto de grande

aplicação é no recobrimento de implantes, fornecendo propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas às superfícies dos materiais (Tang et al., 2006).

Todos os parâmetros dos filmes depositados por *layer-by-layer* influenciam suas propriedades e o desempenho de sua aplicação, como o comportamento biológico das células. As cargas da superfície, rugosidade, características hidrofílicas ou hidrofóbicas, estruturas intrínsecas e força mecânica são exemplos desses parâmetros (Tang et al., 2006).

2.3 Superfícies e interfaces

No desenvolvimento de biomateriais, o foco principal encontra-se na interação do biomaterial com a matéria biológica. É de especial interesse a caracterização interna e externa das superfícies dos biomateriais inertes, pois formam a interface com o ambiente biológico e determinam a performance do material utilizado. As características das superfícies determinam como os materiais irão se comportar *in vivo* e sua eficiência, incluindo estabilidade, interação celular, liberação de medicamentos e toxicidade (Amin et al., 2015).

Construir superfícies “sob medida” fornece uma nova dimensão de controle sobre as funções e desenvolvimento dos materiais. Entretanto, as características da interface podem ser muito diferentes das do bulk. Entender e propor modelos que capturem suas complexas propriedades auxilia numa melhor descrição e compreensão das interações que ali ocorrem (Herbers et al., 2013). Para o estudo das interações envolvendo filmes *layer-by-layer* de biopolímeros é necessário avaliar o processo de formação dos filmes, focando na morfologia da superfície.

2.3.1 Rugosidade de Superfícies

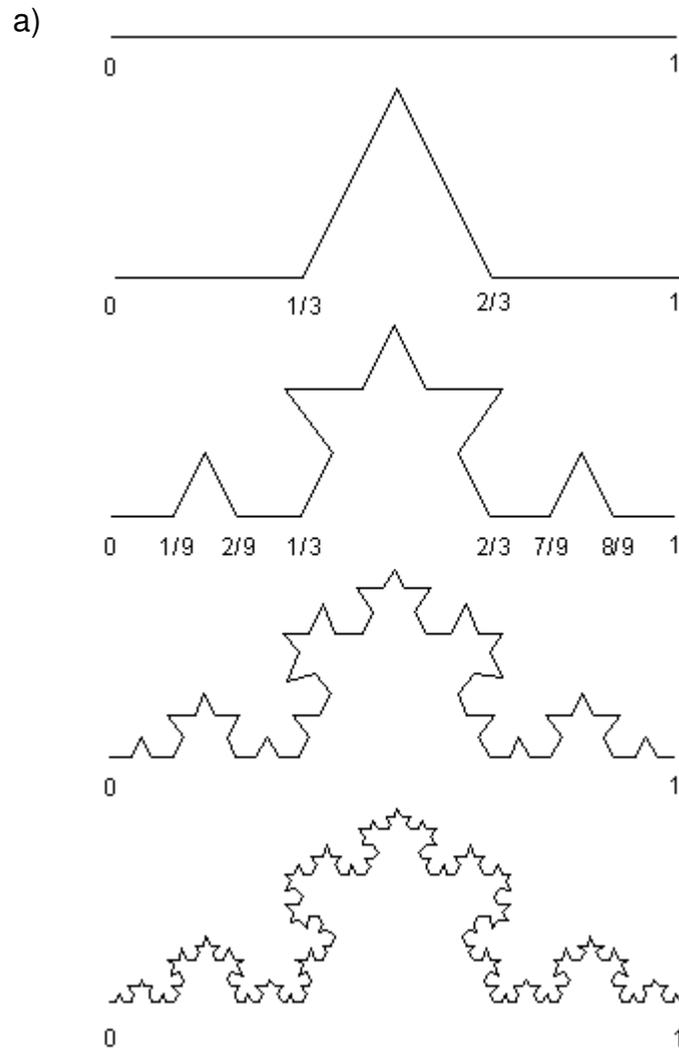
Ao longo dos processos de deposição *layer-by-layer*, a interface sofre modificações em sua rugosidade. Entender a rugosidade de uma interface é uma etapa importante da caracterização do material (Rozlosnik et al., 1997). Entretanto, para descrever matematicamente o processo de evolução da rugosidade deve-se utilizar modelos teóricos que consideram tanto a variação da estrutura, como a cinética de crescimento e também as variações com a mudança de escala (Almqvist, 1996).

Uma opção para quantificação matemática da rugosidade de superfícies, a qual considera as características irregulares do crescimento de interfaces, é através do conceito de fractais. Sua utilização para descrever o crescimento de superfícies formadas por deposição está solidificada e pode ser observada no trabalho de diversos autores, como Almqvist (1996), Barabási & Stanley (1995), Family (1986) e Pentland (1994).

2.3.1.1 Fractais

A definição formal de fractais introduzida por Mandelbrot (1977) apresenta o fractal como uma configuração para a qual a dimensão Hausdorff-Besicovitch excede sua dimensão topológica. Para maior esclarecimento sobre os conceitos de dimensão citados, sugere-se consultar o Apêndice B.

Em termos práticos, fractais podem ser definidos como figuras/conjuntos/cenários geométricos de forma não-euclidiana, ou seja, com contornos irregulares (Pentland, 1994). Utilizando o fractal mais popularmente conhecido – floco de neve – é possível ilustrar brevemente o conceito de forma objetiva (Figura 5). Gerado a partir de um polígono iniciador, foram realizadas modificações não-aleatórias e matematicamente relacionadas entre si, o que confere caráter estatístico ao fractal e permite sua correlação com a forma de origem e com os outros fractais gerados a partir dela.

Figura 5 - Curva de Koch (flocos de neve)

a) Divisão a partir do iniciador. b) A partir de um triângulo equilátero foi obtido um fractal em forma de flocos de neve. Para isso, seu lado foi dividido em 3 partes iguais e criou-se outro triângulo equilátero na parte central de cada um dos lados, como o esquema mostrado em a). O novo triângulo equilátero possui lados com $\frac{1}{3}$ do tamanho do triângulo original. O processo pode ser repetido indefinidamente, obtendo-se formas distintas com correlações matemáticas entre si.

A origem do termo *fractal* remete ao significado “fragmentado” e sua aplicação em descrever matematicamente padrões irregulares abrange desde a descrição de movimentos aleatórios de partículas em um líquido até a determinação do tamanho e formato da costa britânica (Mandelbrot, 1977). Entretanto, para a aplicação desse conceito é necessário analisar algumas propriedades do objeto a ser estudado. As mais importantes serão abordadas a seguir: escalonamento e dimensão fractal.

- **Escalonamento de fractais**

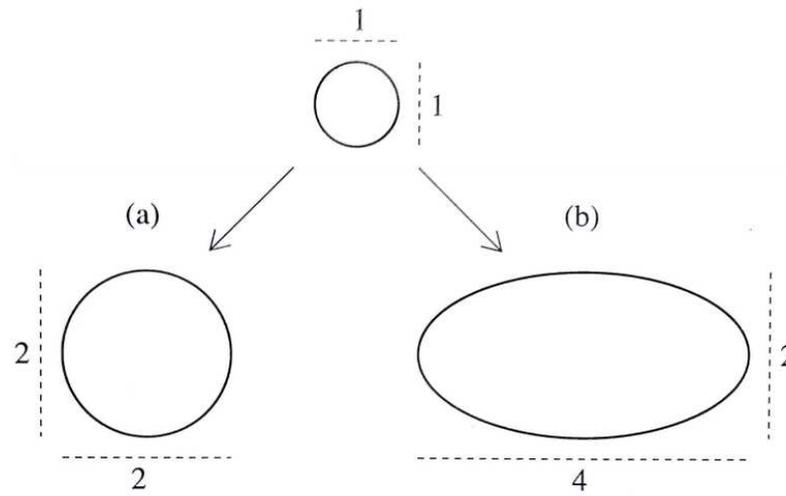
O escalonamento de fractais consiste em transformações em sua escala. Essas transformações permitem que sejam realizadas maiores mudanças na forma fractal sem perder a correlação matemática com a forma de origem, contribuindo para a maleabilidade dos modelos baseados em fractais e sua vasta aplicação. A utilização desse conceito simplifica a caracterização de superfícies pois permite a obtenção de padrões estatísticos a partir da análise de pequenas amostras, utilizando-se prudência para a análise dos resultados.

Após o escalonamento, os fractais podem ser classificados em dois grupos (Mandelbrot, 1985):

- *Self-similar* (autossimilaridade exata): sofrem aumento uniforme de sua dimensão em todas as direções. Possuem identidade de formato entre si.
- *Self-affine* (autossimilaridade estatística): o aumento possui diferentes fatores de escalonamento para cada direção. Possuem identidade estatística, e não de forma. Isso significa que é possível obter a forma anterior ao escalonamento a partir de transformações matemáticas, permitindo relacionar geometrias distintas mesmo não apresentando o mesmo formato.

As superfícies podem ser consideradas como fractais que sofreram transformações *self-affine* (Barabási & Stanley, 1995). A Figura 6 ilustra os conceitos acima expostos para melhor compreensão.

Figura 6 - Escalonamento *self-similar* (a) e *self-affine* (b)



Barabási & Stanley (1995)

- **Dimensão fractal**

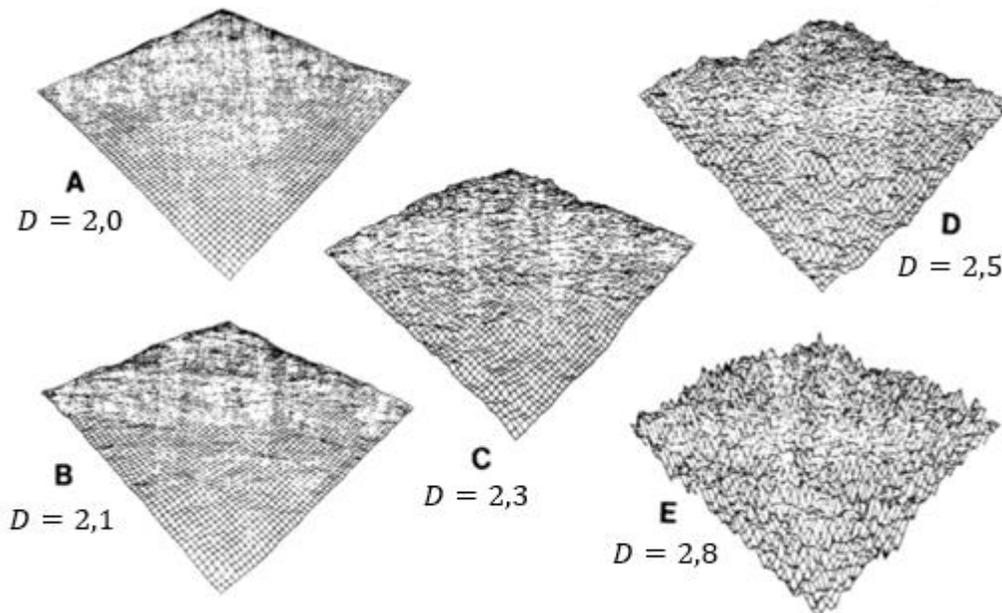
A dimensão Hausdorff-Besicovitch de um fractal é chamada de dimensão fractal (D) e caracteriza a irregularidade de formato da superfície, sendo maior do que a dimensão topológica (D_T) e podendo apresentar valores fracionários. Quanto maior o valor da dimensão fractal, maior a irregularidade presente no objeto analisado, como ilustrado na Figura 7.

Essa caracterização da rugosidade é independente da escala de observação e é calculada com base no iniciador. A Equação 1 apresenta a definição formal de dimensão fractal, onde

$$D = \frac{\log \text{número de segmentos}}{\log \text{escala}}$$

Equação 1

Figura 7 - Ilustração da dimensão fractal de uma superfície



Adaptado de Pentland (1994)

No caso de análise de superfícies, que possuem dimensão topológica $D_T = 2$, a dimensão fractal varia entre $2 \leq D \leq 3$. Quando $D = 2$ tem-se uma superfície lisa, a qual pode ser descrita pela geometria euclidiana (Almqvist, 1996).

Geralmente não é trivial a determinação do iniciador e da razão das proporções necessárias para o cálculo da dimensão fractal a partir da sua definição formal. Por isso, existem diversas maneiras de estimar a dimensão fractal de um objeto de forma mais simplificada. Um dos mais conhecidos é o método *box counting* (Almqvist, 1996; Barabási & Stanley, 1995). Todos os métodos procuram realizar aproximações suficientemente acuradas para descrever as irregularidades da superfície. A escolha do melhor método depende da situação experimental e dos dados disponíveis, podendo ser utilizado mais de um método para confirmação do valor obtido.

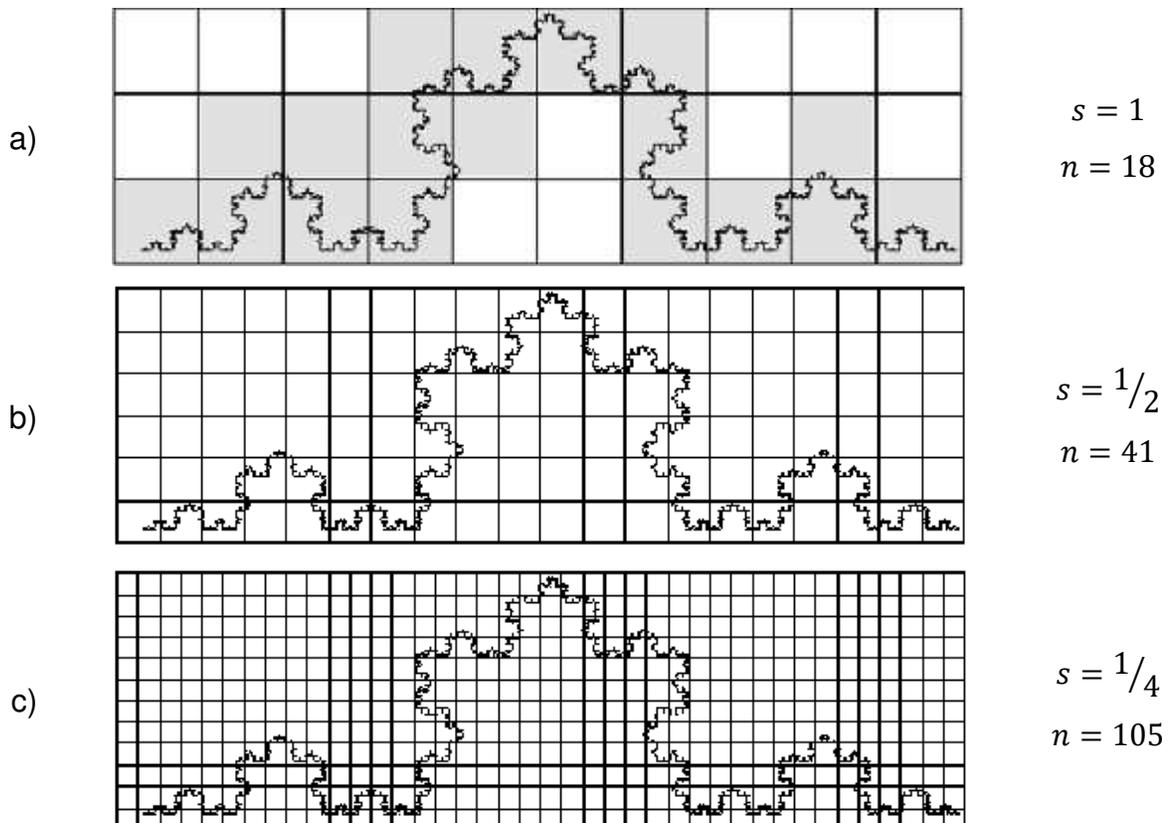
Para exemplificar o *box counting*, Wahl et al. (1994) utiliza a curva de Koch (Figura 5), dividindo a imagem em quadrados iguais e repetindo o processo para diferentes escalas (s). Para cada situação, é realizada a contagem do número de quadrados que contêm a imagem (n) e, de posse desses valores para as diferentes condições de medida,

utiliza-se a Equação 2 para o cálculo da dimensão fractal D , na qual a e b se referem a duas condições de escala diferentes.

$$D = \frac{\log n(a) - \log n(b)}{\log \frac{1}{s(a)} - \log \frac{1}{s(b)}} \quad \text{Equação 2}$$

Os dados para o cálculo são realizados a partir da análise da imagem, como mostrado na Figura 8. A primeira imagem apresenta sombreado os 18 quadrados que contém a imagem, relativos ao valor de (n) , para exemplificar a realização da contagem.

Figura 8 - Dimensão fractal da curva de Koch



Adaptado de Wahl et al. (1994)

$$D_{ab} = \frac{\log 41 - \log 18}{\log \frac{1}{1/2} - \log \frac{1}{1}} = 1,19$$

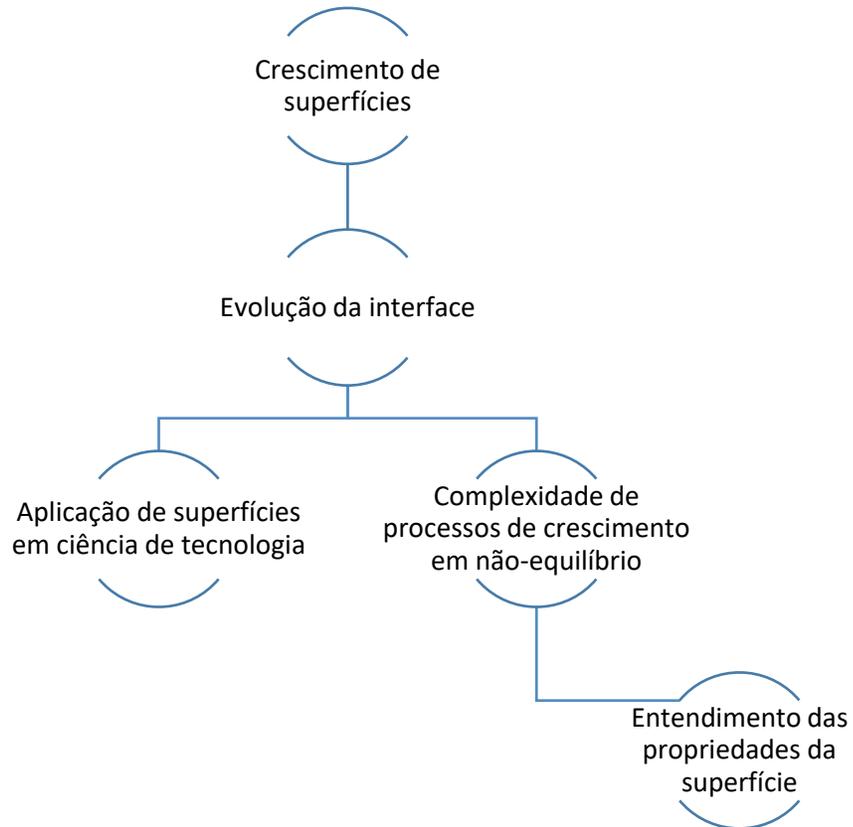
$$D_{ac} = \frac{\log 105 - \log 18}{\log \frac{1}{1/4} - \log \frac{1}{1}} = 1,27$$

Como demonstrado na parte inferior da Figura 8, podem ser realizadas diversas combinações de a e b para a comparação entre as escalas. Entretanto, os valores mais acurados são obtidos utilizando-se escalas menores, as quais captam mais detalhes para realização da análise. O floco de neve possui dimensão fractal de $D = \frac{\log 4}{\log 3} = 1,26$ segundo a definição formal, sendo esse valor foi atingindo já com uma escala de $1/4$.

O cálculo da dimensão fractal é importante pois esse parâmetro descreve a irregularidade da forma da amostra, permitindo a distinção da textura da superfície a partir da análise de sua imagem (Pentland,1984). Ainda, é possível extrapolar as características estatísticas para os detalhes omitidos durante a medição, sendo invariável com o escalonamento e independente da escala de medida (Mandelbrot, 1977), fornecendo uma adaptação do discreto para o contínuo.

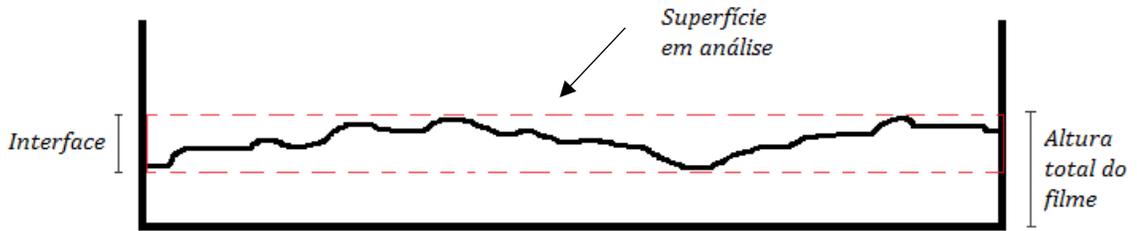
2.3.1.2 Comportamento da interface

Durante o processo de crescimento de filmes formados por deposição, há evolução da interface. Estudar essa evolução traz benefícios para as aplicações de superfícies na ciência e tecnologia e também auxilia a caracterização do complexo processo de crescimento cinético durante a deposição (Family, 1986). A Figura 9 apresenta uma abordagem gráfica dos aspectos do estudo da evolução de interface.

Figura 9 - Importância do estudo de interfaces

Para o estudo do comportamento da interface, foram considerados os princípios de escalonamento de fractais, lembrando que superfícies formadas por deposição podem ter sua interface descrita matematicamente por fractais *self-affine*. Seguindo os conceitos de deposição atômica apresentados por Barabási & Stanley (1995), serão apresentadas primeiramente a definição quantitativa de altura média e espessura da interface, importantes para acompanhar o processo de crescimento. A partir da análise do crescimento de superfícies formadas por deposição atômica será realizada a análise para filmes formados por deposição *layer-by-layer*, posteriormente apresentada com as devidas adaptações na seção de Materiais e Métodos (item 3.6).

Figura 10 - Ilustração da camada em estudo



- Altura média da interface (\bar{h}):

$$\bar{h}(t) = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L h(i, t)$$

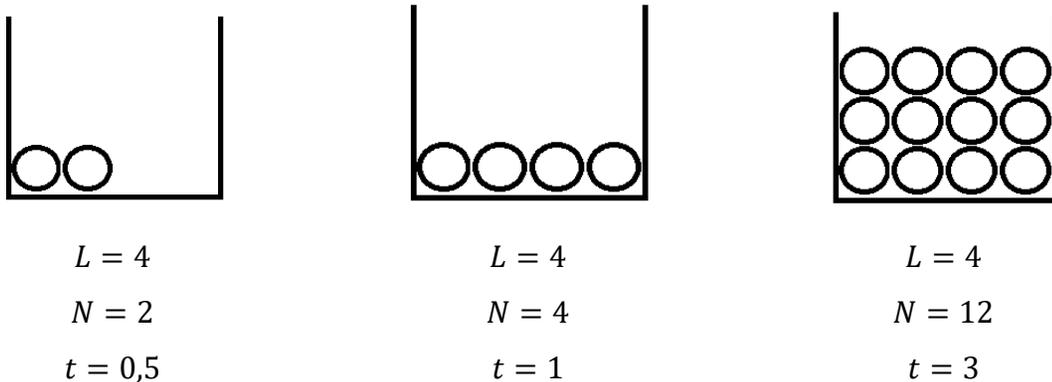
Equação 3

Nessa equação, $h(i, t)$ é a altura da coluna i no tempo t e L o tamanho do sistema (número de colunas). Os autores definem o tempo como sendo o número significativo de colunas depositadas (Figura 11), descrito matematicamente pela Equação 4.

$$t = \frac{N}{L}$$

Equação 4

Figura 11 - Ilustração do número de camadas efetivamente depositadas

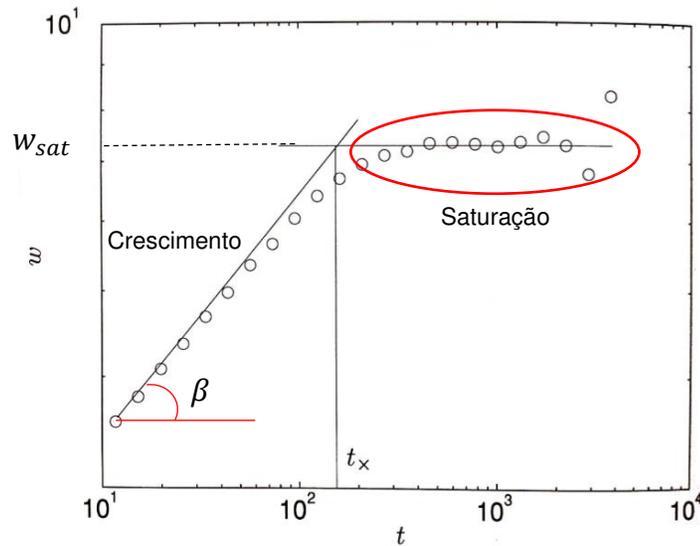


- Espessura da camada superior (w):

$$w(L, t) = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^L [h(i, t) - \bar{h}(t)]^2} \quad \text{Equação 5}$$

Essa espessura é a rugosidade do sistema, sendo a flutuação quadrática média (RMS – Root Mean Square) da altura da superfície. Tipicamente, a evolução da espessura possui 2 comportamentos diferentes, como é possível observar na Figura 12.

Figura 12 - Regimes de espessura durante crescimento da interface



$t < t_x$, aumento proporcional ao tempo.

$t > t_x$, saturação

Adaptado de Barabási & Stanley (1995)

- i) Crescimento, o qual caracteriza a dinâmica de rugosidade em relação ao tempo e pode ser representado pelo **expoente de crescimento**, β

$$w(L, t) \sim t^\beta \quad \text{Equação 6}$$

- ii) Saturação, quando a rugosidade da camada superficial não varia. O sistema pode ser caracterizado pelo **expoente de rugosidade** (α), segundo a Equação 7.

$$w_{sat} \sim L^\alpha$$

Equação 7

Quanto maior o valor de α , mais rugosa a superfície. Se o expoente for negativo, tem-se uma superfície lisa.

A Figura 12 apresenta a evolução da superfície com o tempo, destacando também o tempo de saturação ou *crossover* (t_x) que separa os regimes de crescimento. Esse tempo é dependente do tamanho do sistema, segundo a Equação 8. O expoente z é chamado de **expoente dinâmico**.

$$t_x \sim L^z$$

Equação 8

Os expoentes que caracterizam o crescimento possuem uma relação entre si quando o sistema obedece a relação de escalonamento de Family-Vicsek (Apêndice C). Aproximando-se ao tempo de saturação pela esquerda e pela direita é possível encontrar essa relação, a qual tem utilidade em auxiliar na determinação de parâmetros e do comportamento do sistema. Lembrando que o tempo é relativo ao número efetivo de camadas depositadas.

$$\text{Pela esquerda: } w(t_x) \sim t_x^\beta$$

$$\text{Pela direita: } w(t_x) \sim L^\alpha$$

$$\text{Então: } t_x^\beta \sim L^\alpha, \text{ mas } t_x \sim L^z$$

$$L^{z*\beta} \sim L^\alpha$$

$$z * \beta = \alpha$$

Assim, encontra-se a lei de escalonamento:

$$z = \frac{\alpha}{\beta}$$

Equação 9

A saturação do sistema é explicada pela existência de correlações na superfície. O conceito de correlação se baseia na interação entre as partículas depositadas e suas partículas vizinhas, permitindo reestruturação afim de alcançar um estado mais estável, com menor nível de energia. Essa interação ocorre em pequenas distâncias por vez (comprimentos de correlação), sendo que as forças de curto alcance constroem, aos poucos, correlações de longo alcance (Witten & Sander, 1983). Quando atinge todo o sistema, assume-se que a interface está saturada.

Para determinar os parâmetros de escalonamento é necessário encontrar as curvas de evolução da rugosidade e altura do sistema. A partir delas é possível analisar o processo de desenvolvimento da interface através de diferentes modelos de crescimento, entre eles: modelo simplificado de deposição randômica, teoria linear e teoria não-linear.

2.3.2 Modelos de crescimento de superfícies

O conceito de aplicar um modelo para o crescimento da superfície consiste em descobrir a força motriz por trás da morfologia. Dessa forma é possível compreender a formação do filme, fornecer maior conhecimento sobre a técnica utilizada para deposição e obter dados para realizar simulações computacionais.

As teorias apresentadas a seguir foram desenvolvidas com base nas relações de escalonamento, explicadas pela geometria fractal. Utilizando o conceito de fractais *self-affine*, as características obtidas para pequenas amostras dos filmes podem ser extrapoladas para toda sua superfície com representatividade estatística.

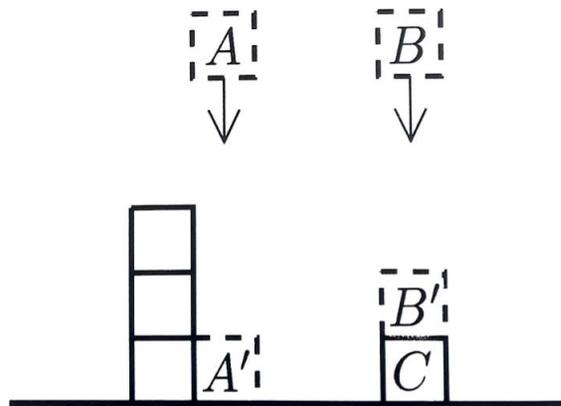
É importante destacar o fato do crescimento ser randômico tanto na deposição atômica quanto na deposição *layer-by-layer*. Isso significa que a natureza não-uniforme

do fluxo de deposição permite que as partículas/moléculas atinjam a superfície em posições e intervalos de tempo aleatórios. Essa característica impacta na determinação da morfologia e traz ruídos à descrição matemática do sistema (Barabási & Stanley, 1995).

2.3.2.1 Deposição randômica (RD, em inglês):

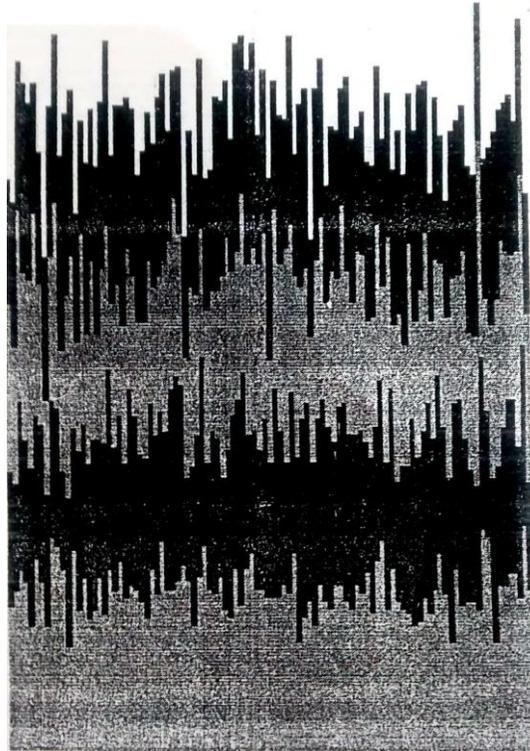
Classe de modelos de crescimento mais simples, no qual a deposição ocorre aleatoriamente e não há correlação da interface. A partícula cai verticalmente até atingir o topo da coluna abaixo dela. A Figura 13 apresenta um esquema do modelo de deposição randômica.

Figura 13 - Deposição randômica



Barabási & Stanley (1995)

O crescimento ocorre verticalmente e independente das colunas vizinhas, resultando em um rápido aumento da rugosidade. Na Figura 14 há um exemplo de uma típica interface formada por deposição randômica, na qual é possível notar que não há relação entre a rugosidade das camadas. Os diferentes tons marcam intervalos de tempo de deposição, nesse caso variando a cada 4000 partículas depositadas.

Figura 14 - Interface formada por RD

Barabási & Stanley (1995)

Como não há relação entre as colunas, as partículas possuem a mesma probabilidade p de se depositar em qualquer uma delas. Essa probabilidade é dada pela Equação 10, a qual representa também a probabilidade de crescimento de cada coluna individualmente durante a deposição de cada partícula. L é o tamanho do sistema.

$$p = \frac{1}{L}$$

Equação 10

Tem-se, para RD, que a altura aumenta linearmente com o tempo e o parâmetro de caracterização do sistema é o expoente de crescimento. Maiores detalhes disponíveis no Apêndice D.

$$\beta = \frac{1}{2}$$

Equação 11

Como não há correlação entre as colunas, não há saturação e o expoente de rugosidade α não é definido. Ainda, a interface obtida não possui identidade estatística (não é *self-affine*).

Para descrever o crescimento de uma maneira abrangente é possível utilizar uma equação contínua, analisando-se a variação da altura com o tempo. Para isso, é incorporado o fluxo médio de partículas que chega em determinada posição x , denotado F , e as flutuações randômicas características da deposição (η).

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = F + \eta(x, t)$$

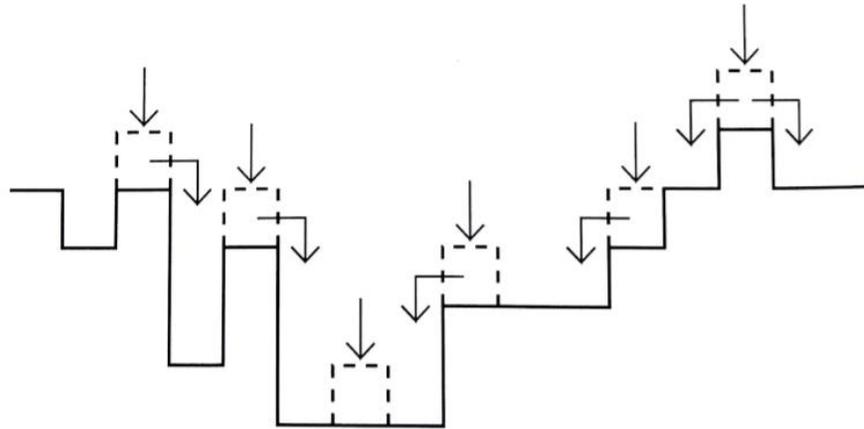
Equação 12

As flutuações podem ser obtidas por atribuição de valores definidos (geralmente $\eta = \pm 1$) ou distribuição gaussiana, sendo esta a mais indicada para os casos de processos de deposição (Pentland, 1984).

2.3.2.2 Teoria Linear

Na teoria linear, é considerado que após a deposição randômica da partícula esta pode difundir ao longo da superfície, por uma distância finita, até encontrar a posição de menor altura. Um dos modelos pertencentes a essa classe é o modelo de deposição randômica com relaxamento de superfície (RDSR, em inglês). A Figura 15 apresenta um esquema do processo de deposição, no qual as setas representam possíveis locais de movimentação da partícula depositada, sendo que as opções preferidas sempre serão as colunas de menor altura.

Figura 15 - Deposição randômica com relaxamento de superfície



Barabási & Stanley (1995)

A interface formada é mais suave do que a interface formada por RD, como é possível observar na Figura 16 (mudança de cor a cada 3500 partículas). Ao permitir que as partículas se locomovam para um estado mais estável, a difusão na superfície provoca correlação entre as colunas vizinhas.

Figura 16 - Interface formada por RDSR



Barabási & Stanley (1995)

Os expoentes de crescimento (β) e rugosidade (α) para essa situação podem ser obtidos por simulação (Barabási & Stanley, 1995; Family, 1986; Vicsek, 1999):

$$\beta = \frac{2 - d}{4}$$

Equação 13

$$\alpha = \frac{2 - d}{2}$$

Equação 14

$$z = 2$$

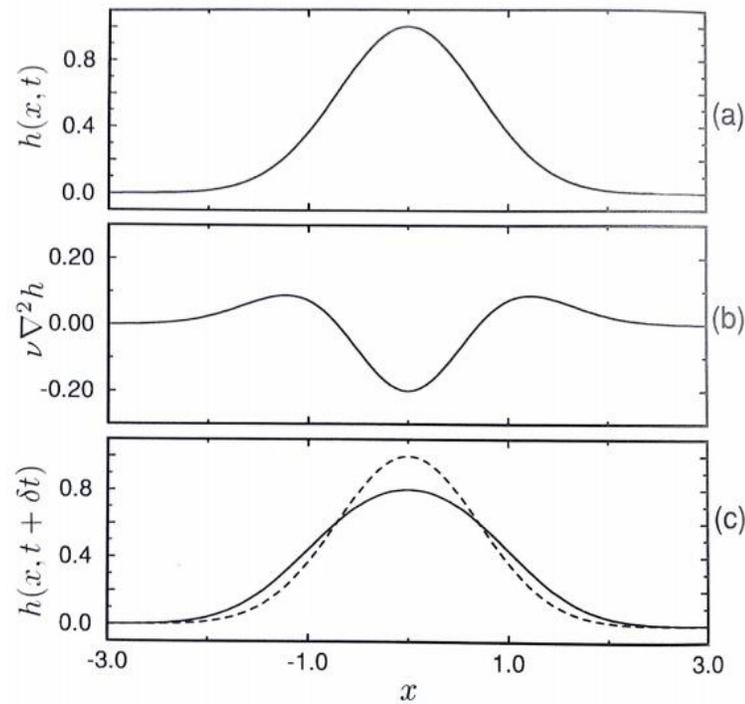
Equação 15

Para descrever os modelos de deposição pertencentes a essa classe através de equação contínua é possível utilizar a *Equação de Edwards-Wilkinson (EW)*, apresentada na Equação 16. Esta possui característica linear devido à consideração da existência de simetria vertical no parâmetro de altura, responsável por manter constante a altura média da superfície da última camada depositada.

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = \nu \nabla^2 h + \eta(x, t) \quad \text{Equação 16}$$

Na qual ν representa a tensão superficial e $\eta(x, t)$ o ruído referente ao caráter estocástico do processo. Diferentemente da Equação 12, que contava apenas com o fluxo médio de partículas, o termo $\nu \nabla^2 h$ considera as interações na superfície, possuindo efeito suavizador e redistribuindo as irregularidades pela interface, mantendo a altura média constante. Na Figura 17 é possível observar uma abordagem geométrica desse efeito. O laplaciano representa os vales presentes na amostra e contrabalanceia os picos de altura, causando uma diminuição do valor máximo com alargamento da curva. Essa combinação resulta em uma superfície com picos menores e mais suaves, apresentando rugosidade mais controlada quando comparada ao modelo anterior.

Figura 17 - Suavização da superfície

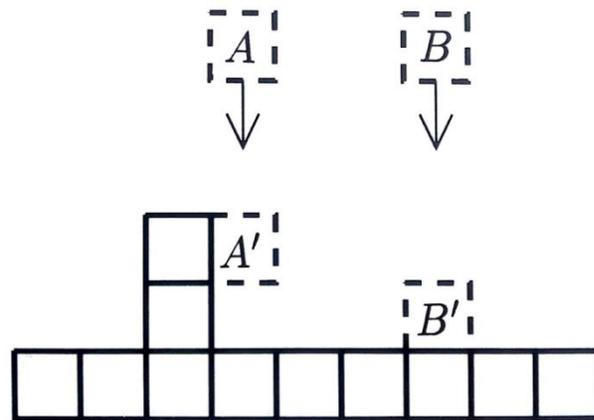


- (a) Perfil de altura
 (b) Efeito do termo $\nu \nabla^2 h$
 (c) Redistribuição da altura, mantendo a altura média

Barabási & Stanley (1995)

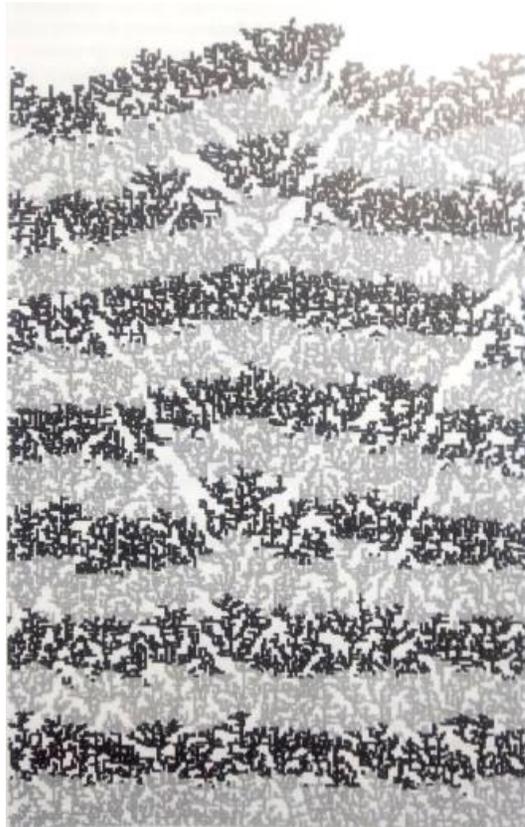
2.3.2.3 Teoria Não-linear

Essa classe de modelos considera que não há simetria vertical da altura e que a interface apresenta velocidade de crescimento diferente de zero. Entre esses modelos é possível citar a deposição balística (BD, em inglês): modelo de agregados coloidais no qual assume-se que a partícula pode aderir ao ponto mais alto, perpendicularmente à sua trajetória, como representado na Figura 18.

Figura 18 - Deposição balística

Barabási & Stanley (1995)

Nesse caso há possibilidade de existirem espaços vazios dentro do filme, gerando irregularidades no bulk. A interface formada é complexa e possui uma geometria particular. Na Figura 19 encontra-se um exemplo do agregado formado durante a deposição balística, com mudança de tonalidade após 2500 partículas depositadas.

Figura 19 - Interface formada por BD

Barabási & Stanley (1995)

Os valores dos expoentes de escalonamento são apresentados na Tabela 3 (Barabási & Stanley, 1995):

Tabela 3 - Expoentes da teoria não-linear

	β	α	z
$d = 1$	$\beta = \frac{1}{3}$	$\alpha = \frac{1}{2}$	$z = \frac{3}{2}$
$d = 2$	$0,10 < \beta < 0,25$	$0,2 < \alpha < 0,4$	$z = 1,5$
$d = 3$	$0,1 < \beta < 0,2$	$0,08 < \alpha < 0,33$	$z = 1,5$

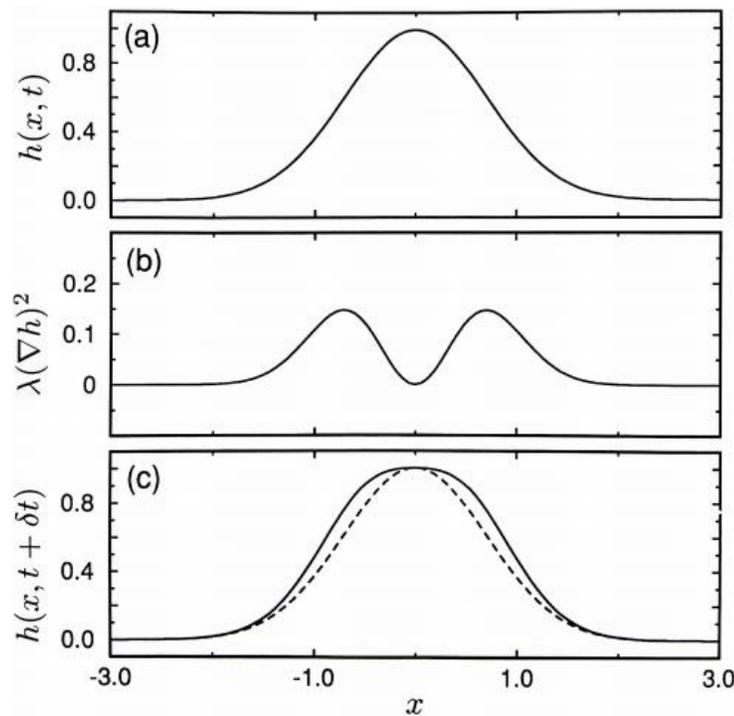
Os resultados para $d = 1$ foram obtidos por solução analítica da equação KPZ enquanto os valores para $d > 1$ são soluções numéricas.

Para descrever o crescimento utilizando equação contínua deve-se incluir o crescimento lateral, normal à superfície. Para isso, é necessário incluir um termo não-linear na equação EW (Equação 16), resultando na *Equação de Kardar-Parisi-Zhang (KPZ)*, apresentada na Equação 17.

$$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = v\nabla^2 h + \frac{\lambda}{2}(\nabla h)^2 + \eta(x, t) \quad \text{Equação 17}$$

Com λ o coeficiente de não linearidade, relativo à adição ($\lambda > 0$) ou retirada ($\lambda < 0$) de material. A adaptação do valor da altura é realizada alterando-se a quantidade de material ao invés de apenas realizar a redistribuição, variando o valor a altura média da interface. Esse efeito para o caso da deposição pode ser observado geometricamente na Figura 20.

Figura 20 - Alteração da altura média da interface

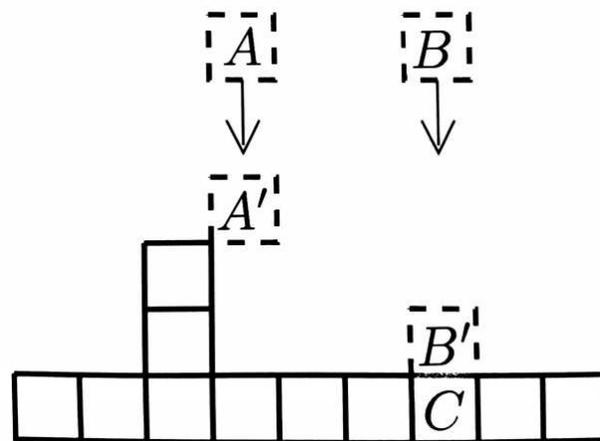


- (a) Perfil de altura
 (b) Efeito do termo $\lambda(\nabla h)^2$, alterando a quantidade de matéria
 (c) Alteração da altura média

Barabási & Stanley (1995)

Diversos modelos seguem a teoria não-linear. Os dados apresentados se referem ao modelo de deposição balística. Entretanto, existem outros modelos expressivos nessa classe, como o Modelo de Eden: modelo de crescimento clássico utilizado para descrever a formação de colônias de células, principalmente cultura bacterianas. A deposição ocorre de acordo com o esquema apresentado na Figura 21, seguindo as mesmas proposições da deposição balística para descrição do crescimento e variação da altura média da interface (Barabási & Stanley, 1995).

Figura 21 - Modelo de Eden



Barabási & Stanley (1995)

Na Tabela 4 encontra-se um resumo geral das classes de modelos abordadas e as principais características de interesse no presente trabalho, com dados retirados de Barabási & Stanley (1995).

Tabela 4 - Resumo dos modelos de crescimento de superfícies por deposição atômica

	Classes de modelos		
	Randômico	Linear	Não-linear
Equação contínua	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = F + \eta(x,t)$	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = v\nabla^2 h + \eta(x,t)$	$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = v\nabla^2 h + \frac{\lambda}{2}(\nabla h)^2 + \eta(x,t)$
Característica de interesse	- Não há interação na superfície	- Interação na superfície - Mantém altura média constante	- Interação na superfície - Variação na altura média
Expoentes	$\alpha = \infty$ $\beta = 1/2$	$\alpha = \frac{2-d}{2}$ $\beta = \frac{2-d}{4}$	$0,2 < \alpha < 0,4$ $0,10 < \beta < 0,25$

Os conceitos apresentados foram deduzidos e aplicados por Barabási & Stanley (1995) para deposição atômica. Para estudar o crescimento de filmes formados por deposição *layer-by-layer* será necessária uma adaptação de parâmetros, convertendo a abordagem discreta (partículas) em contínua (fluxo de moléculas).

2.3.3 Caracterização da rugosidade

Devido à pequena dimensão da espessura dos filmes, para monitorar a deposição e garantir que o processo ocorreu e está livre de contaminações indesejadas, são utilizadas técnicas analíticas para sua caracterização. Entre as mais comuns encontram-se a medida do ângulo de contato e microscopia de escaneamento de superfícies, como a microscopia de força atômica (Jandt, 2001). Para analisar as superfícies quantitativamente é necessária uma análise acurada das quantidades adsorvidas do recobrimento de uma a várias camadas (Argile & Rhead, 1989).

Para caracterização da altura e rugosidade da amostra será utilizado o microscópio de força atômica (AFM). Essa é uma técnica que utiliza sondas locais, pequenos objetos com pontas afiadas que interagem com a superfície do material de interesse. O primeiro instrumento desse estilo foi o microscópio por corrente de

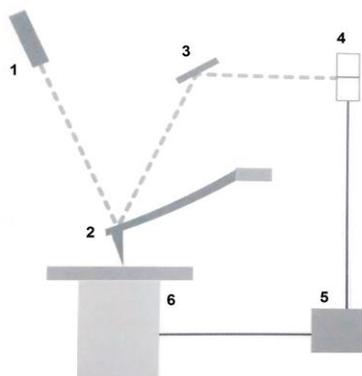
tunelamento (STM). Pela primeira vez, foi possível visualizar a estrutura cristalina da superfície de um metal e manipular átomos isolados. Os inventores dessa técnica, Binnig e Rohrer, receberam o prêmio Nobel de Física em 1986. (Jena & Hörber, 2002)

Nesse mesmo ano, Binnig, Quate e Gerber desenvolveram o AFM, aproveitando-se das interações de van der Waals entre a superfície do material e a sonda utilizada para medição. Isso permitiu estudar inclusive materiais isolantes, diferenciando-o da microscopia de tunelamento, que necessita de transporte de elétrons para a realização da análise.

Com a microscopia de força atômica foi possível obter uma nova perspectiva das interações moleculares em termo de forças de interação e sua dependência com a distância. Essa tecnologia permite obter medidas da topologia da superfície da amostra, fornecendo medidas quantitativas de altura da superfície. Além disso, pode ser utilizada para obter outras propriedades do material na superfície ou próxima dela, como dureza, viscosidade e força de adesão. (Braga & Ricci, 2004)

Na Figura 22 encontra-se um esquema dos artefatos que compõem o AFM.

Figura 22 - Componentes do AFM



1- Laser, 2- Cantilever, 3- Espelho, 4- Fotodetector, 5- Equipamentos eletrônicos de controle e 6- Suporte com amostra

Adaptado de Braga & Ricci (2004)

O princípio básico de funcionamento do AFM é a emissão de um feixe de laser que, ao ser refletido pelo cantilever, é detectado pelo fotodetector. Conforme a altura e

rugosidade da amostra variam, o cantilever sofre uma deflexão que causa mudança na posição do laser no detector. Essa pequena variação fornece a topografia da amostra.

No cantilever encontra-se uma das partes mais importantes do microscópio, a ponta. Geralmente feita de silício ou nitreto de silício, é a parte que interage com a amostra. Outra característica importante é a constante de elasticidade do cantilever e sua ressonância, as quais coordenam a interação da ponta com o material.

Podem ser utilizados três modos de operação: contato, não-contato e contato intermitente, sendo este último conhecido como *tapping mode*. No modo contato, a ponta do cantilever toca na amostra e corre por ela, enquanto o cantilever sofre deflexão para se ajustar às mudanças de topografia. As forças predominantes nesse modo são as forças de repulsão, devido a aproximação do cantilever à superfície da amostra. No modo não-contato há apenas a aproximação da ponta, sendo assim, as interações devido a forças de atração são responsáveis pela modelagem da superfície. No *tapping mode* há contínua aproximação da superfície, onde ocorre o contato pontual e logo após o contato é interrompido, necessitando de uma vibração constante do cantilever. (Braga & Ricci, 2004)

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para a preparação dos filmes foram utilizados quitosana (**CHI**, baixo peso molecular, grau de desacetilação entre 75-85%), carboximetilcelulose (**CMC**, grau de substituição 0,7, MM= $9,0 \times 10^5$ g/mol) e poli(etileno imina) (**PEI**, MM= $7,5 \times 10^5$ g/mol), todos da empresa Sigma. O substrato utilizado foi cristal (*wafers*) de silício.

Os reagentes de grau analítico foram utilizados sem prévias purificações. Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) são da marca Synth (Brasil). Todas as soluções são preparadas com água Milli-Q® 18 MΩ.

3.2 Método de preparo dos filmes

3.2.1 Preparo das soluções de biopolímeros

Primeiramente é estipulado o volume a ser preparado, para então realizar o cálculo da massa de biopolímero necessária de modo que a concentração final seja 1 g/L – valor padrão utilizado nos procedimentos do laboratório para filmes *layer-by-layer* de CMC/CHI. O cálculo da massa encontra-se abaixo (Equação 18).

$$Massa_{polímero} (g) = Concentração \left(\frac{g}{L} \right) * Volume_{solução} (L) \quad \text{Equação 18}$$

Para completar o volume é utilizado água. Entretanto, quitosana não é solúvel em água, sendo necessário acidificar a solução com ácido acético (HAc) antes de completar todo o volume. Para determinar a quantidade de ácido a ser adicionada, de modo que sua concentração seja 0,1 mol/L, utiliza-se a Equação 19. A massa específica do ácido acético é 1,05 g/mL (Green & Perry, 2008).

$$Volume_{HAC} (mL) = \frac{Concentração \left(\frac{mol}{L}\right) * Volume_{solução} (L) * MM_{HAC} \left(\frac{g}{mol}\right)}{Densidade_{HAC} \left(\frac{g}{mL}\right)} \quad \text{Equação 19}$$

Todas as soluções são preparadas em béqueres e deixadas sob agitação por, no mínimo, 12 horas.

3.2.2 Preparo do substrato

Os substratos de silício são cortados em tamanho mínimo de 1,0 cm x 1,0 cm. Esse valor fornece substratos de tamanho adequado para permitir fácil manuseio e imersão nas soluções, de acordo com o equipamento utilizado para deposição dos filmes.

O silício é lavado com acetona, álcool e água em banho ultrassônico por 16 minutos para cada lavagem. A próxima etapa consiste em submeter o silício ao plasma de oxigênio para ativar a superfície através da criação de radicais, resultando em uma superfície altamente hidrofílica.

Para favorecer a adesão dos biopolímeros através do aumento da densidade de cargas, o silício será recoberto por uma camada de eletrólito forte (PEI), chamada de pré-camada. Essa pré-camada também cria uma superfície mais homogênea para a deposição. Para tal, é utilizado o mesmo equipamento para deposição *layer-by-layer* dos filmes, imergindo o substrato por 15 minutos na solução de PEI, dissolvido em solução salina de NaCl 0,5 mol/L e realizando 3 lavagens com água posteriormente, de 2:00, 1:00 e 1:00 minuto respectivamente. O pH das soluções para a realização da pré-camada é 4,0.

3.3 Planejamento experimental

O pH base para o estudo é o $pH = 4,0$ pois nele há interação CMC/CHI de forma equimolar na formação do filme multicada (Arguëlles-Monal et al., 1990). Entretanto, sabendo da influência do pH na ionização dos polímeros e, assim, nas interações eletrostáticas responsáveis pela formação do filme, foram também analisados outros valores de pH. Os valores foram escolhidos de forma que as condições permitissem

avaliar a influência do pH no crescimento do filme considerando a influência da carga e do envelhecimento das moléculas na morfologia final.

Ao escolher os valores de pH com base no potencial de ionização (pKa) dos biopolímeros, foi possível estudar diferentes cenários de interação entre as moléculas. Os casos estão descritos na Tabela 5 e o comportamento do par de biopolímeros com relação ao pH da solução encontra-se na Figura 23. Os cálculos foram baseados na Equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 20 – Pratt & Cornely, 2004).

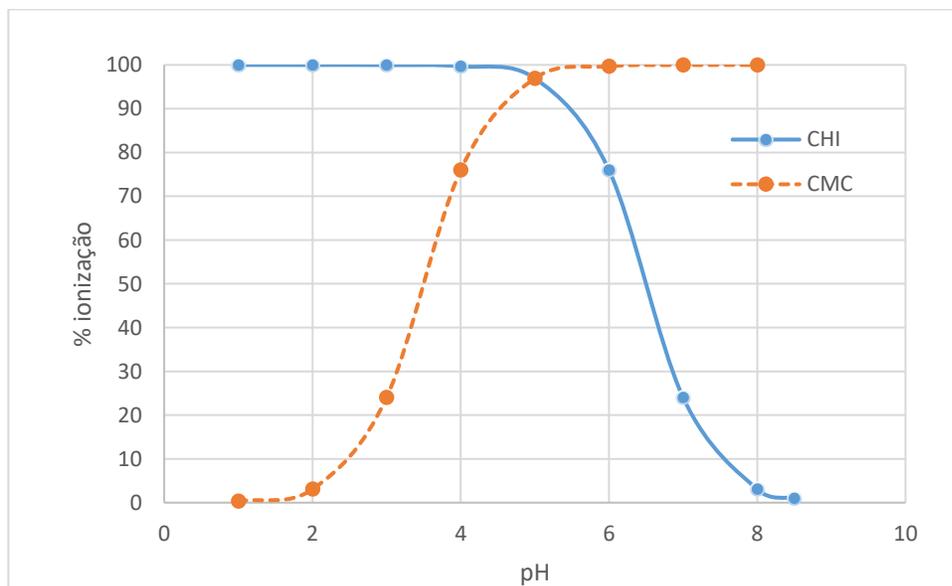
$$pH = pK_a + \log \frac{[base]}{[ácido]}$$

Equação 20

Tabela 5 - Ionização dos biopolímeros

pH	Ionização (%)	
	Quitosana	CMC
4	99,68	75,97
5	96,93	96,93
6	75,97	99,68

Figura 23 - Comportamento CMC e CHI com a mudança de pH da solução



O planejamento experimental contendo as características das amostras estudadas encontra-se na Tabela 6, na qual é possível notar que foram realizadas mais amostras para o pH de principal interesse ($pH = 4$, composição equimolar) e amostras pontuais para os demais valores de pH.

Tabela 6 - Planejamento experimental

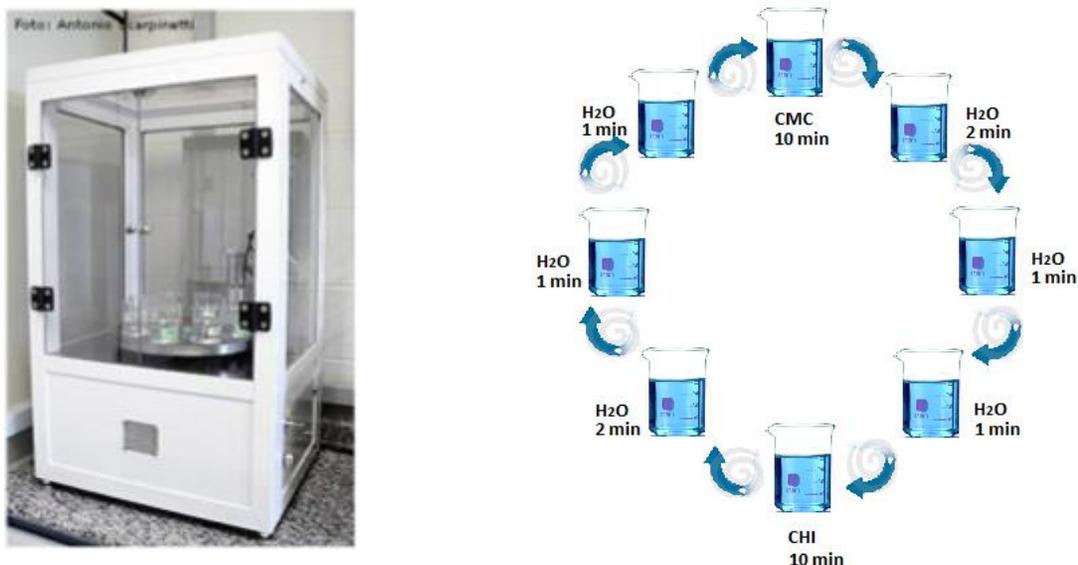
Número de Bicamadas	Amostras		
	pH = 4,0	pH = 5,0	pH = 6,0
1	(CMC ₄ /CHI ₄) ₁	(CMC ₅ /CHI ₅) ₁	(CMC ₆ /CHI ₆) ₁
3	(CMC ₄ /CHI ₄) ₃	(CMC ₅ /CHI ₅) ₃	(CMC ₆ /CHI ₆) ₃
5	(CMC ₄ /CHI ₄) ₅	(CMC ₅ /CHI ₅) ₅	(CMC ₆ /CHI ₆) ₅
7	(CMC ₄ /CHI ₄) ₇	(CMC ₅ /CHI ₅) ₇	(CMC ₆ /CHI ₆) ₇
10	(CMC ₄ /CHI ₄) ₁₀	(CMC ₅ /CHI ₅) ₁₀	(CMC ₆ /CHI ₆) ₁₀
15	(CMC ₄ /CHI ₄) ₁₅	(CMC ₅ /CHI ₅) ₁₅	(CMC ₆ /CHI ₆) ₁₅
20	(CMC ₄ /CHI ₄) ₂₀	(CMC ₅ /CHI ₅) ₂₀	(CMC ₆ /CHI ₆) ₂₀
25	(CMC ₄ /CHI ₄) ₂₅	-	-
30	(CMC ₄ /CHI ₄) ₃₀	(CMC ₅ /CHI ₅) ₃₀	(CMC ₆ /CHI ₆) ₃₀
40	(CMC ₄ /CHI ₄) ₄₀	-	(CMC ₆ /CHI ₆) ₄₀

3.4 Deposição dos filmes

O primeiro passo para a deposição dos filmes é a adequação do pH das soluções, utilizando NaOH ou HCl e um pHmetro. Utilizando o equipamento *LbL Nanostructure Pro* (Figura 24), o substrato é imerso nas soluções de biopolímeros e posteriormente em 3 soluções de lavagem. O equipamento permite que seja determinado o tempo de imersão e o número de bicamadas desejado, sendo que cada ciclo completo resulta em 1 bicamada.

A solução de lavagem é composta de água, com pH ajustado para o pH da solução polimérica. Os dados do ciclo de deposição encontram-se na Figura 24.

Figura 24 - Equipamento de deposição *layer-by-layer* e esquema de deposição



O ciclo se inicia no poliânion (CMC)

Para cada condição foram feitos 3 filmes, para posterior escolha da opção mais adequada sob microscopia (menos riscos e contaminações). Os filmes são deixados para secagem ao ar em condições ambientes do laboratório na posição vertical e posteriormente armazenados em porta amostra também na vertical.

3.5 Caracterização

A caracterização da topografia dos filmes foi realizada com o microscópio de força atômica (AFM). Essa técnica permite a obtenção de imagens com alta resolução, fornecendo perfis tridimensionais. O equipamento utilizado foi o Nanosurf Easyscan 2 AFM, Nanosurf (Suíça), operando em modo não-contato e com as superfícies expostas ao ar.

Após escolhido a melhor amostra entre os três filmes para cada condição, as medidas foram realizadas em triplicata. Para tal, foram escolhidas três regiões próximas à região central do substrato, o que diminui o efeito da gravidade sobre o resultado final. Obteve-se imagens com área de 5,0 μm x 5,0 μm , seguindo estudo realizado por Lobo et al. (2003), 256 pixels e velocidade de 0,7 s por linha.

As amostras caracterizadas por AFM são posteriormente analisadas com o *software* Gwyddion 2.41 para tratamento visual e estatístico das imagens obtidas. Os dados utilizados são obtidos a partir do mesmo *software*.

3.6 Estudo teórico

- Dimensão fractal:

O método adotado como base para o cálculo da dimensão fractal foi o *box counting*, que, como anteriormente abordado, supõe a divisão da imagem da superfície em caixas ou quadrados (dependendo da dimensão de análise). Para a realização dos cálculos utilizou-se o *software Fractalyse*, desenvolvido pelo grupo de pesquisa Théma da Universidade de Franche-Comté & Burgundy, na França.

- Modelo de crescimento:

O modelo de crescimento utiliza os valores de rugosidade RMS para determinação dos parâmetros α e β derivados do modelo de escalonamento. Em cada filme foram realizadas medidas em triplicata, foram obtidos valores médios e um desvio padrão, segundo as Equações 21 e 22, nas quais y pode ser substituído pela altura (h) ou rugosidade RMS (w).

$$\text{Valor médio} = \bar{y} = \frac{y_1 + y_2 + y_3}{3} \quad \text{Equação 21}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (y_i - \bar{y})^2}{2}} \quad \text{Equação 22}$$

A partir dos dados médios foi realizado um gráfico log-log da espessura vs. tempo, como apresentado na Figura 12, com adaptações de parâmetros. As características da curva resultante indicaram as propriedades do crescimento da superfície.

Para relacionar a deposição atômica com a deposição *layer-by-layer* de biopolímeros foi necessário considerar que não é trivial determinar o diâmetro da partícula

depositada, pois a interação na camada é relativa a dois polímeros distintos, com interações distintas em cada localização do filme. Devido a esse fato, considerou-se as propriedades médias da camada superficial ao invés das propriedades médias locais, as quais dependem de x .

Outra adequação realizada para a análise foi considerar as modificações relativas ao tempo como relativas ao número de bicamadas. Essa proposição deriva do fato da determinação do tempo como o número efetivo de camadas depositadas no modelo atômico (Figura 11) e a interação entre os biopolímeros em uma mesma bicamada. A Tabela 7 sumariza as propostas apresentadas.

Tabela 7 - Adaptação de modelos de crescimento atômico para *layer-by-layer*

Definição	Deposição atômica	<i>Layer-by-layer</i>
Tempo	$t = \frac{N}{L}$	$t = \text{bicamadas}$
Número de colunas	$L = \frac{\text{tamanho amostra}}{\text{diâmetro partícula}}$	$L = \text{pixels da imagem de AFM}$
Altura	$h = h(x, t)$	$h = \bar{h}$
Modelo	$\frac{\partial h(x, t)}{\partial t} = v\nabla^2 h + \frac{\lambda}{2}(\nabla h)^2 + \eta(x, t)$	$\frac{\partial \bar{h}}{\partial bic} = v\nabla^2 \bar{h} + \frac{\lambda}{2}(\nabla \bar{h})^2 + \bar{\eta}$

Pela Equação 6 é possível observar que, ao aplicar o logaritmo a ambos os lados, o valor do coeficiente angular da equação é o expoente de crescimento. Portanto, a partir da inclinação deste gráfico foi obtido o parâmetro β . A determinação do parâmetro α foi realizada a partir do valor da espessura de saturação.

$$w(Bic) \sim t^\beta \rightarrow \beta \sim \frac{\log w}{\log t} \quad \text{Equação 23}$$

$$w_{sat} \sim L^\alpha \rightarrow \alpha \sim \frac{\log w_{sat}}{\log L} \quad \text{Equação 24}$$

Os valores base para análise dos resultados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores teóricos dos parâmetros de crescimento para dimensão topológica $D_T = 2$

	β	α
Randômica	$\beta = 0,5$	–
Teoria linear	$\beta = 0$	$\alpha = 0$
Teoria não-linear	$0,10 < \beta < 0,25$	$0,2 < \alpha < 0,4$

Esses parâmetros indicam o grau de correlação da superfície e auxiliam a definição do modelo a ser sugerido para descrever a dinâmica de crescimento da interface do filme CMC/CHI, apresentando respostas sobre a interação entre as camadas dos biopolímeros.

Por fim, foi determinado a abrangência do modelo encontrado através de sua validação com dados provenientes da literatura, relativos a filmes de diferentes polímeros depositados por *layer-by-layer*.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a deposição e secagem dos filmes, procedeu-se com a caracterização física das amostras. Todo o processo foi realizado de forma a minimizar os erros instrumentais e experimentais, sendo que uma mesma pessoa realizou todas as análises, no mesmo microscópio, assim como apenas uma pessoa foi responsável pela deposição de todos os filmes. A caracterização da topologia dos filmes utilizando microscópio de força atômica é baseada nas características da técnica, já abordadas anteriormente, e possui embasamento teórico: segundo Rozlosnik et al. (1997), AFM é uma ferramenta ideal para o estudo da rugosidade de superfícies em função do número de camadas.

A Figura 25 apresenta algumas das microscopias obtidas, utilizadas para acompanhar a evolução da deposição e também para analisar as diferenças com a variação de pH das soluções. É possível observar que ocorre aglomeração das moléculas depositadas a partir das ilhas formadas inicialmente. Nos filmes estudados, cada pH apresentou uma configuração diferente para as ilhas iniciais. Quando foram analisadas amostras diferentes depositadas com um mesmo pH, a semelhança na formação dos aglomerados a partir de ilhas se manteve, como mostra a Figura 26.

Essa característica pode ser explicada pela diferença no enovelamento das moléculas, que apresentam ionização dependente do pH por serem polieletrólitos fracos. A ionização influencia diretamente no enovelamento uma vez que a densidade de carga modela a conformação da molécula através de repulsões intramoleculares, o que influencia na forma final do filme (Taketa, 2013; Zhang et al., 2013). Na Figura 27 é possível observar uma representação desse fato, sendo que há menor enovelamento na a situação em que o polímero está mais ionizado, além de que maior quantidade de cargas também gera maior atração entre as moléculas.

Também é importante lembrar que o PEI utilizado para fazer a pré-camada é um polieletrólito catiônico forte, com pKa acima de 8,0 (Ye Liu et al., 2005). Assim, nas condições experimentais utilizadas ele encontra-se altamente ionizado e não é necessário considerar que ocorra variações significativas nessa propriedade.

Figura 25 - Imagens de microscopia de força atômica de filmes CMC/CHI depositados em pH 4, 5 e 6 contendo 3, 7 e 15 bicamadas

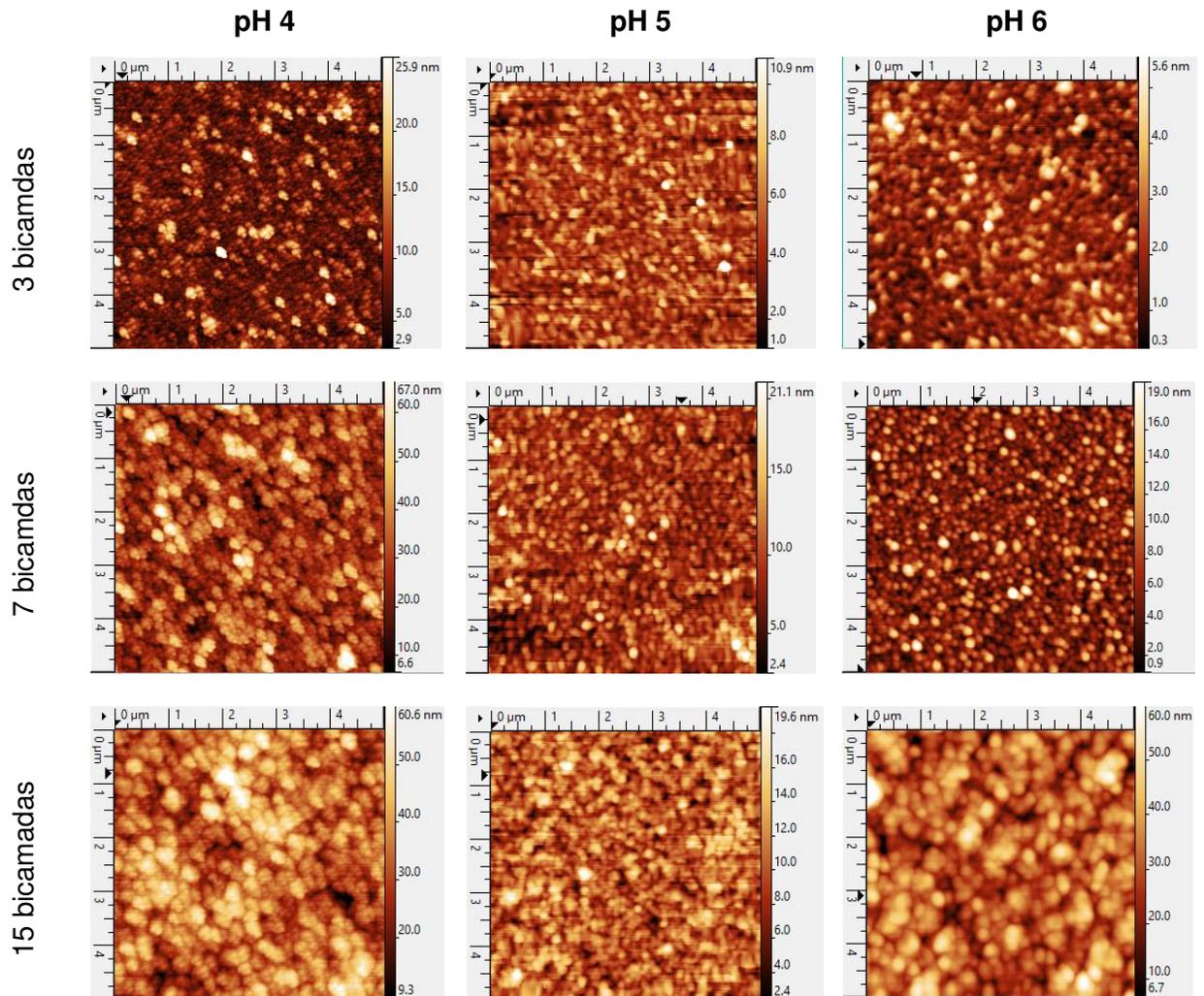


Figura 26 - Reprodutibilidade das amostras obtidas em pH 4 com 40 bicamadas

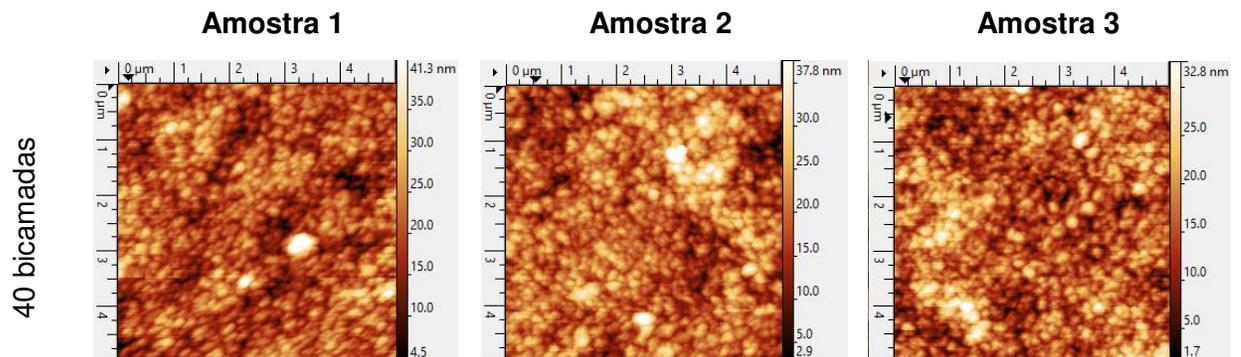
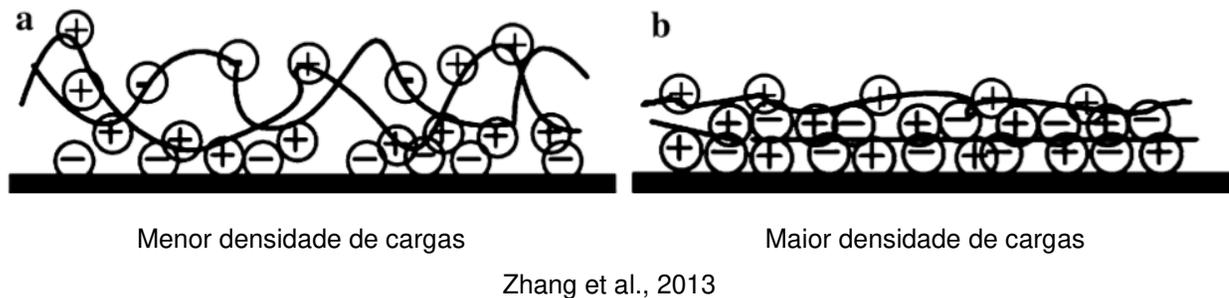


Figura 27 - Enovelamento versus % ionização



A importância da apresentação de tais resultados diz respeito à influência do crescimento dos filmes na morfologia da superfície final. Com essa informação, os filmes podem ser arquitetados de modo a influenciar na adesão de células e biomoléculas, assim como proliferação bacteriana (Taketa, 2013).

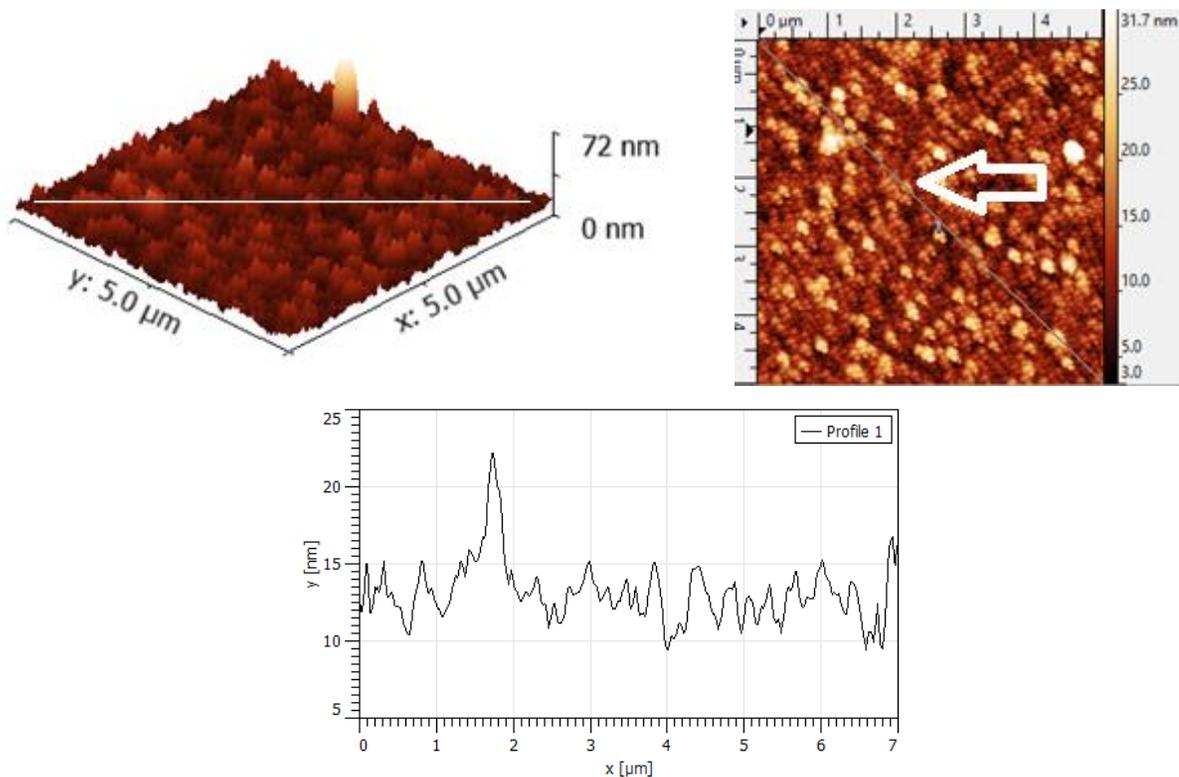
- Dimensão fractal

Com os dados obtidos na caracterização das amostras, a primeira análise realizada foi o cálculo da dimensão fractal. Para tal, foi analisado o perfil diagonal das amostras (Figura 28) e, através da imagem do perfil, calculou-se a dimensão fractal por *box-counting* com o software *Fractalyse*.

A dimensão fractal é a descrição do formato da superfície dos filmes, como apresentado anteriormente. Os algoritmos de cálculo fornecem uma aproximação do valor real, com boa representatividade. Para analisar os filmes de *layer-by-layer* foi adotado um padrão que permitisse obter uma comparação entre os filmes e o conhecimento inicial da sua dimensão fractal. Foram medidos 3 pontos em cada amostra (os mesmos para a análise de rugosidade e altura) e calculada a média entre eles.

Os valores encontrados para a dimensão fractal com a análise do perfil diagonal podem não serem iguais aos valores encontrados ao medir outros pontos da amostra, mas serão próximos. Sendo assim, as diferenças não serão discrepantes ao ponto de invalidar os resultados obtidos.

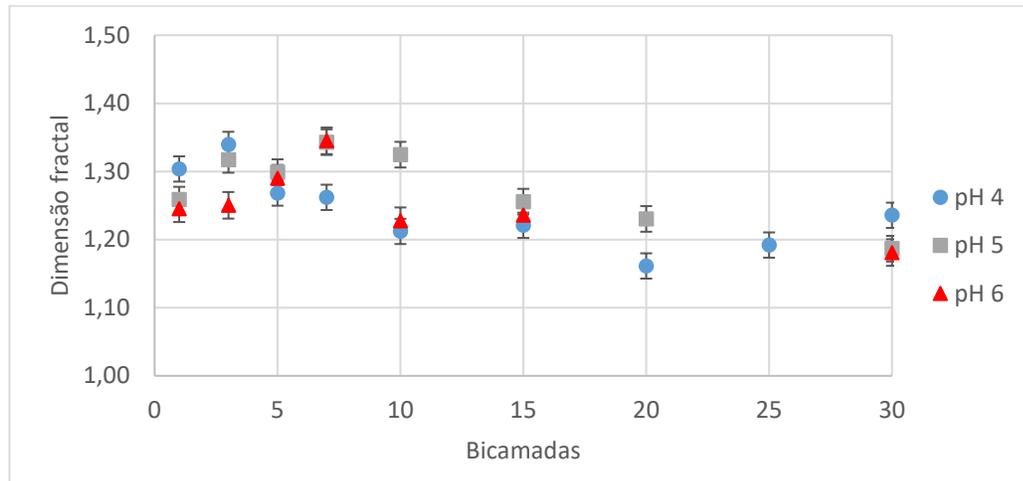
Figura 28 - Obtenção do perfil diagonal das amostras para cálculo da dimensão fractal



Exemplo de análise realizada para obtenção do perfil da amostra. Imagem aqui apresentada se refere a uma das replicatas da amostra (CMC₄/CHI₄)₅. Imagens do *software* Gwyddion 2.41.

Vale lembrar que superfícies possuem dimensão topológica $D_T = 2$. Entretanto, o perfil de superfícies se trata de uma representação da superfície através de uma linha de contorno, possuindo dimensão topológica $D_T = 1$. Assim, sua dimensão fractal estará no intervalo $1 \leq D \leq 2$. A utilização do perfil para a análise consiste em simplificar o cálculo, uma vez que, apesar de não conter informações completas sobre a superfície, o mesmo pode ser utilizado para sua análise e correlacionado com sua representação total através de manipulação matemática e simulação (Majumdar & Tien, 1990).

Na Figura 29 encontram-se os resultados obtidos para a evolução da dimensão fractal durante o crescimento dos filmes CMC/CHI, sendo esses valores médios de 3 pontos da amostra.

Figura 29 - Resultados de dimensão fractal em função do número de bicamadas

As irregularidades do perfil da superfície dos filmes para os diferentes valores de pH foram comparáveis. Os filmes apresentam um aumento na dimensão fractal nas camadas iniciais, atingindo o valor de 1,35. Isso se deve a formação de pequenos aglomerados na superfície (Zhang et al., 2013). Conforme ocorre evolução desses aglomerados e posterior correlação entre eles, o formato da superfície tende a estabilizar em aproximadamente 1,20.

Esse resultado indica que a superfície dos filmes *layer-by-layer* de CMC/CHI apresentam irregularidades em sua forma. Entretanto, por estar mais próximo do limite inferior da faixa de valores (topografia euclidiana), pode-se afirmar que possui poucas irregularidades, sendo pouco “rugoso” – a utilização das espas visa aplicar o conceito intuitivo de rugosidade de superfície para explicação, não sendo utilizada aqui a definição técnica de rugosidade.

O estudo realizado teve como objetivo apresentação do conceito de dimensão fractal em filmes *layer-by-layer* e primeiro conhecimento das irregularidades de formato em sua superfície. É importante ressaltar que fractais *self-affine* não possuem uma única dimensão fractal. Assim, a dimensão fractal calculada é uma dimensão fractal local, a qual descreve as características locais da amostra (Vicsek, 1999).

- Crescimento da superfície

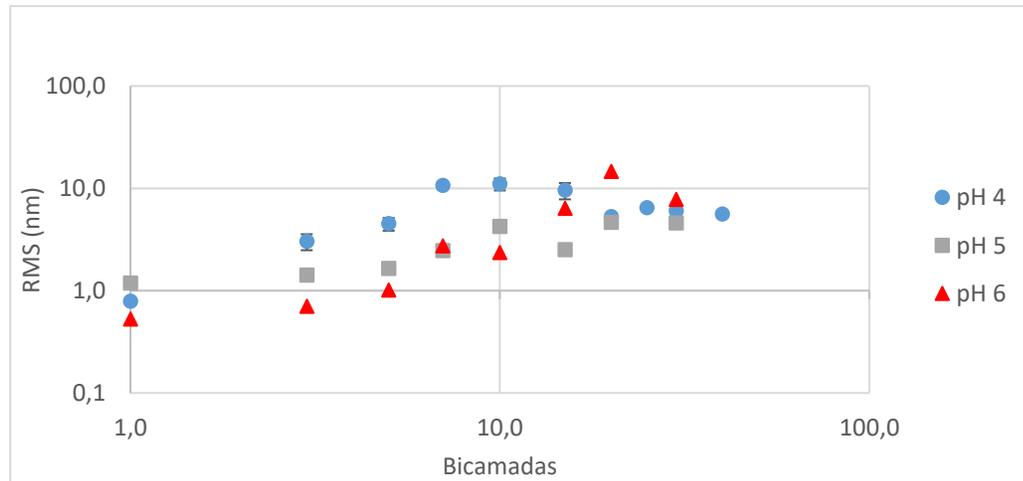
Os dados de rugosidade provenientes das microscopias obtidas se encontram na Tabela 9 abaixo, com os valores de espessura da camada superior para cada situação de pH e desvio padrão. O índice das variáveis se refere ao pH.

Tabela 9 - Dados experimentais de rugosidade

Número de Bicamadas	pH = 4,0		pH = 5,0		pH = 6,0	
	\bar{w}_4 (nm)	σ_{w4} (nm)	\bar{w}_5 (nm)	σ_{w5} (nm)	\bar{w}_6 (nm)	σ_{w6} (nm)
1	0,79	0,03	1,18	0,07	0,5	0,1
3	3,0	0,5	1,4	0,2	0,70	0,04
5	4,5	0,6	1,6	0,2	1,0	0,2
7	10,7	0,9	2,5	0,1	2,7	0,1
10	11	1	4,2	0,3	2,34	0,04
15	10	2	2,5	0,2	6,4	0,4
20	5,3	0,3	4,7	0,4	14,6	0,2
25	6,5	0,4	-	-	-	-
30	6,0	0,3	4,6	0,4	7,8	0,5
40	5,6	0,5	-	-	6,8	-

A partir dos dados de rugosidade foram obtidos gráficos log-log semelhantes à Figura 12, buscando indicação da presença ou não de correlação na superfície (Figura 30). Essa presença é notada pela estabilização da rugosidade, atingindo um valor de saturação.

Figura 30 - Perfil de rugosidade dos filmes de CMC/CHI em função do número de bicamadas



Para as três condições de pH é possível observar que houve saturação, o que leva à exclusão do modelo de deposição randômica como ponto de partida para descrição do sistema. Nos filmes LB também ocorre saturação da superfície, e é sugerido descrever seu crescimento a partir de um modelo da teoria não-linear (Rozlosnik et al., 1997). Para os filmes analisados nesse trabalho será considerada a variação da altura média para avaliação do melhor modelo.

Outros dados podem ser obtidos através da rugosidade dos filmes, como os parâmetros α e β . O cálculo foi realizado analisando-se a Figura 30 com base na Figura 12 e nas equações 22 e 23, lembrando que o expoente β é o coeficiente angular da etapa de crescimento e o expoente α definido a partir do valor de saturação do sistema:

$$\beta \sim \frac{\log w(Bic)}{\log Bic} \qquad \alpha \sim \frac{\log w_{sat}}{\log L}$$

Para a situação em estudo foi considerado o tamanho do sistema (L) como sendo a quantidade de pixels da imagem bidimensional de AFM, no caso 256^2 .

Tabela 10 - Parâmetros de crescimento calculados

	β	α
$pH = 4,0$	1,20	0,19
$pH = 5,0$	0,90	0,12
$pH = 6,0$	1,30	0,20

Os resultados foram obtidos pela análise da imagem em 2D. Assim, retornando à Tabela 3 é possível observar que os valores de α estão próximos aos valores teóricos. Entretanto, os valores de β são consideravelmente maiores que os previstos pela teoria, indicando que os filmes crescem mais rapidamente. Esse fato era esperado pois os filmes *layer-by-layer* analisados tratam da deposição de macromoléculas em solução, situação muito mais caótica quando comparada à deposição atômica utilizada como base para fornecimento dos valores da literatura.

Entre os filmes também é possível comparar a situação de crescimento e rugosidade. O filme em $pH = 5,0$ apresentou menor taxa de crescimento e menor rugosidade em sua superfície final, devido a suas características de ionização, que resultam em moléculas pouco enoveladas e com mais cargas disponíveis para interações intermoleculares entre os polímeros. Os filmes em $pH = 4,0$ e $pH = 6,0$ encontram-se mais enovelados, com ionização inversa (Tabela 5), e seus expoentes foram próximos. Isso indica que a ionização é um fator determinante na formação dos filmes.

Na Tabela 11 encontram-se os valores experimentais da altura média, juntamente com seu desvio padrão. A partir desses dados foram obtidos os gráficos da Figura 31, apresentando a evolução da altura média durante a deposição *layer-by-layer*.

Tabela 11 - Dados experimentais de altura

Número de Bicamadas	pH = 4,0		pH = 5,0		pH = 6,0	
	\bar{h}_4 (nm)	σ_{h4} (nm)	\bar{h}_5 (nm)	σ_{h5} (nm)	\bar{h}_6 (nm)	σ_{h6} (nm)
1	1,9	0,1	3,2	0,4	1,7	0,3
3	6,5	0,9	4,6	0,7	1,79	0,06
5	11	2	4,5	0,7	2,1	0,2
7	29	1	7,0	0,2	6,7	0,8
10	36	5	10,8	0,9	7,1	0,4
15	35	2	10,1	0,8	29	3
20	17,7	0,6	17	1	66	4
25	22	1	-	-	-	-
30	16	1	17	2	37,0	0,7
40	15	1	-	-	30,8	-

Figura 31 - Altura média de cada bicamada

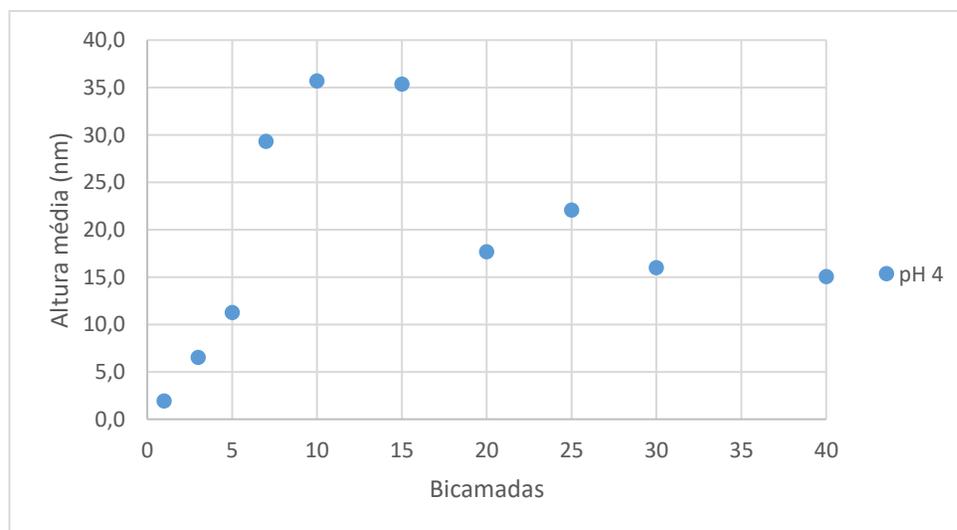
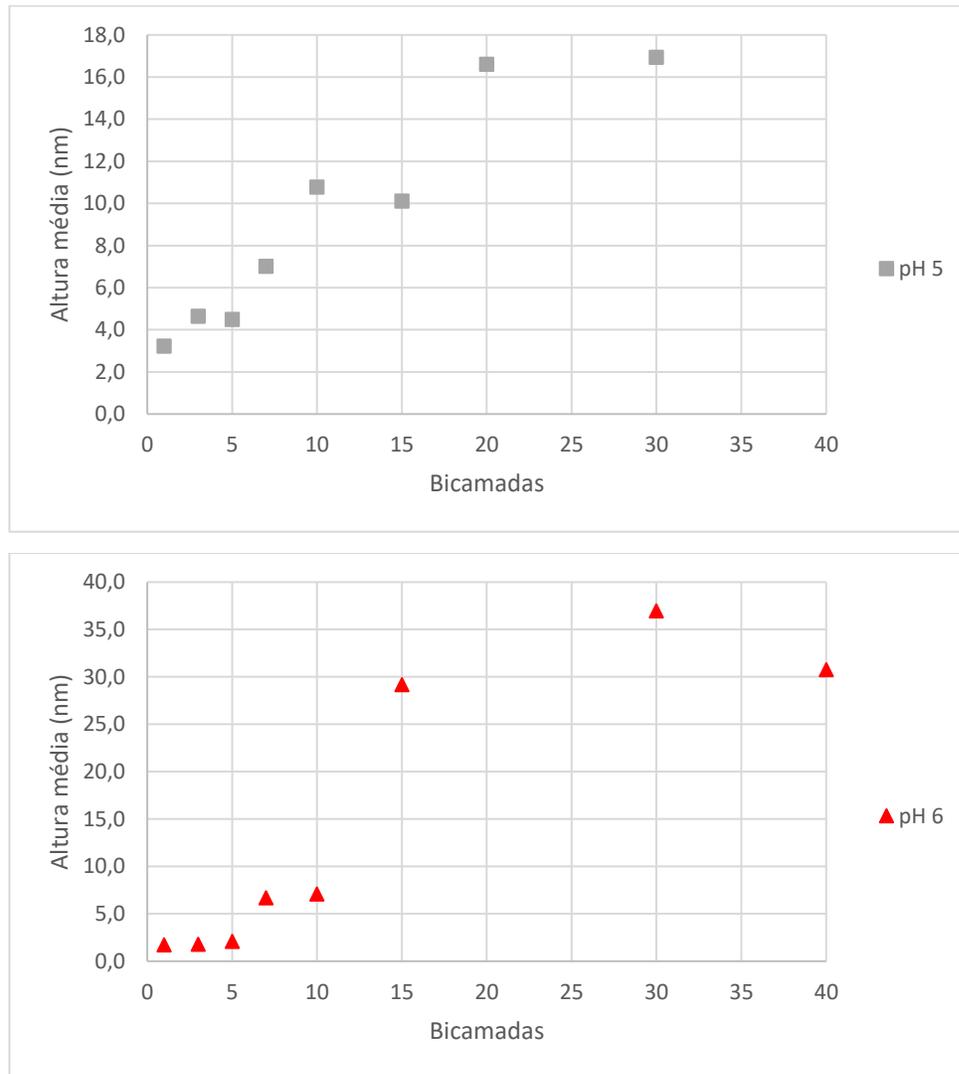


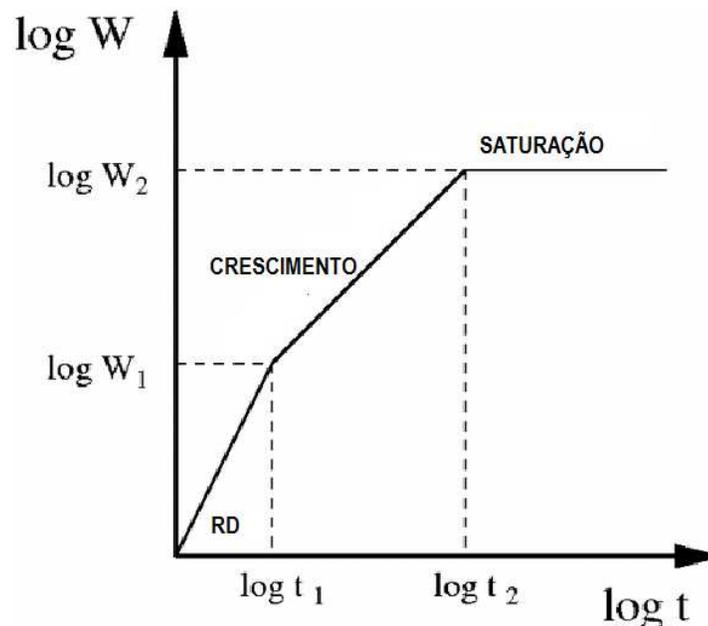
Figura 31 - Altura média de cada bicamada (cont.)

Pela Figura 31 é possível observar que há um crescimento inicial na altura média com posterior tendência a estabilização do valor. Isso indica que o filme evolui para uma situação que pode ser descrita pelo modelo linear, pois não há variação considerável na altura média do sistema. Entretanto, durante a deposição das primeiras bicamadas é notado irregularidade, enquanto que as camadas durante a etapa de crescimento do filme apresentam variação na altura média. Assim, com esses resultados é possível analisar o crescimento dos filmes estudados e sugerir modelo para descrever a evolução da altura total com o número de bicamadas depositadas $\left(\frac{\partial h}{\partial bic}\right)$.

Inicialmente, os resultados permitem confirmar a influência da ionização dos polímeros no seu crescimento, apresentando diferenças no enovelamento de acordo com as propriedades do meio. Para o caso de $pH = 5$ no qual ambos os polímeros estão altamente ionizados, o filme apresenta menores valores de altura (Figura 27).

Quanto à diferença entre as características do crescimento ao longo da deposição, os resultados sugerem que possa haver mais de um regime presente. A hipótese proposta é de que nas primeiras camadas há deposição randômica, posteriormente um crescimento não-linear e após a saturação o sistema possa ser descrito segundo um modelo linear, como sugere Chou & Pleimling (2009) – Figura 32.

Figura 32 - Fases de crescimento do filme



Adaptado de Chou & Pleimling, 2009

Entretanto, considerando a aplicação pretendida (filmes com poucas bicamadas) e os resultados obtidos a partir do cálculo dos expoentes e do comportamento da altura média sugere-se que o crescimento seja predominantemente descrito pela equação de KPZ, ou seja, modelo não-linear. Para adequar-se ao fato da tendência à estabilização da altura média, é importante ressaltar que o termo quadrático da equação deva ser menor que zero (negativo).

Sumarizando as principais conclusões:

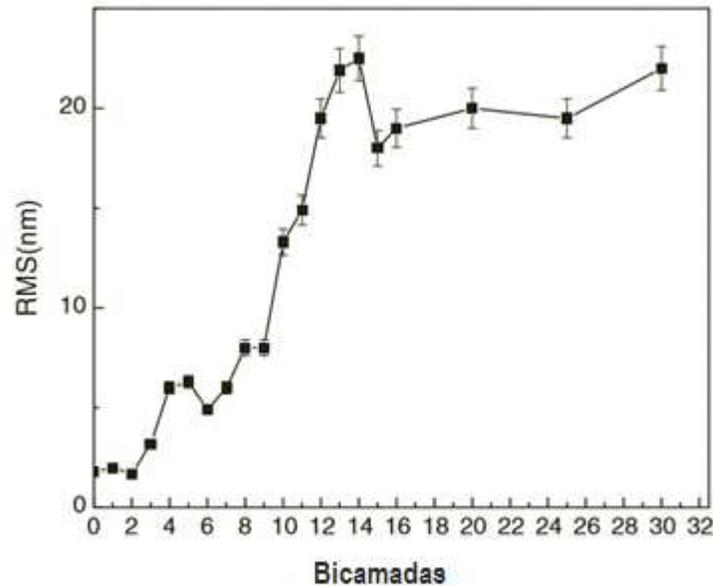
- O crescimento dos filmes é afetado pela ionização dos polímeros;
- Há presença de tensão superficial que permite que o filme sature;
- A altura média das bicamadas varia, mas tende a se estabilizar após a saturação;
- O crescimento de filmes polímeros naturais é mais rápido do que filmes de metais formados por deposição atômica;
- O melhor modelo para descrever o crescimento é o não-linear, utilizando-o com cautela.

Foram apresentados modelos e o embasamento teórico para a descrição matemática dos filmes, obtendo parâmetros empíricos e correlacionando com os dados disponíveis na literatura. Sugere-se que o crescimento dos filmes de CMC/CHI depositados pela técnica *layer-by-layer* possuam crescimento de superfície não-linear para todas as situações de pH consideradas. Entretanto, quando ambos os polímeros se encontram altamente ionizados, o crescimento é mais lento e mais linear devido a maior interação eletrostática e ao menor enovelamento das moléculas nessa condição.

Para finalizar o estudo serão apresentadas outras caracterizações de filmes depositados por *layer-by-layer*, retirados da literatura, para comparar as características de crescimento dos mesmos. Esses filmes são compostos por diversos materiais, sintéticos ou não, e poderão fornecer uma visão ampla do assunto abordado.

O primeiro caso é um estudo de filmes de CMC/CHI, como nesse trabalho, realizado por Zhang et al. (2013). Utilizando CHI com um grau de desacetilação de 80-95%, foram preparados filmes de *pH* 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 utilizando microbalança de quartzo para deposição em substrato de vidro. Os filmes em *pH* = 4,0 foram investigados por AFM e permitiram a construção de um gráfico de evolução da rugosidade (Figura 33).

Figura 33 - Evolução da rugosidade do filme CMC/CHI proveniente da literatura

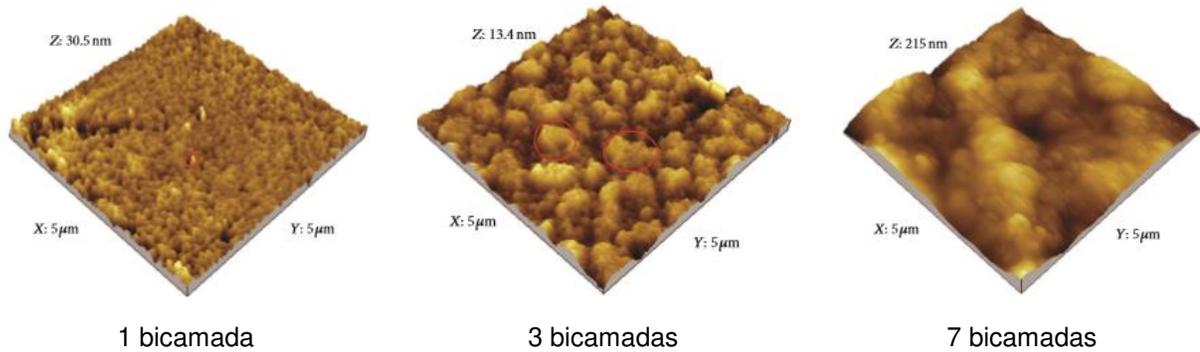


Adaptado de Zhang et al., 2013

Apesar de não estar na forma de log-log e possuir outros valores de rugosidade devido às diferentes características do polímero e deposição, é possível observar dois pontos importantes nesse resultado: presença de saturação do sistema e irregularidade na deposição das primeiras camadas. Essas duas características também estão presentes no sistema estudado por esse trabalho.

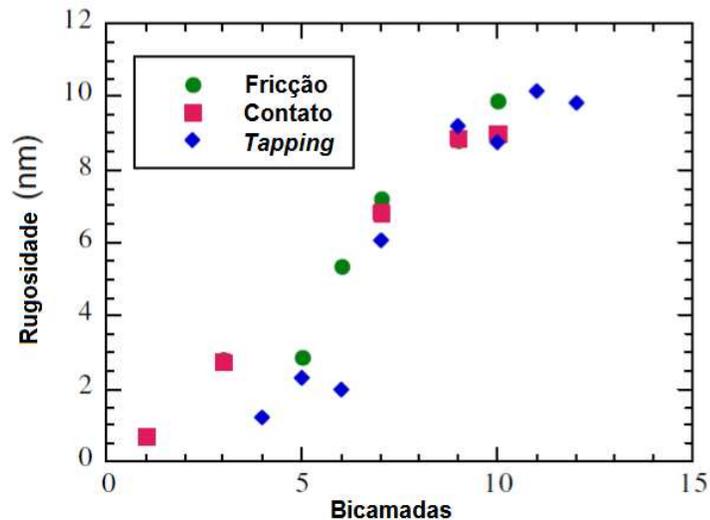
Como conclusão, Zhang et al. (2013) afirmam que o modelo que melhor descreve o crescimento é o modelo não-linear, independentemente do pH – corroborando com os resultados obtidos.

Gomes et al. (2013) estudou o crescimento de filmes *layer-by-layer* de vinho e albumina bovina (BSA). Em seus filmes notaram a coalescência das ilhas originalmente formadas (Figura 34) e também sugeriram que o modelo que descreve o crescimento dos filmes é, inicialmente, não-linear. Notaram posterior transição para um crescimento linear, como foi apresentado anteriormente sobre a possibilidade de existência de mais de um regime predominante (Figura 32). Foi utilizado substrato de quartzo e excluído o processo de lavagem durante a deposição devido a características do sistema.

Figura 34 - Coalescência de ilhas

Adaptado de Gomes et al., 2013

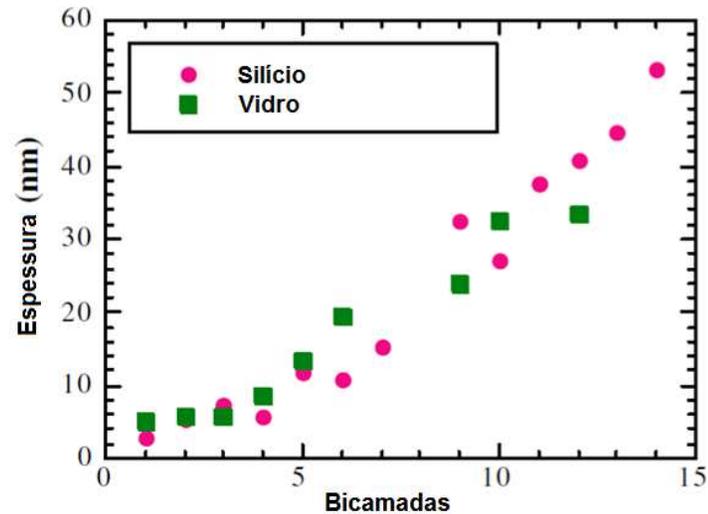
Estudando o crescimento de filmes *layer-by-layer* de polímeros sintéticos, Lobo et al. (2003) fez a deposição de POMA [poli(o-metoxianilina)], um polímero semiconductor solúvel e PVS [ácido polivinilsulfônico], um polieletrólito, em diversos substratos. Para a deposição realizada em substrato de silício foi feita análise de AFM no modo contato, fricção e *tapping* (Figura 35).

Figura 35 - Rugosidade do filme POMA/PVS avaliada por AFM

Adaptado de Lobo et al., 2003

É possível notar que também há saturação do sistema após certo número de bicamadas depositadas, relatado pelos autores juntamente com a coalescência de ilhas. Outro dado apresentado foi a evolução da altura do filme, apresentado na Figura 36.

Figura 36 - Evolução da espessura do filme POMA/PVS



Adaptado de Lobo et al., 2003

Pela evolução da altura é possível observar a irregularidade das primeiras camadas, também presente nos filmes de polímeros naturais. Os autores sugerem que os resultados indicam um modelo de crescimento não-linear, entretanto deixam claro que não foi possível assumir um único modelo para explicar todos os dados obtidos.

Como foi possível notar, a caracterização dos filmes formados por deposição *layer-by-layer* não é direta como em filmes formados por deposição atômica. Isso se deve ao fato do menor controle sobre a formação do filme em escala atômica. Apesar da técnica permitir a obtenção de filmes estruturados, a conformação final não necessariamente se apresenta em camadas perfeitamente separadas, podendo haver difusão e inter-relação entre uma bicamada e outra.

Os resultados do trabalho indicam que as camadas interagem durante a formação do filme para obter a configuração mais estável. A comparação com a literatura mostra que essa característica não é apenas de filmes formados por polímeros naturais. Foi possível notar que a utilização de um modelo não-linear para *input* inicial da descrição do crescimento do filme é uma boa aproximação e pode auxiliar na simulação de sistemas de filmes *layer-by-layer*. Como a caracterização apresentada considerou a abordagem fractal, foi fornecida a estrutura de rugosidade independente de escala (Majumdar, 1990). Assim, foi possível formar uma base para o estudo de interações na superfície dos filmes.

5 – CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo o maior entendimento dos filmes *layer-by-layer* sintetizados no laboratório para aplicações biomédicas. Para isso, escolheu-se um dos conjuntos de polímeros naturais utilizados para esse fim (CMC/CHI) e realizou-se o estudo matemático desses filmes. Foram abordadas as características dos polímeros e condições experimentais mais utilizadas pelo grupo.

A caracterização do crescimento dos filmes não é direta como em filmes formados por deposição atômica, devido à estruturação interna do filme formado. Entretanto, pôde-se concluir que há interação entre as bicamadas, apresentando saturação da rugosidade para todos os valores de pH estudados. Com a alteração do pH foi possível determinar a influência da ionização dos polímeros na formação da superfície do filme e em sua espessura, condição que se mostrou significativa tanto na evolução da altura quanto na formação e coalescência de ilhas durante a deposição.

Pelo estudo da evolução da altura foi possível sugerir que um modelo não-linear pode ser considerado como ponto de partida para simular superfícies de filmes *layer-by-layer* e seus perfis. Deve-se considerar que o modelo é uma base para fornecer informações e que deve ser adequado para cada situação, não sendo sugerido estabelecer um modelo geral para todos os casos de deposição *layer-by-layer* devido a peculiaridades relativas aos materiais, substratos e condições experimentais.

O estudo conclui que mesmo com polímeros naturais, os quais apresentam variações inclusive entre lotes, foi possível obter resultados condizentes com a literatura para o crescimento desses filmes.

As informações obtidas possibilitaram maior conhecimento dos filmes depositados em laboratório para aplicações biomédicas e permitem melhor escolha dos parâmetros experimentais. Os resultados também auxiliam em futuras simulações contendo esses sistemas por oferecer parâmetros teóricos para o crescimento dessas superfícies.

6 – SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Espera-se que os resultados desse estudo possam contribuir com o desenvolvimento de novas pesquisas e aprofundamento da aplicação biomédica de filmes *layer-by-layer* de biopolímeros. Algumas sugestões para continuação do trabalho ou aplicação de suas conclusões são:

- Experimental: obtenção de maior quantidade de dados para mapeamento do crescimento de filmes através da deposição *layer-by-layer*
 - Filmes de CMC/CHI: reduzir o intervalo de obtenção de dados e aumentar o número de amostras;
 - Filmes de outros biopolímeros: repetir o estudo para filmes de outros biopolímeros;
 - Caracterização do sistema sob solvente para simular o ambiente final de aplicação.
- Teórico: utilizar dados obtidos para realização de simulações
 - Acompanhar a evolução da dimensão fractal com o entumescimento;
 - Estudo da difusão no interior dos filmes;
 - Simular o crescimento dos filmes e a interação da superfície final com células, bactérias e outras situações de interesse.

Sendo que a vertente teórica segue com maior justiça o objetivo desse trabalho.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMQVIST, N. Fractal analysis of scanning probe microscopy images. **Surface Science**, v. 335, p. 221-228, 1996.

AMIN, M. L.; JOO, J. Y.; YI, D. K.; AN, S. S. A., Surface modification and local orientation of surface molecules in nanotherapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 207, p. 131-142, 2015.

ARGILE, C.; RHEAD, G. E., Adsorbed layer and thin film growth monitored by auger electron spectroscopy. **Surface Science Reports**, v. 10, p.277-356, 1989.

ARGUËLLES-MONAL, W.; PENICHE-COVAS, C., Study of the intrapolyelectrolyte reaction between chitosan and carboxymethyl cellulose. **Makromol. Chem. Rapid Commun.**, v. 9, p. 693-697, 1988.

ARGUËLLES-MONAL, W.; GÁRCIGA, M.; PENICHE-COVAS, C., Study of the stoichiometric polyelectrolyte complex between chitosan and carboxymethyl cellulose. **Polymer Bulletin**, v. 23, p, 307-313, 1990.

BARABÁSI, A-L.; STANLEY, H. E., **Fractal concepts in surface growth**. Cambridge: University Press, 1995.

BLOSSEY, R., Self-cleaning surfaces: virtual realities. **Nature Materials**, v. 2,p. 301-306, 2003.

BRAGA, P. C.; RICCI, D. (Ed.) **Atomic Force Microscope**: Biomedical Methods and Applications. New Jersey: Humana Press, 2004.

BUSILACCHI, A.; GIGANTE, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; MANZOTTI, S.; MUZZARELLI, R. A. A., Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 665-676, 2013.

CHANG, B.; ZHANG, M.; QING, G.; SUN, T., Dynamic biointerfaces: from recognition to function. **Small**, v. 11, n. 9-10, p. 1097-1112, 2015.

CHEN, H.; FAN, M., Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Polyelectrolyte Complex Scaffolds for Pulp Cells Regeneration. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 22, p. 475-491, 2007.

CHOU, Y-L.; PLEIMLING, M., Parameter-free scaling relation for nonequilibrium growth processes. **Phys. Rev. E**, v. 79, n. 5, 2009.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials**, 2^a Ed., Cap.1, 2012.

DUMITRIU, S. (Ed.), **Polymeric Biomaterials**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994.

FAMILY, F., Scaling of rough surfaces: effects of surface diffusion. **J. Phys. A: Math. Gen.**, v. 19, p. L441-L446, 1986.

FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; NURDIN, N.; MATHIEU, H. J.; DESCOUTS, P.; LEW, D. P., Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. **Biomaterials**, v. 17, p. 667-678, 1996.

GINKEL, C. G.; GAYTON, S., The biodegradability and nontoxicity of carboxymethyl cellulose (DS 0.7) and intermediates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 270-274, 1996.

GOMES, M. N.; BRITO, J. B.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C., Layer-by-Layer Films from Wine: An Investigation of an Exponential Growth Process. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

GOOSEN, M. F. A., **Applications of Chitin and Chitosan**. Florida: CRC Press, 1997.

GRASSBERGER, P., Generalizations of the Hausdorff dimension of fractal measures. **Physics Letters A**, v. 107, n. 3, p. 101-105, 1985.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H., **Perry's Chemical Engineers Handbook**. 8^a Ed., USA: McGraw-Hill Companies, 2008.

HEINZE, T.; KOSCHELLA, A., Carboxymethyl ethers of cellulose and starch: a review. **Macromol. Symp.**, v. 223, p. 13-39, 2005.

HERBERS, C. R.; LI, C.; VEGT, N. F. A., Grand challenges in quantum-classical modeling of molecule-surface interactions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, p. 1177-1188, 2013.

JANDT, K. D., Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. **Surface Science**, v. 491, p. 303-332, 2001.

JENA, B. P.; HÖRBER, H. J. K. (Ed.) **Methods in Cell Biology: Atomic Force Microscopy in Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2002.

KUMAR, M. N. V. R., A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, n. 46, p.1-27, 2000.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T., Quitosana: biopolímero funcional com potencial biomédico. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, S. M. (Ed.), **Advances in Biomaterials 1**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc., 1987.

LIU, YUNXIAO; HE, T.; GAO, C., Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 46, p. 117-126, 2005.

LIU, YE; WU, D-C.; ZHANG, W-D.; JIANG, X.; HE, C-B.; CHUNG, T.S.; GOH, S.H.; LEONG, K. W. Polyethyleneimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery for DNA. **Angewandte Chemie**, v.117, n. 30, 2005.

LOBO, R. F. M.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; RAPOSO, M.; FARIA, R. M.; OLIVEIRA JR, O. N. The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy. **Nanotechnology**, v. 14, p. 101-108, 2003.

- MAJUMDAR, A.; TIEN, C. L., Fractal characterization and simulation of rough surfaces. **Wear**, n. 136, p. 313-327, 1990.
- MANDELBROT, B. B., Self-affine fractal and fractal dimension. **Physica Scripta**, v. 32, p. 257-260, 1985.
- MANDELBROT, B. B., **Fractals**: Form, chance and dimension. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1977.
- MOTAMEDIAM, S. R.; HOSSEINPOUR, S.; AHSAIE, G. M.; KHOJASTEH, A., Smart scaffold in bone tissue engineering: A systematic review of literature. **World J. Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 657-668, 2015.
- OGUSHI, Y.; SAKAI, S.; KAWAKAMI, K., Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-33, 2007.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S., **Biomaterials**: Fundamentos & aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- PARK, J. B., **Biomaterials science and engineering**. New York: Plenum Press, 1984.
- PERRIN, J., **Atoms**. New York: Van Nostrand, 1916.
- PENTLAND, A. P., Fractal-based description of natural scenes. **IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence**, v. PAMI-6, n.6, 1984.
- PICART, C., Bioactive layer-by-layer films to stimulate cell growth and differentiation. In: KOBAYASHI, S.; MÜLLEN, K. (Eds.). **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 85-270.
- PRATT, C.; CORNELLY, K., **Essential biochemistry**. John Wiley & Sons, 2004.
- QIU, X.; LEPORATTI, S.; DONATH, E.; MÖHWALD, H., Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles. **Langmuir**, v. 17, p. 5375-7380, 2001.
- RATNER, B. D.; CASTNER, D. G., **Surface modification of polymeric biomaterials**. New York: Plenum Press, 1997.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E., **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. 3^a Ed., Canada: Academic Press, 2013.

RINAUDO, M., Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROZLOSNIK, N.; ANTAL, G.; PUSZTAI, T.; FAIGEL, G. Surface roughness in Langmuir-Blodgett multilayer films studied by AFM and X-ray diffraction. **Supramolecular Science**, v. 4, n. 3-4, p. 215-218, 1997.

SALINAS, S. R. A., **Introdução à Física Estatística**. 2^a Ed., 1^a reimp., São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005.

SARMENTO, B.; NEVES, J., **Chitosan-based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics**. John Wiley & Sons, 2012.

SINGH, T.; KOTHAPALLI, C.; VARMA, D.; NICOLL, S. B.; VAZQUEZ, M., Carboxymethylcellulose hydrogels support for central nervous system-derived tumor-cell chemotactic migration: comparison with conventional extracellular matrix molecules. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, p. 433-441, 2014.

TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A., Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, p. 3203-3224, 2006.

TAKETA, T. B., **Obtenção e caracterização de recobrimentos de quitosana/ácido hialurônico e quitosana/alginato de sódio pela técnica layer-by-layer para aplicações antimicóticas**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2013.

TSUJII, K., **Surface activity: principles, phenomena and applications**. San Diego: Academic Press, 1998.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M., Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **European Polymer Journal**, v. 41, 923-932, 2005.

VICSEK, T., **Fractal Growth Phenomena**. 2^a Ed., Singapore: World Scientific Publishing, 1999.

VRIJLAND, W. W.; TSENG, L. N. L.; EIJKMAN, H. J. M.; HOP, W. C. J.; JAKIMOWICZ, J. J.; LEGUIT, P.; STASSEN, L. P. S.; SWANK, D. J.; HAVERLAG, R.; BONJER, J.; JEEKEL, H., Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial. **Annals of Surgery**, v. 235, n. 2, p. 193–199, 2002.

WAHL, B.; VAN ROY, P.; LARSON, M.; KAMPMAN, E., **Exploring fractals on Macintosh**. 1^a Ed., Addison-Wesley Professional, 1994.

WEISSTEIN, E. W., **Koch Snowflake**. From *MathWorld* -- A Wolfram Web Resource. Disponível em: <http://mathworld.wolfram.com/KochSnowflake.html>. Acessado em: 08/08/2016.

WILLIAMS, D. F., On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

WILLIAMSON, A. W., XXII – On etherification. **Q. J. Chem. Soc.**, v.4, n. 3, p. 229-239, 1852.

WITTEN, T. A.; SANDER, L. M., Diffusion-limited aggregation. **Physical Review B**, v. 27, n. 9, 1983.

WU, G.; LI, P.; FENG, H.; ZHANG, X.; CHU, P. K., Engineering and functionalization of biomaterials via surface modification. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 2024, 2015.

ZHANG, S.; WENTAO, L.; LIANG, J.; LI, X.; LIANG, W.; HE, S.; ZHU, C.; MAO, L., Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films. **Cellulose**, v. 20, p. 1135-1143, 2013.

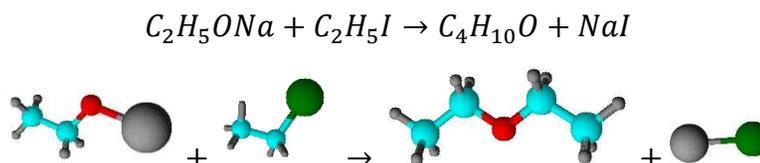
APÊNDICE A

- **Síntese de Williamson**

(Williamson, 1852)

A síntese de Williamson consiste na obtenção de éteres a partir de decomposição dupla, como exemplificado simplificadaamente na Figura A1.

Figura A1 - Reação segundo a síntese de Williamson



Esquema ilustrativo feito com o software ChemSketch

Williamson (1852)

O alcóxido e o haleto orgânico reagem para formar o éter, posteriormente separado por destilação. O motivo para a dupla troca é a eletronegatividade dos halogênios (exceto o flúor) ser menor do que a do oxigênio, permitindo que este se ligue ao carbono do radical orgânico.

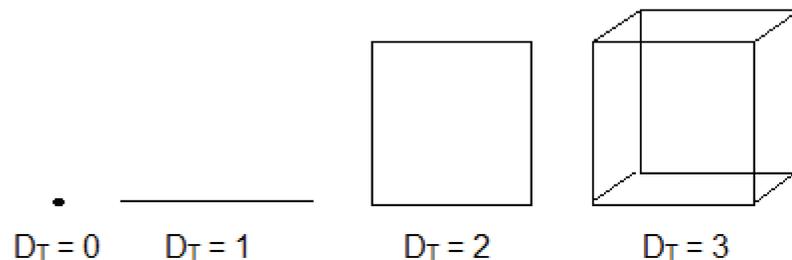
APÊNDICE B

- **Dimensão Hausdorff-Besicovitch**

(Wahl et al., 1994)

Na geometria clássica (euclidiana), as formas possuem dimensão dada por valores inteiros, como exemplificado na Figura B1.

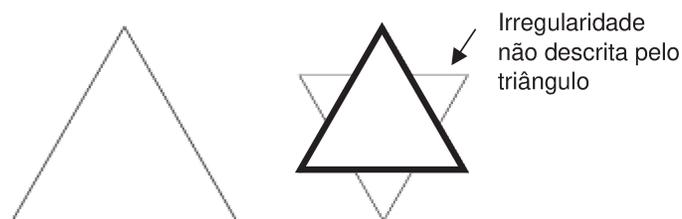
Figura B1 - Dimensões geométricas clássicas



Adaptado de Wahl, et al. (1994)

Felix Hausdorff (1868-1942) e Abram Besicovitch (1891-1970) propuseram a existência de dimensões não-inteiras, as quais estão relacionadas com as informações de como as formas se apresentam. Utilizando como exemplo a curva de Koch, é possível observar como o triângulo de dimensão topológica $D_T = 2$ não descreve a forma da Figura B2 de maneira correta. Para isso, é necessária a indicação de que há irregularidades na superfície do triângulo, indicadas pela dimensão não-inteira $D = 2,26$.

Figura B2 - Irregularidades de formato



Adaptado de Wahl, et al. (1994)

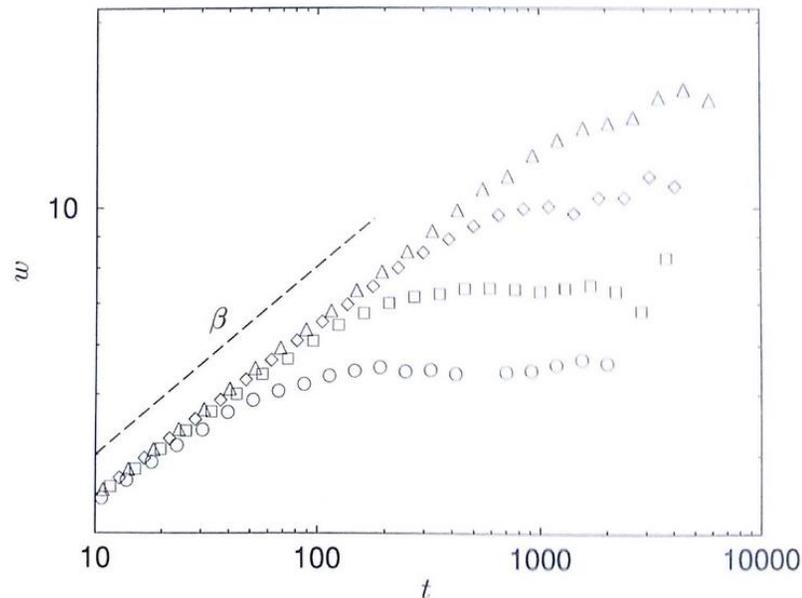
Essas dimensões não-inteiras são chamadas de dimensões Hausdorff-Besicovitch.

APÊNDICE C

- **Relação de escalonamento de Family-Vicsek**
(Barabási & Stanley, 1995)

Partindo da variação dos valores de espessura com o tempo para sistemas de diferentes tamanhos (Figura C1), é possível relacionar todas as curvas utilizando algumas manipulações matemáticas.

Figura C1 - Evolução de espessura para sistemas de diferentes tamanhos (L)



○ L=100 □ L=200 ◇ L=400 ▲ L=800

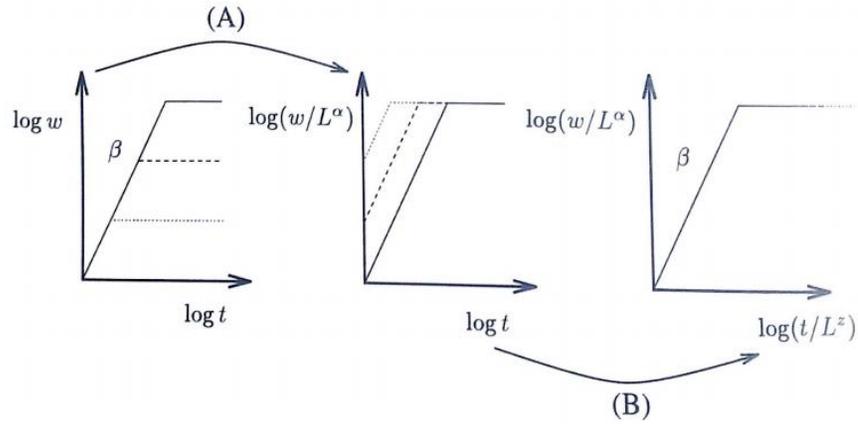
Barabási & Stanley (1995)

A) Plotando $\frac{w(L,t)}{w_{sat}(L)}$ em função do tempo, obtém-se uma curva que satura no mesmo valor, independentemente do tamanho do Sistema.

B) Plotando a espessura em função de $\frac{t}{t_x}$, obtém-se curvas com o mesmo tempo de saturação.

Essas transformações estão representadas na Figura C2.

Figura C2 - Representação gráfica das transformações matemáticas para relação de escalonamento



Barabási & Stanley (1995)

Assim, conclui-se que:

$$\frac{w(L, t)}{w_{sat}(L)} \sim f\left(\frac{t}{t_x}\right)$$

Equação C1

Mas $w_{sat}(L) \sim L^\alpha$ e $t_x \sim L^z$. Então:

$$w(L, t) \sim L^\alpha * f\left(\frac{t}{L^z}\right)$$

Equação C2

A Equação C2 é conhecida como relação de escalonamento de Family-Vicsek.

APÊNDICE D

- **Modelo discreto de deposição randômica (RD)**

(Barabási & Stanley, 1995)

Na deposição randômica considera-se que não há correlação entre as colunas. Assim, cada uma possui a mesma probabilidade de crescimento (eventos equiprováveis), o que possibilita o cálculo da probabilidade de uma coluna ter altura h através da teoria de distribuição binomial. As propriedades estatísticas básicas desse tipo de distribuição são apresentadas resumidamente nas Equações D1 e D2 (Salinas, 2005).

➤ Combinação de eventos

$$C_R^N = \frac{N!}{R!(N-R)!} \quad \text{Equação D1}$$

➤ Probabilidade

$$P_N(R) = \frac{N!}{R!(N-R)!} p^R (1-p)^{N-R} \quad \text{Equação D2}$$

Para a situação em questão, a probabilidade normalizada de uma coluna ter altura h , após certo número N de partículas depositadas, será como descrito pela Equação D3.

$$P(h, N) = \binom{N}{h} p^h (1-p)^{N-h} \quad \text{Equação D3}$$

A altura média pode ser calculada seguindo o conceito de valor médio para distribuição binomial (Equação C4), utilizando a definição de tempo apresentada na Equação 10.

$$\langle h \rangle \equiv \sum_{h=1}^N h * P(h, N) = Np = \frac{N}{L} = t \quad \text{Equação D4}$$

A caracterização da próxima altura média pode ser calculada pelo segundo momento.

$$\langle h^2 \rangle \equiv \sum_{h=1}^N h^2 * P(h, N) = Np(1 - p) + N^2p^2 \quad \text{Equação D5}$$

A espessura da interface consiste na dispersão da altura, podendo ser calculada a partir do primeiro e segundo momento.

$$w^2(t) \equiv \langle (h - \langle h \rangle)^2 \rangle = \langle h^2 \rangle - \langle h \rangle^2 = Np(1 - p) = \frac{N}{L} \left(1 - \frac{1}{L} \right) \quad \text{Equação D6}$$

Assim,

$$w^2(t) \sim t$$

$$w(t) \sim t^{1/2}$$

E, portanto, o expoente de crescimento para a deposição randômica pôde ser teoricamente estimado a partir do modelo discreto que descreve a altura e espessura das camadas obtidas.