



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

JOÃO BATISTA MAIA ROCHA NETO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES FINOS FUNCIONAIS VIA TÉCNICA DE
LAYER-BY-LAYER VISANDO CAPTURA SELETIVA DE CÉLULAS TUMORAIS**

**DEVELOPMENT OF THIN FUNCTIONAL FILMS VIA LAYER-BY-LAYER
TECHNIQUE AIMING SELECTIVE CAPTURE OF TUMOR CELLS**

Campinas
2016

JOÃO BATISTA MAIA ROCHA NETO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES FINOS FUNCIONAIS VIA TÉCNICA DE
LAYER-BY-LAYER VISANDO CAPTURA SELETIVA DE CÉLULAS TUMORAIS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JOÃO
BATISTA MAIA ROCHA NETO, E
ORIENTADA PELA PROF^a DR^a MARISA
MASUMI BEPPU

CAMPINAS

2016

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

R582d Rocha Neto, João Batista Maia, 1991-
Desenvolvimento de filmes finos funcionais via técnica de *layer-by-layer* visando captura seletiva de células tumorais / João Batista Maia Rocha Neto. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Adesão celular. 2. Filmes multicamadas. 3. Ácido hialurônico. 4. 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: Development of functional thin films via layer-by-layer technique aiming selective capture of tumor cells

Palavras-chave em inglês:

Cell adhesion

Multilayers films

Hyaluronic acid

Chitosan

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Edvaldo Sabadini

Cristina Pontes Vicente

Data de defesa: 28-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado defendida por João Batista Maia Rocha Neto e aprovada em 28 de Julho 2016 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Marisa Masumi Beppu

Prof. Dr. Edvaldo Sabadini

Prof. Dr. Cristina Pontes Vicente

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no Processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu a oportunidade e os olhos para enxergá-la, assim como a força para me fazer seguir firme e sempre em frente.

À minha mãe Guacira Maia, que a cada dia compra comigo esse sonho, que acredita, até mais do que eu, em minha vitória. À minha avó Dalvanira Maia, pela inspiração e amor incondicional que recarregam minhas energias. Ao meu pai José Loureiro, por me fazer perceber a simplicidade da vida. À minha família que me incentiva e torce por minhas conquistas.

À Profa. Dra. Marisa Beppu pela orientação profissional e pessoal durante meu mestrado e por confiar a mim este projeto de pesquisa. À Dra. Roberta Polak pela co-orientação e ajuda neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hernandes Carvalho pela acolhida e parceria em seu grupo de pesquisa no Instituto de Biologia. Aos seus alunos Guilherme e Dra. Juliana Godoy pela grande assistência e atenção. Em especial, à Dra. Silvia Pimentel por todo o conhecimento a mim transmitido durante esse último ano.

Aos Professores Dr. Edvaldo Sabadini, Dra. Cristina Pontes Vicente e Dra. Lucimara Gaziola pelas colaborações dadas nas etapas de qualificação e defesa desta dissertação. Foram de imenso valor para esta versão final.

Aos meus amigos Andrea, Ivan, Laise, Raquele e Semiramis por todo o companheirismo e parceria. Aos Feqfriends André, Camila, Igor, Letícia, Mariana, Marina e Olívia, vocês são a família que Campinas me deu. Em especial, à Thatianne Caminha, que embarcou comigo nessa viagem e tem estado sempre ao meu lado lembrando-me de quais são meus verdadeiros objetivos.

Ao Bruno Cunha, Cynthia Mahl, Giovana Genevro e Luciana Guedes, integrantes do LEQUIP, pelo ambiente profissional, colaborativo e fraterno construído. Em especial, ao Thiago Taketa e Rogério Bataglioli pela ajuda técnica e amizade construída ao longo da realização deste trabalho.

Aos funcionários da FEQ, ao LRAC, LAMULT, CMSE (*Center for Material Science and Engineering*) do MIT, CAPES, Fapesp por todo suporte técnico e/ou financeiro fornecido para a realização deste trabalho.

Por fim, a todos os corajosos que deixaram a vida que tinham para voar para vidas que decidiram encarar de peito aberto. O preço é alto, mas sempre estaremos livres do medo de não ter tentado.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles).

RESUMO

A imobilização de células sobre superfícies constitui um grande interesse para diversas áreas, tais como bioengenharia, imunologia, engenharia tecidual e biomedicina. A técnica *Layer-by-Layer* (LbL) vem ganhando destaque, uma vez que possibilita a formação de filmes de multicamadas de polieletrólitos (PEMs), um grupo versátil e de grande aplicabilidade. Trata-se de uma deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas em uma superfície. O uso de polímeros naturais confere uma série de vantagens, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Quitosana (CHI) e ácido hialurônico (HA) são polieletrólitos naturais e comumente associados para formação de PEMs. Trabalhos anteriores demonstraram a elevada afinidade do HA com os receptores CD44, presentes na superfície de algumas células. Estudos mostram que vários tipos de câncer exibem níveis elevados de HA, sendo este utilizado para a avaliação das interações celulares que estão associadas à progressão do câncer. O câncer de próstata (CaP) é um tumor de crescimento lento, tendo no diagnóstico precoce a maior chance de controle e cura da doença. Neste projeto, estudou-se a seletividade de PEMs de HA/CHI quanto à sua capacidade de capturar células prostáticas tumorais (LNCaP, DU-145 e PC3) e não-tumoral (RWPE-1). Força iônica, pH, grau de acetilação da quitosana e número de bicamadas depositadas foram os fatores estudados na alteração das características da superfície, composição e caráter seletivo de captura celular das PEMs. Em uma hora de incubação, apenas a linhagem tumoral PC3 alcançou valores significativos de adesão celular, apontando os filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM e (HA5/CHI5)_{3,5} 100mM como a otimização das variáveis de preparação. A reduzida adesão da linhagem PC3 nos controles utilizados (filmes de ALG/CHI, tratamento das células com hialuronidase e anticorpo específico para CD44) destacou a atuação do HA como mediador direto no processo de adesão célula-filme. Assim, é possível verificar a potencial aplicação destes filmes como plataformas para a captura seletiva de linhagens tumorais, sendo a exploração da interação CD44-hialuronato passível de aplicações biotecnológicas diversas.

Palavras-chave: Adesão celular; Filmes multicamadas; CD44; Ácido hialurônico; Quitosana.

ABSTRACT

The immobilization of cells on surfaces is a great interest to many fields such as bioengineering, immunology, tissue engineering and biomedicine. The Layer- by-Layer technique (LbL) has been gaining attention because it enables the formation of polyelectrolyte multilayers (PEMs), a versatile group with a wide range of application. It is an alternating deposition of oppositely charged polyelectrolytes on a surface. The use of natural polymers confers a number of advantages such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. Chitosan (CHI) and hyaluronic acid (HA) are natural polyelectrolytes and commonly associated to the build up of PEMs. Previous works have demonstrated the high affinity of HA with CD44 receptors which are present on the extracellular surface of certain cells. Studies show that various cancers exhibit high levels of HA, which is used for the assessment of cellular interactions that are associated with cancer progression. Prostate cancer is a slow-growing tumor and the early diagnosis increases the chance of control and cure of the disease. In this work, we studied the selectivity of HA/CHI PEMs for their ability to capture prostatic tumor cells (LNCaP, PC3 and DU-145) and non- tumor cells (RWPE-1). Changes on the surface, composition and selective character of cell capture of the PEMs were promoted by altering the ionic strength, pH, degree of acetylation of chitosan and number of deposited layers. Only tumor line PC3 achieved significant values of cell adhesion, indicating the films (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM and (HA5/CHI5)_{3,5} 100 mM as the optimization of preparation variables. Reduced adhesion of the PC3 line used in controls (ALG/CHI films, treatment of cells with hyaluronidase and antibody specific for CD44) highlighted the HA's role as a direct mediator in cell-film adhesion process. The CD44-hyaluronate interaction can be explored for several biotechnological applications and it is possible to verify the potential application of these films as platforms for the selective capture of tumor cell lines.

Keywords: Cell adhesion; Films multilayers; CD44; Hyaluronic acid; Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas envolvidas durante processo de <i>Layer-by-Layer</i>	19
Figura 2 - Estrutura química da quitosana	23
Figura 3 - Estrutura química do ácido hialurônico	26
Figura 4 - Estrutura química do alginato de sódio	27
Figura 5 - Esquema da ligação iônica entre CHI ($pK_b = 6,0$) e HA ($pK_a = 2,9$) em (A) pH 3; (B) pH 5,0	29
Figura 6 - Representação da interação entre o receptor extracelular CD44 e o ácido hialurônico de filmes (HAX/CHIY) _n	32
Figura 7- Representação da superfície do substrato de vidro	35
Figura 8 - Esquema de funcionamento da <i>LbL Nanostructure Pro</i>	37
Figura 9 – Esquema dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente.....	40
Figura 10 - Estrutura química do azul de alciano	41
Figura 11 - Estrutura química do rosa de bengala	42
Figura 12 - Representação das etapas do processo de adesão celular.....	46
Figura 13 - Rugosidade média quadrática de filmes de (HAX/CHIY) _n em diferentes condições de pH, força iônica e número de bicamadas	48
Figura 14 - Imagens de AFM (5 μ m x 5 μ m) dos filmes (a) (HA3/CHI3) ₃ 0 mM NaCl, (b) (HA3/CHI3) _{3,5} 0 mM NaCl, (c) (HA3/CHI3) ₃ 100 mM NaCl e (d) (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM NaCl	49
Figura 15 - Imagens de AFM (5 μ m x 5 μ m) dos filmes (e) (HA5/CHI5) ₃ 0 Mm NaCl, (f) (HA5/CHI5) _{3,5} 0 mM NaCl, (g) (HA5/CHI5) ₃ 100 mM NaCl e (h) (HA5/CHI5) _{3,5} 100 mM NaCl	50
Figura 16 - Micrografia do substrato de vidro sem nenhum recobrimento	53
Figura 17 - Tingimento de PEMs de HA/CHI com corantes azul de alciano (AA) e rosa de bengala (RB)	55
Figura 18 - Absorbância do corante azul de alciano para filmes de (a) (HA3/CHI3) _n 0 e 100 mM e (b) (HA5/CHI5) _n 0 e 100 mM, onde n assume os valores 3 e 3,5	56
Figura 19 - Absorbância do corante rosa de bengala para filmes de (a) (HA3/CHI3) 0 e 100 mM e (b) (HA5/CHI5) 0 e 100 mM, onde n assume os valores 3 e 3,5	56
Figura 20 - Absorbância dos corantes (a) rosa de bengala e (b) azul de alciano para PEMs de ácido hialurônico e quitosanas controladas	60
Figura 21 - Valores de rugosidade média quadrática para filmes de (HA/CHIX _y) _{3,5} , onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI	62
Figura 22 - Imagens de AFM (5 μ m x 5 μ m) de filmes com 3.5 bicamadas de (a) (HA/CHI37) em pH 3 (b) (HA3/CHI37) em pH 5, (c) (HA/CHI20) em pH 3 e (d) (HA3/CHI20) em pH 5	64
Figura 23 - Espectros de XPS do C 1s para os filmes de (HA/CHIX _y) _{3,5} , onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI	65
Figura 24 - Concentração atômica do carbono para filmes de (HA/CHIX _y) _{3,5} , onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI	66

Figura 25 - Espectro de XPS de N 1s para os filmes de (HA/CHIX _y) _{3,5} , onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI.....	67
Figura 26 - Concentração atômica de nitrogênio em filmes de (HA/CHIX _y) _{3,5} , onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI	68
Figura 27 - Incubação das células nos substratos acomodados em placa de cultura de 6 poços.....	70
Figura 28- Razão de adesão das linhagens LNCaP, DU-145 e PC3 em filmes (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM.....	70
Figura 29 - Adesão celular da linhagem PC3 em PEMs de HA/CHI construídas em diferentes condições de pH (3 e 5), força iônica (0 e 100 Mm) e número de bicamadas (3 e 3.5).....	72
Figura 30 - Agregação célula-célula em (A) baixos níveis de HA, (B) tratada com hialuronidase e (C) altos níveis de HA Fonte: Adaptada de HAY (1991).	74
Figura 31 - Micrografias de adesão da linhagem PC3 em (a) (HA3/CHI3) _{3,5} 0 mM, (b) (HA3/CHI3) ₃ 0mM, (c) (HA3/CHI3) _{3,5} 100mM e (d) (HA3/CHI3) ₃ 100 mM.....	76
Figura 32 - Micrografias de adesão da linhagem PC3 em (a) (HA5/CHI5) _{3,5} 0Mm, (b) (HA5/CHI5) ₃ 0mM, (c) (HA5/CHI5) _{3,5} 100mM e (d) (HA5/CHI5) ₃ 100mM	77
Figura 33 - Adesão celular das linhagens DU-145, LNCaP, RWPE-1 e PC3 em filmes (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM e em lâminas de vidro sem recobrimento (controle), onde a barra representa o erro padrão em torno da média.....	78
Figura 34 - Porcentagem de CD44 nas linhagens LNCaP, DU-145, PC3 e RWPE-1 nas condições de ausência e tratamento com hialuronidase	80
Figura 35 - Resultado da adesão da linhagem PC3 tratada e não tratada com hialuronidase em filmes de (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM e (HA5/CHI5) _{3,5} 100 mM	82
Figura 36 - Ação da hialuronidase na superfície extracelular da linhagem PC3	83
Figura 37 - Adesão celular da linhagem PC3 sem tratamento e marcadas com anti-CD44 em filmes (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM	83
Figura 38 - Ilustração da ação do anticorpo anti-CD44 na superfície extracelular	84
Figura 39 - Adesão celular da linhagem PC3 em filmes (HA3/CHI3) _{3,5} 100 mM e (ALG3/CHI3) _{3,5} 100 mM	85
Figura 40 - Micrografias de adesão celular da linhagem PC3 (a) sem tratamento em PEMs de (HA3/CHI3) _{3,5} 100mM (b) sem tratamento em PEMs de (ALG3/CHI3) _{3,5} 100mM e (c) marcada com anti-CD44 em PEMs de (HA3/CHI3) _{3,5} 100mM	86
Figura 41 - Adesão celular da linhagem PC3 em filmes de (HA/CHIX) _{3,5} , onde X é o grau de acetilação da quitosana.....	87
Figura 42 - Micrografias da adesão da linhagem PC3 em filmes (a) (HA/CHI37) _{3,5} (b) (HA/CHI37) _{5,3,5} (c) (HA/CHI20) _{3,5} e (d) (HA/CHI20) _{5,3,5}	89
Figura 43 - MEV da superfície do filme (HA3/CHI3) _{3,5} 100Mm.....	106
Figura 44 - MEV da seção transversal dos filmes (a) (HA3/CHI3) _{3,5} 100mM e (b) (HA5/CHI5) _{3,5} 100mM.....	106
Figura 45 - Imagem de gota de 5uL depois de 10s em filme (a) (HA3/CHI3) ₃ 100mM e (b) (HA3/CHI3) _{3,5} 100mM.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de ionização dos polímeros CHI, HA e ALG segundo a equação de Henderson-Hasselbalch	29
Tabela 2 - Condições de pH (X e Y), força iônica (FI) e número de bicamadas (n) utilizados na fabricação de filmes de (HAX/CHI _Y) _n	37
Tabela 3 - Condições de pH e grau de acetilação (GA) da quitosana utilizados na construção de filmes de (HA/CHIX _Y) _{3,5}	38
Tabela 4 - Efeito das variáveis pH, Força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a rugosidade de filmes de HA/CHI	51
Tabela 5 - Efeito do pH e FI em filmes de 3,5 bicamadas (HA no topo) e 3 bicamadas (CHI no topo).....	52
Tabela 6 - Efeito do pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a incorporação do corantes azul de alciano para PEMs de HA/CHI	57
Tabela 7 - Efeito do pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a incorporação do corantes rosa de bengala para PEMs de HA/CHI.....	57
Tabela 8 - Efeito do pH e do Grau de acetilação (GA) sobre a incorporação do corantes azul de alciano e rosa de bengala para PEMsde HA/CHI	60
Tabela 9 - Efeito das variáveis pH e grau de acetilação sobre a rugosidade média quadrática de filmes (HA/CHIX _Y) _{3,5}	62
Tabela 10 - Influência dos fatores pH, iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a adesão celular da linhagem PC3.....	73
Tabela 11 - Influência dos fatores pH e grau de acetilação (GA) sobre a adesão da linhagem PC3.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
ALG	Alginato de sódio
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CaP	Câncer de próstata
CHI	Quitosana
DPBS	Tampão fosfato de Dulbecco-salino
EDS	Energia dispersiva de raio X
FCS	Soro Fetal Bovino
HA	Ácido Hialurônico
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
LEQUIP	Laboratório de Engenharia e Química de Produtos
LRAC	Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MM	Massa molecular
N₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão Fosfato-salino
PEI	Poli (etileno imina)
PEM	Multicamadas de Polieletrólitos
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de Dissociação do Ácido
pKb	Constante de Dissociação da Base
UV-Vis	Ultravioleta – Visível
XPS	Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-X

SUMÁRIO

RESUMO.....	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. <i>LAYER-BY-LAYER</i>	19
3.1.1. Parâmetros relevantes de LbL	21
3.1.2. Aplicações biotecnológicas de PEMs	22
3.2. BIOPOLÍMEROS.....	23
3.2.1. Quitosana (CHI)	23
3.2.2. Ácido Hialurônico (HA)	25
3.2.3 – Alginato de sódio (ALG).....	26
3.3. FILMES DE ÁCIDO HIALURÔNICO E QUITOSANA (HA/CHI) _n	27
3.4. FILMES DE ALGINATO DE SÓDIO E CHITOSANA (ALG/CHI) _n	30
3.5. INTERAÇÃO CD44-HIALURONATO	30
3.6. LINHAGENS CELULARES	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. MATERIAL	34
4.2. MÉTODOS	34
4.2.1. Preparo das soluções de polímeros	34
4.2.2. Preparo dos substratos	35
4.2.3. Obtenção das PEMs por <i>Layer-by-Layer</i>	36
4.2.4. Caracterização geral dos filmes.....	38
4.2.4.1. Perfilometria	38
4.2.4.2. Ângulo de contato.....	39
4.2.4.3. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	39

4.2.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
4.2.4.6. UV-VIS.....	41
4.2.4.7. Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-X (XPS).....	43
4.2.5. Cultura celular.....	43
4.2.6. Teste de adesão celular.....	44
4.2.6.1. Marcação com o anticorpo Anti-CD44.....	46
4.2.6.2. Tratamento com Hialuronidase.....	47
5. RESULTADOS	48
5.1. PEMs DE HA E CHI DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	48
5.1.1. Topografia.....	48
5.1. 2. Determinação dos grupos funcionais livres	54
5.2. PEMs DE HA E QUITOSANAS CONTROLADAS.....	59
5.2.1. Determinação dos grupos funcionais livres	59
5.2.2. Topografia dos filmes	61
5.2.3. Composição Química	65
5.3. ADESÃO CELULAR.....	69
5.3.1. Ensaios Preliminares	69
5.3.2. Avaliação dos fatores pH, FI e n na adesão celular.....	71
5.3.3. Avaliação da seletividade de filmes (HA3/CHI3) _{3.5} 100 mM para as linhagens PC3, DU-145, LNCaP e RWPE-1.....	77
5.3.4. Concentração de CD44 nas linhagens tumorais.....	80
5.3.5. Influência da hialuronidase na adesão celular	81
5.3.6. Influência do receptor CD44 na adesão celular	83
5.3.7. Influência do HA na adesão celular	84
5.3.8. Avaliação do pH e grau de acetilação na adesão celular	86
6. DISCUSSÃO GERAL	90
7. CONCLUSÃO.....	93
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS	106
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	106
ÂNGULO DE CONTATO	107

1. INTRODUÇÃO

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016 apontam o Câncer de Próstata (CaP) como o segundo tipo mais frequente de câncer entre os homens, atrás apenas do câncer de pulmão. O CaP é um tumor de crescimento lento, tendo, dessa forma, no diagnóstico precoce a maior chance de cura da doença. As ferramentas da nanotecnologia têm proporcionado o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, detecção e tratamento. No entanto, a busca por novos marcadores para o prognóstico dessa doença é um desafio.

Trabalhos anteriores demonstraram a elevada afinidade do hialuronato, em filmes de quitosana (CHI) e ácido hialurônico (HA), com os receptores CD44 na superfície de linfócitos B, células T e macrófagos (SWISTON *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). O CD44 é uma glicoproteína extracelular envolvida em múltiplos processos celulares entre eles a adesão celular, tendo como seu principal ligante o ácido hialurônico, sendo assim um importante elemento na interação entre célula-célula e célula-matriz (ZOLLER *et al.*, 2011). Outros trabalhos revelam ainda que vários tipos de câncer exibem níveis elevados de HA, sendo este utilizado para o estudo das interações celulares que estão associadas à progressão do câncer, incluindo a adesão celular, motilidade e diferenciação (ZOLLER *et al.*, 2011; TOOLE *et al.*, 2002; DICKINSON *et al.*, 2010).

A quitosana (CHI) é um polieletrólito catiônico natural bastante versátil, originada da hidrólise das amidas da quitina. Dependendo de como ocorre este processo, pode ter propriedades como massa molecular e grau de acetilação controladas (ROBERTS, 1992). A desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de alta intensidade, DAIUS, é uma recente alternativa de processo para controle destas propriedades (DELEZUK *et al.*, 2011). O ácido hialurônico (HA) é um polieletrólito negativo comumente associado à quitosana para a construção de filmes multicamadas de polieletrólitos (PEMs) (FENG *et al.*, 2005; CHUA *et al.*, 2008).

A técnica *Layer-by-Layer* (LbL) vem ganhando destaque, uma vez que possibilita a formação de filmes multicamadas de polieletrólitos (PEMs), um grupo versátil e de grande aplicabilidade. Com o uso da técnica, uma grande variedade de

materiais tem sido produzida com uma diversidade de aplicações. As aplicações médicas são muitas, como sistemas de liberação de fármacos, adesivos odontológicos e materiais de regeneração para tecidos (KOTZ, 1996).

Na técnica de LbL, a deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas é obtida pelo processo de adsorção destes em um dado substrato (SWISTON *et al.*, 2008). Polieletrólitos são polímeros com cargas positivas (polications) ou negativas (poliânions). Estudos sobre a preparação de PEMs têm crescido exponencialmente, focando, entretanto, na utilização de polímeros sintéticos. A utilização de polímeros naturais, por sua vez, apresenta uma série de vantagens na área de processos biotecnológicos, em virtude de suas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (ASSIS & SILVA, 2003).

Neste projeto de pesquisa, foi proposto o estudo da seletividade de PEMs de HA e CHI via LbL quanto sua capacidade de capturar células tumorais prostáticas (LNCaP, DU-145 e PC3) e não-tumoral (RWPE-1). O crescimento e a organização molecular desses filmes dependem de fatores como pH, força iônica e grau de acetilação das soluções poliméricas e o número de bicamadas de polieletrólitos depositadas. Estas variáveis foram modificadas a fim de investigar as suas relevâncias nas propriedades físicas e no potencial seletivo de captura celular destes filmes. Além disso, foram realizados ensaios com hialuronidase e anticorpo específico para o receptor CD44 a fim de investigar como se dá a relação de interação CD44-hialuronato na superfície extracelular e no processo de adesão celular em filmes de HA/CHI.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudo sobre a adesão de células tumorais em filmes finos LbL de quitosana e ácido hialurônico. A seletividade desta adesão viabiliza a captura seletiva de células para aplicações diversas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificação do potencial seletivo de filmes finos preparados com quitosana e ácido hialurônico via LbL na captura de células para aplicações diversas;
- Investigação dos fatores de formação de filmes de quitosana e ácido hialurônico de forma a otimizar a seletividade na captura de células;
- Caracterização geral dos filmes finos de multicamadas através das técnicas Espectroscopia de UV-Vis, Microscopia de Força atômica, Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios X, Ângulo de contato e Microscopia eletrônica de varredura;
- Investigação da interação CD44-Hialuronato através de testes de adesão celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. LAYER-BY-LAYER

A técnica de *Layer-by-Layer* (LbL), estudada inicialmente por Iler (ILER, 1966), consiste na deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas na superfície de um material, sólido ou colóide, promovendo a formação de filmes multicamadas de polieletrólitos (PEMs) (DECHER *et al.*, 1992; DECHER, 1997). Depositando uma camada molecular por vez, permite, dessa forma, que um grande número de materiais diferentes possa ser incorporado à estrutura do filme. A interação eletrostática é a principal força motriz responsável pela montagem LbL dos filmes ultrafinos (DECHER, 1997), como demonstrado na Figura 1, uma vez que existe o contato alternado de cargas opostas no substrato.

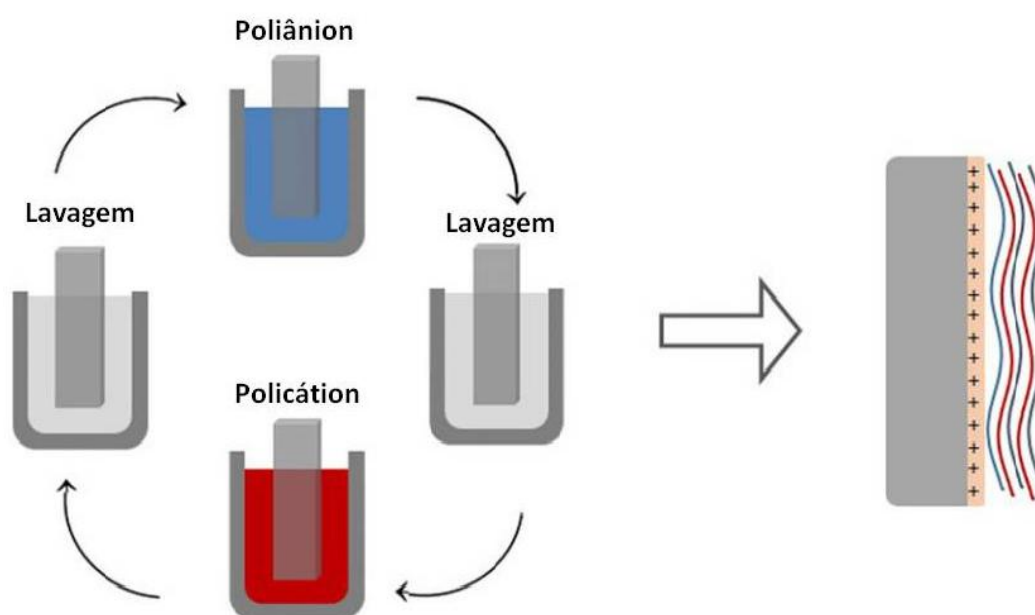


Figura 1- Etapas envolvidas durante processo de *Layer-by-Layer*

Fonte: Adaptado de Hernandez-Montelongo *et al.* (2016).

A priori, não há restrições quanto à morfologia e ao tamanho do substrato utilizado no processo de adsorção, já que os polímeros se encontram na forma de soluções diluídas, o que possibilita o recobrimento de uma infinidade de materiais (DECHER, 1997). Mostra-se como um processo prático de funcionalização, onde superfícies lisas ou estruturalmente mais elaboradas podem ser revestidas.

Trata-se de uma técnica de adsorção bastante versátil, cujo processo é fácil e de baixo custo, que possibilita a funcionalização de uma variedade de materiais (ARIGA *et al.*, 2007). Talvez sejam essas as principais vantagens atreladas à técnica LbL. A respeito de sua versatilidade, a técnica LbL é capaz de imprimir um controle rigoroso sobre a funcionalidade, composição e as propriedades dos filmes multicamadas (DECHER, 1997). Ajustando variáveis experimentais como pH, força iônica e concentração do polieletrólito, modificações em nível molecular do filme podem ser feitas, ajustando, dessa forma, propriedades como rugosidade, espessura e porosidade das PEMs (DUBAS & SCHLENOFF, 1999; SHIRATORI & RUBNER, 2000).

Cada ciclo de deposição polimérica produz uma estrutura complexa e interpenetrada referida como bicamada. A seguinte notação é comumente utilizada: **(Poli1X/Poli2Y)*n***. Poli1 e Poli2 referem-se à abreviação do nome de cada polímero utilizado, X e Y referem-se ao pH das soluções utilizadas durante a deposição das multicamadas, enquanto *n* refere-se ao número de bicamadas que foram depositadas (SWISTON *et al.*, 2008).

Este ciclo pode ser repetido tantas vezes quantas forem necessárias. Os mais diversos materiais ionicamente carregados podem ser combinados, tais como polieletrólitos, proteínas, DNA, nanopartículas e lipossomas (DECHER & SCHLENOFF, 2002).

As forças motrizes responsáveis pelo crescimento dos filmes não incluem apenas interações eletrostáticas, como já foi citado. Podemos também destacar forças não-eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio (STOCKTON & RUBNER, 1997; CLARK & HAMMOND, 2000; SUCH *et al.*, 2011), ligações covalentes (YAN *et al.*, 1999; HUCK *et al.*, 2000) e forças de Van der Waals para a formação de filmes multicamadas. Existe, assim, uma interação entre a última camada depositada e as camadas mais internas, gerando multicamadas interpenetradas e um complexo de polieletrólitos (YOO *et al.*, 1998).

Vários métodos de deposição já foram propostos para a confecção dos filmes, tais como: revestimento por deposição estática, revestimento por movimento rotativo e pulverização (BOUDOU *et al.*, 2010).

3.1.1. Parâmetros relevantes de LbL

Uma série de variáveis utilizadas durante a deposição via LbL exercem influência no controle das propriedades físicas dos filmes produzidos. São eles: concentração das soluções do biopolímero, tempos de adsorção, tempos de lavagens, umidade relativa do ar, força iônica, pH, temperatura, tipos de agitação durante a adsorção e lavagem, velocidade de imersão, entre outros (DECHER & SCHLENOFF, 2002).

A escolha do par de polieletrólitos é também uma variável importante, posto que, a partir de um certo número de bicamadas, a influência do substrato utilizado será pequena, tendo, neste caso, os polieletrólitos escolhidos potencial influência sobre as propriedades e estrutura da PEM produzida (DECHER, 1997).

As PEMs podem ser fabricadas a partir de polieletrólitos fortes, fracos ou uma combinação destes. A grande diferença entre PEMs formadas por polieletrólitos fortes e PEMs de polieletrólitos fracos reside no fato de que polieletrólitos fracos permitem que sua densidade de cargas, ao longo da cadeia polimérica, seja mais facilmente controlada com o do ajuste do pH (SHIRATORI & RUBNER, 2000). Assim, obtém-se um controle mais rígido sobre as propriedades físicas da estrutura polimérica quando se trabalha com polieletrólitos fracos, sendo possível ajustar espessura, conformação e densidade de carga linear (SHIRATORI & RUBNER, 2000).

A força iônica das soluções de polieletrólitos é um parâmetro diretamente relacionado com o controle da espessura das camadas depositadas. A variação da força iônica nessas soluções é obtida com a adição de um sal, como, por exemplo, o Cloreto de sódio (NaCl). Em trabalhos anteriores, verificou-se que o aumento da força iônica, dentro de limites estabelecidos, resulta no aumento da espessura do filme (DECHER & SCHMITT, 1992). Quanto às etapas de lavagem, a imersão de filmes em soluções de sal e, logo em seguida, de água pura consiste num mecanismo de abertura e fechamento das pontes salinas entre os íons presentes nas cadeias poliméricas dos poliânions e policátions (DUBAS & SCHLENOFF, 2001).

Em nível termodinâmico, é apontado, em estudos recentes, um ganho de entropia global em estudos mais recentes no processo de recobrimento via LbL em

virtude da liberação de contraíons, resultado da interação entre os poliânions e policátions. Este, inclusive, é indicado como sendo o fator mais importante para a formação das multicamadas (LAUGEL *et al.*, 2006).

3.1.2. Aplicações biotecnológicas de PEMs

A técnica LbL pode ser aplicada a superfícies de diferentes formatos e tipos, tais como microcápsulas, colóides ou células biológicas (DECHER & SCHLENOF, 2002). Em virtude da grande aplicabilidade nas áreas da medicina e biotecnologia, as interações de células com as superfícies das PEMs vêm sendo exponencialmente estudadas.

As funções naturais exercidas pelas células, entretanto, não devem ser alteradas quando em contato com outro sistema. Além disso, a endocitose de tais materiais pelas células deve ser muitas vezes evitada. Diversos trabalhos vêm demonstrando que esta propriedade está intimamente relacionada com o tamanho, forma, orientação e composição química da superfície apresentados por estes materiais (LIU *et al.*, 2012; DOSHI *et al.*, 2010).

A adsorção e/ou incorporação de fármacos em filmes ou cápsulas obtidos por LbL vem ganhando a atenção de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos. Isso porque a técnica empregada na construção de PEMs por LbL permite que uma grande variedade de materiais seja incorporado e então liberados de forma controlada (BOUDOU *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2007).

A entrega direcionada de fármacos no local desejado vem sendo bastante explorada, atualmente. As inovações proporcionadas pela nanotecnologia são, cada vez mais, utilizadas no tratamento de doenças. A funcionalização da superfície de células vivas com *patches* ou nanopartículas é um bom exemplo (DOSHI *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos vêm utilizando a técnica de encapsulação polimérica, por exemplo, como forma de conceder novas propriedades físico-químicas à superfície das células sem interferir na viabilidade celular (SVALDO-LANERO *et al.*, 2007; DIASPRO *et al.* 2002; HILLBERG *et al.*, 2006). Dessa forma, através do controle rigoroso das propriedades físico-químicas permitido pela técnica LbL com o ajuste de parâmetros como pH, força iônica e número de bicamadas depositadas, é

possível funcionalizar superfícies potencialmente aplicáveis a processos biotecnológicos.

3.2. BIOPOLÍMEROS

A seguir, estão apresentados os polímeros naturais utilizados nesse trabalho para a fabricação dos filmes multicamadas de polieletrólitos através da técnica de LbL: quitosana (CHI), ácido hialurônico (HA) e alginato de sódio (ALG).

3.2.1. Quitosana (CHI)

A quitosana (CHI) é um polímero obtido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente na carapaça de crustáceos e exoesqueletos de artrópodes, sendo um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza e comparável à celulose (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Por se tratar de um aminopolissacarídeo hidrofílico (ASSIS & SILVA, 2003), biodegradável, atóxico, biocompatível e altamente solúvel, seu uso vem sendo estudado em diversas áreas, como engenharia ambiental e biomédica (RINAUDO, 2006). Sua utilização no desenvolvimento de formulações e tratamentos terapêuticos tem sido explorada (ROBERTS, 1992).

A CHI é composta de unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina agregadas por ligações β -(1-4)-glicosídicas (SILVA *et al.*, 2006), como pode ser observado na Figura 2.

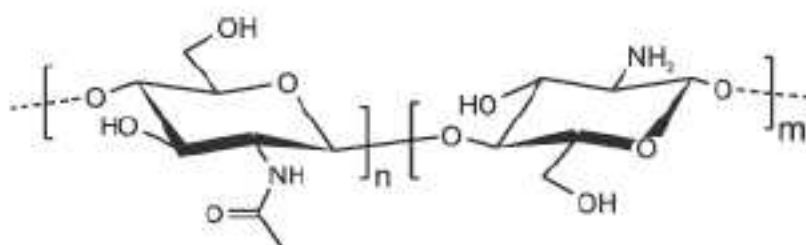


Figura 2 - Estrutura química da quitosana

Fonte: Adaptada de Silva *et al.* (2006).

Considerada como uma base fraca ($pK_a=6,3$), a quitosana torna-se solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos. Os ácidos mais utilizados costumam ser ácido acético e ácido clorídrico. Dessa forma, em meios ácidos ($pH < 6$), a maioria dos grupamentos aminos ($-NH_2$) encontram-se com carga positiva. No entanto, em valores de pH maiores do que 6,3, a quitosana torna-se um polímero insolúvel, uma vez que a dissociação dos grupos amônio ($-NH_3^+$) reduzem a quantidade de cargas positivas (YONG-WOO *et al.*, 2000). Assim, a insolubilidade é alcançada ao chegar-se próximo do valor de pK_a .

A solubilidade da quitosana é função do seu grau de desacetilação, ou seja, da quantidade de grupos ($-NH_3^+$) presentes nas cadeias. Quanto maior a repulsão eletrostática resultante de uma grande quantidade destes grupos, maior a solubilidade das cadeias. Dessa forma, pode-se afirmar que a solubilidade da quitosana está associada ao método de desacetilação pelo qual foi preparada (SIGNINI & CAMPANA-FILHO, 2000).

A presença de três tipos de grupos funcionais reativos, um grupamento amino, um grupo hidroxila primário e um grupo hidroxila secundário na estrutura da quitosana permite inúmeras possibilidades de modificação do biopolímero (RINAUDO, 2006; PILLAI & PAUL, 2009). Com isso, uma série de materiais de sustentação para a engenharia de tecidos, por exemplo, pode ser produzido. Alterações nas propriedades mecânicas e biológicas também são possíveis dadas as possibilidades de modificações covalentes e iônicas (RIVA *et al.*, 2011).

Além das propriedades já citadas, podemos destacar alta solubilidade, alta reatividade química, alta processabilidade, moldabilidade, assim como um potencial antimicrobiano (HERNADEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016; TAKETA, 2013; RINAUDO, 2006). A atividade antimicrobiana pode ser explicada através das interações entre os grupos amino que são carregados positivamente em meios ácidos e a membrana celular, por sua vez carregada negativamente, o que promove a ruptura e liberação de compostos intracelulares de microrganismos (FOUDA *et al.*, 2009).

A CHI apresenta-se de diversas formas quanto à origem, viscosidade, grau de acetilação, massa molecular. O grau de desacetilação (GD) da quitosana, ou seja, a porcentagem de grupos amino presentes, depende da quantidade de glicosamina na sua estrutura molecular. Logo, o procedimento de preparação, assim como a fonte

do biopolímero promovem uma variação na sua massa molecular (300 a 1000 kDa) e no GD (30 a 95%) (RINAUDO, 2006).

Juntamente com a massa molar média, o grau de desacetilação tem influência determinante nas propriedades da quitosana como, por exemplo, na sua solubilidade (SANTOS et al., 2003; SIGNINI & CAMPANA-FILHO, 2001). Pode-se relacionar, dessa forma, a solubilidade de diferentes quitosanas ao método utilizado para promover a sua desacetilação.

O processo de desacetilação da quitina pode ocorrer sob condições ácidas ou alcalinas, sendo mais comumente realizada na presença de bases. Uma vez que são muitas as condições influenciando o processo, a composição da quitosana é variável. O método mais usual de desacetilação da quitina utiliza o hidróxido de sódio como base em temperaturas muito altas durante várias horas (LAMARQUE & VITON, 2004). No entanto, este processo promove uma forte despolimerização da quitosana, gerando ainda produtos desacetilados heterogêneos. Vários estudos e metodologias propõem alternativas para este método. Nesse novo cenário, o processo de ultrassom de alta intensidade (DAIUS) tem sido bastante utilizado, apresentando como resultado quitosanas com elevadas massa molares ($M = 7 \times 10^5$ g/mol) e altos graus de desacetilação (GD >90.9%) (CAMPANA FILHO e SIGNINI, 2002; DELEZUK et al., 2011).

3.2.2. Ácido Hialurônico (HA)

O ácido hialurônico (ou hialuronato, HA) é um polissacarídeo extracelular abundantemente distribuído em tecidos conectivos de animais como componente principal no preenchimento entre células (LACPÍK *et al.*, 1998). Como pode ser visto na Figura 3, trata-se de um copolímero linear composto de ácido D- glicurônico e N-acetil-glicosamina. (KOGAN *et al.*, 2007; RINAUDO, 2008). O HA, isolado na forma de sal de sódio, utilizado neste projeto de pesquisa é proveniente de cepas da espécie *Streptococcus equi*.

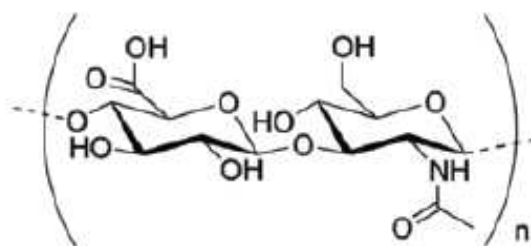


Figura 3 - Estrutura química do ácido hialurônico

Fonte: Adaptada de KOGAN *et al.* (2007)

Uma característica deste poliácido é o seu valor intrínseco de pKa ($\text{pKa} \sim 3,0$) que permite a formação de géis ou esponjas para aplicações biomédicas quando o pH da solução é diminuído, pela adição progressiva de HCl, em torno do $\text{pH} = 2,5$ (RINAUDO, 2008).

O HA é um polieletrólito negativo comumente associado à quitosana para a construção de membranas polieletrólíticas (VASCONCELLOS *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2005; CHUA *et al.*, 2008). Apresenta propriedades viscoelásticas e caráter semi-rígido, tendo sua biocompatibilidade como justificativa para o extensivo uso na área dos biomateriais (LAPIK, 1998; NECAS & BARTOSIKOVA, 2008). Na engenharia de tecidos, pode-se citar a criação de pele artificial, implantes, suplementação em doenças articulares, filmes e matrizes para regeneração tecidual, entre outras (RINAUDO, 2008).

3.2.3 – Alginato de sódio (ALG)

O alginato de sódio é um carboidrato hidrofílico extraído com álcali diluído a partir de várias espécies de algas do gênero *Phaeophyceae*. É composto por ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) ($\text{pka} = 4,0$) e ácido α -L-gulurônico (G) ($\text{pka} = 3,5$) (KING, 1983; MOE *et al.*, 1995). Estes monômeros encontram-se organizados em blocos ao longo da cadeia molecular compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) juntos com blocos de monômeros alternados (MG) na mesma molécula (SMIDSRØD, 1974). A Figura apresenta a estrutura química do Alginato de sódio. Fonte: Adaptada de TAO *et al.*, 2007

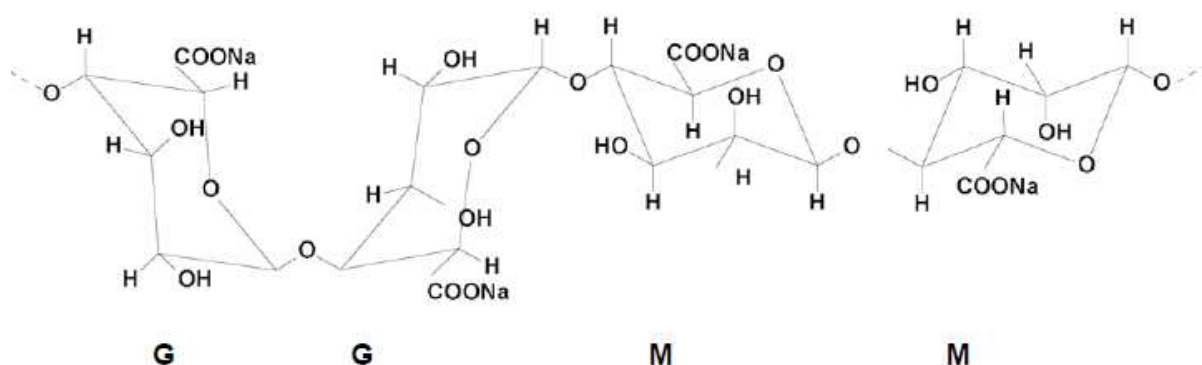


Figura 4 - Estrutura química do alginato de sódio

Fonte: Adaptada de TAO *et al.* (2007)

Possui em sua estrutura grupos carboxílicos em cada constituinte residual e várias habilidades funcionais. A propriedade mais utilizada é sua capacidade em reagir com cátions polivalentes a fim de produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (GRANT *et al.*, 1973). Tem sido associado com a quitosana (CHI) através da técnica *Layer-by-layer* para construção de filmes (YANG *et al.*, 2007; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Em virtude da sua biocompatibilidade, possui diversas aplicações biotecnológicas, tais como liberação de medicamentos e proteínas (GOMBOTZ & WEE, 1998; KNILL *et al.*, 2004).

3.3. FILMES DE ÁCIDO HIALURÔNICO E QUITOSANA (HA/CHI)_n

Os filmes multicamadas gerados pela deposição do par de biopolímeros quitosana e ácido hialurônico apresentam, como principais características, biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que justifica sua grande aplicação nas áreas biotecnológicas. Alguns estudos avaliaram o comportamento de adesão de células aderentes, como, por exemplo, osteoblastos e fibroblastos na superfície de filmes (CHI/HA)_n (RICHERT *et al.*, 2002, 2004 A, B; THIERRY *et al.*, 2003; CROLL *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2007 A,B,C; CHUA *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos investigaram a adesão de proteínas em filmes de (CHI/HA)_n. A adesão de proteínas pode resultar em respostas imunológicas e inflamações, mostrando-se bastante aplicável na área de engenharia tecidual e implantes. Filmes multicamadas PEMs de (CHI/HA)_n possuem elevada resistência à adesão de proteínas e, quando funcionalizados com biomoléculas, como o colágeno IV, atuam

no reconhecimento de superfície e adesão eficiente por fibroblastos (CROLL *et al.*, 2006).

PEMs de (HA/CHI)_n foram também construídos a fim de funcionalizar superfícies de vidro para aplicação antimicrobiana, através da modificação da densidade e mobilidade de cargas catiônicas, visando dificultar a adesão ou crescimento de micro-organismos (TAKETA, 2013; HERNANDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016). Filmes (HA/CHI) contendo íons Ag⁺ foram capazes de inibir o crescimento da cepa *Candida albicans* (TAKETA, 2013).

Têm sido também utilizados como recobrimentos de próteses dentárias e incorporação/liberação controlada de fármacos, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Estudos demonstraram que a reticulação dos filmes de CHI/HA aumentou a resistência à degradação de enzimas (lisozima e amilase) encontradas na saliva (ETIENNE *et al.*, 2005). PEMs de CHI/HA apresentam superfícies que podem significativamente resistir à adesão de proteínas presentes na saliva humana (BONGAERTS *et al.*, 2009). PEMs de CHI/HA podem ser usadas no recobrimento de substratos de polietileno tereftalato (PET) a fim de imobilizar tripsina e identificar proteínas mioglobina, citocromo c e albumina de soro bovino (LIU *et al.*, 2006).

Os polieletrólitos podem se comportar em solução como ácidos ou bases fracas. Dessa forma, o grau de ionização destes polieletrólitos pode ser favorecido ou não pelo pH do meio, dependendo da constante de dissociação (pK) do composto. Dessa forma, conhecer a constante de dissociação do ácido (pka) do ácido hialurônico e a constante de dissociação da base (pkb) da quitosana é necessário, dado que variado o pH, a interação eletrostática entre estes se dará de forma diferente na construção das bicamadas (DENUZIERE *et al.*, 1996; RINAUDO *et al.*, 1999; LA"PIK *et al.*, 1998; CLELAND *et al.*, 1982). A Figura 5 apresenta um esquema da variação da forma da ligação iônica em pH's diferentes.

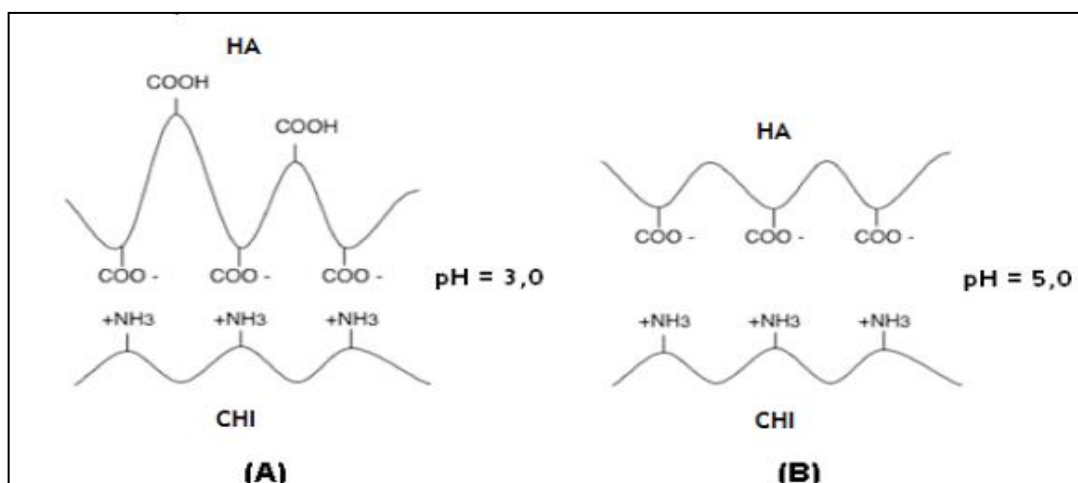


Figura 5 - Esquema da ligação iônica entre CHI ($pK_b = 6,0$) e HA ($pK_a = 2,9$) em (A) pH 3; (B) pH 5,0

Fonte: Tese Vasconcellos (2011).

A significativa diferença entre o grau de ionização da CHI e do HA em pH 3 aponta a necessidade da deposição de um grande número de cadeias de HA, que se encontra menos ionizado, a fim de estabelecer uma compensação das cargas positivas da CHI, que se encontra altamente protonada, promovendo a formação de filmes HA/CHI mais espessos (TAKETA, 2013). A Tabela 1 abaixo apresenta o grau de ionização dos polímeros CHI, HA e ALG nas faixas de pH avaliadas neste trabalho.

Tabela 1 - Grau de ionização dos polímeros CHI, HA e ALG segundo a equação de Henderson-Hasselbalch

	pH 3	pH 5
Quitosana (CHI)	99,90%	90,91%
Ácido Hialurônico (HA)	50,00%	99,01%
Alginato de sódio (ALG)	55,73%	99,21%

Na faixa de pH mais elevado, o alto grau de ionização de ambos os polímeros favorece a compensação de cargas, sugerindo a formação de filmes mais finos (TAKETA, 2013). Neste trabalho, a aplicação das PEMs de HA e CHI destina-se à formação de uma região adesiva em substratos de vidro para captura seletiva de células tumorais. Em sua fabricação via LbL, serão avaliados os fatores pH e força iônica das soluções de CHI e HA, o grau de acetilação da CHI e o número de bicamadas depositadas no substrato a fim de entender os efeitos e a relevância

destas variáveis nas propriedades físicas e no potencial seletivo de captura celular destes filmes.

3.4. FILMES DE ALGINATO DE SÓDIO E CHITOSANA (ALG/CHI)_n

As PEMs formadas por quitosana e alginato de sódio apresentam como propriedades boa estabilidade mecânica e biodegradabilidade (YANG *et al.*, 2007). Através do controle do pH, é possível controlar a compensação de cargas entre os polieletrólitos, como demonstrado para as PEMs de CHI e HA no tópico anterior. Estudos anteriores indicaram PEMs de ALG e CHI na funcionalização de membranas de acetato de celulose aplicadas para nanofiltração (LAJIMI *et al.*, 2004), na liberação controlada de fármacos (YE *et al.*, 2005), na produção de nanotubos biodegradáveis (YANG *et al.*, 2007) e encapsulação de células (HILLBERG *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009).

De acordo com a Tabela 1, percebe-se que o polímero alginato de sódio possui comportamento semelhante ao do HA quanto ao grau de ionização em solução nas faixas de pH's trabalhadas. Neste trabalho, a fabricação de PEMs de ALG e CHI foi utilizada como forma de controle e comparação às PEMs de HA/CHI quanto à adesão celular, já que HA e ALG são comumente associados à CHI e apresentam-se negativamente carregados de maneira semelhante em pH 3 e 5.

3.5. INTERAÇÃO CD44-HIALURONATO

O CD44 é uma glicoproteína extracelular que está associada a inúmeros processos celulares, tais como a adesão celular, apoptose, proliferação, migração celular (Zoller *et al.*, 2011). No processo de adesão celular, tem como seu principal ligante o ácido hialurônico (HA), sendo este um importante elemento na interação entre a célula-célula e célula-matriz (Zoller *et al.*, 2011). O HA é o principal componente na matriz extracelular dos tecidos de mamíferos que se acumula na divisão celular e no rápido modelamento da matriz, que ocorre durante a tumorigênese (Toole *et al.*, 2001).

O HA encontra-se amplamente presente e distribuído na matriz extracelular, sendo responsável por regular a migração de células nos tecidos durante a

morfogênese embrionária, cicatrização de feridas e endereçamento (*homing*) de leucócitos inflamatórios (TAMMI *et al.*, 2002; TOOLE *et al.*, 2002). A expressão do antígeno CD44 é relatada em células T, células B e em outros tipos de células positivas ao antígeno CD44, como, por exemplo, as células epiteliais, células gliais, fibroblastos e miócitos. O HA faz vários tipos de interações fracas com as células migratórias através da molécula CD44, um receptor de membrana expresso abundantemente nos leucócitos, entre outros tipos de células (PONTA *et al.*, 2003).

O receptor CD44 mostra-se como potencial marcador de agressividade de várias neoplasias (Zoller *et al.*, 2011). Variados tipos de tumores expressam isoformas de CD44 que têm sido associadas à progressão do câncer (Paradis *et al.*, 1998). No que se refere ao câncer de próstata, poucos estudos exploram o papel do CD44 (Iczkowski *et al.*, 2003), não sendo conhecido ainda seu comportamento.

As proteínas existentes nos receptores CD44 são encontradas em três estágios quanto à ligação com o HA: uma forma inativa, uma induzida por estímulos fisiológicos e outra ativa (Lesley *et al.*, 2000). A expressão ativa do CD44 tem sido associada à progressão tumoral em diversos carcinomas (Uhlsteid M *et al.*, 1995; Joensuu *et al.*, 1993). A expressão aumentada do antígeno CD44 é encontrada em alguns carcinomas e relata-se que a transição das linhas celulares de tumor de não metastáticas para metastáticas pode ser associada com mudanças na expressão das variantes do antígeno CD44 (Abbas & Lichtman).

A interação do CD44-hialuronato é dominada pela forma e complementaridade exibida pelas ligações de hidrogênio, envolvendo duas conformações possíveis do receptor (BANERJI *et al.*, 2007). A Figura 6 exhibe uma representação da ligação entre os receptores CD44 presentes na superfície das células e o HA presente na estrutura dos filmes de HA/CHI. Pode-se destacar ainda um efeito eletrostático nessa interação, uma vez que o HA possui carga negativa e o CD44, por sua vez, carga positiva.

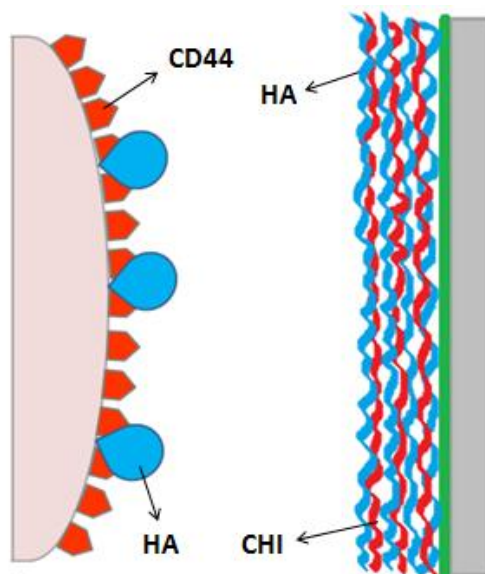


Figura 6 - Representação da interação entre o receptor extracelular CD44 e o ácido hialurônico de filmes (HAX/CHIY)_n

Estudos têm mostrado que vários tipos de câncer exibem níveis elevados de HA e que um aumento da quantidade de HA corresponde a um mau prognóstico do paciente. O HA tem sido implicado nas interações celulares que estão associados com a progressão do câncer, incluindo a adesão celular, motilidade e diferenciação (TOOLE *et al.*, 2002; DICKINSON *et al.*, 2010).

Por esse motivo, trabalhos recentes vêm fazendo uso de superfícies padronizadas de HA para estudos de adesão e isolamento de células tumorais. Estes estudos sugerem que diferentes linhagens de células respondem diferentemente às matrizes pré-moldadas de HA. Portanto, o desenvolvimento de tais plataformas contendo HA imobilizados podem fornecer ferramentas para a compreensão do papel de fatores exógenos de HA na progressão do câncer (SMULOVITZ *et al.*, 2013).

3.6. LINHAGENS CELULARES

Segundo dados da American Type Culture collection (ATCC), as células tumorais LNCaP são de origem epitelial retiradas do tecido da próstata, derivadas a partir do sítio metastático no osso. São células aderentes que apresentam crescimento em monocamada e muito lento. Além disso, não formam uma

monocamada uniforme, apresentando-se na forma de aglomerados frouxamente ligados.

A linhagem tumoral DU-145 também é de origem epitelial do tecido da próstata, derivada de sítio metastático no cérebro. A linhagem tumoral PC3 é também de origem epitelial do tecido prostático, derivada de sítio metastático no osso. A linhagem RWPE-1, por sua vez, é de origem epitelial prostática e não-tumoral. Todas as linhagens são de células aderentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: poli (etileno imina) (PEI, MM = 7.5 KDa, 50% (m/m) em solução aquosa), ácido hialurônico (HA, proveniente de *Streptococcus equi sp*), quitosana de baixo peso molecular (GD = 85%), corante Azul de alciano (MM = 1298,86 g/mol), corante Rosa de bengala (MM = 973,67 g/mol), quitosana de alta massa molecular (GD = 80% e 63%) obtidas pelo método DAIUS (DELEZUK *et al.*, 2011). Os reagentes citados são provenientes da empresa Sigma-Aldrich (USA). Estes e os demais reagentes são de grau analítico e foram utilizados sem prévias purificações. Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) são da marca Synth (Brasil).

As quitosanas controladas utilizadas neste trabalho foram produzidas a partir do processo de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação ultrassom de alta intensidade, DAIUS (DELEZUK *et al.*, 2011). Possuem massas molares médias em torno de 340KDa e valores de grau de desacetilação diferentes de 19,7% (CHI20) e 37,4% (CHI37). O grau de desacetilação médio foi determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e a massa molar média através de viscosimetria capilar.

As células prostáticas DU145, LNCaP, PC3 e RWPE1 são provenientes da ATCC (American Type Culture Collection, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo das soluções de polímeros

Soluções de PEI, HA e ALG foram preparadas na concentração de 0,1% (w/v) em água Milli-Q® 18.2 MΩ através da solubilização do polímero. As soluções de CHI, por sua vez, foram preparadas através da solubilização do biopolímero em solução 0,1 mol/L de ácido acético (HAc, 60,05 g/mol). O tempo médio de solubilização foi de 24 horas sob leve agitação mecânica.

O pH das soluções foi ajustado para $3,00 \pm 0,10$ ou $5,00 \pm 0,10$ com soluções de HCl 1 mol/L e NaOH 1 mol/L. Evitou-se o uso simultâneo das soluções de HCl e NaOH no ajuste do pH, já que a adição de íons Na^+ e Cl^- promoveria a alteração da força iônica da solução. A força iônica, por sua vez, foi ajustada com a adição ou não de NaCl (60 g/mol) numa concentração de 100mM.

4.2.2. Preparo dos substratos

Lâminas de vidro, com dimensões de 75x25 mm, foram lavadas em banho ultrassônico com uma solução de detergente durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com água Milli-Q® durante 5 minutos, ainda em banho ultrassônico. Posteriormente, foram secas com corrente de N_2 à temperatura ambiente e levadas para tratamento no plasma de O_2 a 100 mTorr (720V DC, 25 mA DC, 18W; Harrick plasma Cleaner, PDC-32G) durante 10 minutos.

Estas etapas são necessárias a fim de realizar a limpeza do substrato, removendo o material orgânico e minimizando as imperfeições dos slides de vidro. O tratamento em plasma de O_2 , em especial, favorece uma interação eletrostática mais forte entre o substrato e os polieletrólitos, uma vez que atua no aumento do número de grupos hidroxilas na superfície destes substratos (BUNKER *et al.*, 1988), conforme está representado na Figura 7.

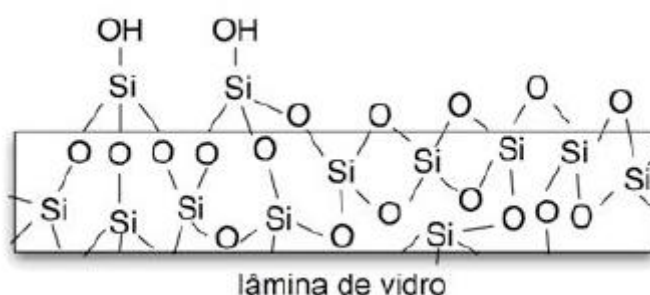


Figura 7- Representação da superfície do substrato de vidro

Fonte: Modificada de Tese Vasconcellos (2011)

4.2.3. Obtenção das PEMs por *Layer-by-Layer*

As PEMs foram produzidas por imersões alternadas das lâminas de vidro em soluções de polieletrólitos de cargas opostas durante 10 minutos (GILBERT *et al.*, 2013), intercaladas por três lavagens em água Milli-Q durante 2, 1 e 1 minuto(s), respectivamente. Essas etapas podem ser realizadas manual ou automaticamente. Neste trabalho, utilizou-se o equipamento automatizado *LbL Nanostructure Pro* (LEQUIP, UNICAMP) para realizar a deposição alternada de multicamadas de polieletrólitos. Através do software associado ao *LbL Nanostructure Pro*, pôde-se fixar os tempos de imersão nas soluções poliméricas, os tempos de lavagem, assim como o número desejado de ciclos.

Depois de adequadamente limpas, as lâminas puderam ser recobertas com o auxílio do equipamento. Primeiramente, uma pré-camada de PEI (concentração de 1% (w/v), pH 4,0 0,1 mol/L de NaCl) foi depositada com o objetivo de promover uma alta densidade de cargas sobre o substrato, favorecendo, dessa forma, uma maior homogeneidade na deposição dos biopolímeros CHI e HA. A pré-camada formada por um polieletrólito forte é capaz de recobrir todo o substrato, aumentando a sua densidade de cargas (JIN, 2009).

Em seguida, os polímeros HA e CHI, nessa ordem, foram depositados sobre a monocamada de PEI completando um número de 3 ou 3,5 bicamadas, onde uma bicamada corresponde a um ciclo completo de imersão formado por duas soluções de polieletrólitos e seis lavagens. Os filmes foram representados pela nomenclatura (HAX/CHIY)_n, onde X e Y representam o pH das soluções poliméricas e *n* significa o número de bicamadas. Dessa forma, filmes com 3,5 bicamadas apresentam HA como último polímero a ser depositado, enquanto filmes com 3 bicamadas têm a CHI no topo do filme.

Variando-se o pH e força iônica (FI) das soluções poliméricas, assim como o número de bicamadas (*n*), foram produzidos oito diferentes tipos de filmes, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de pH (X e Y), força iônica (FI) e número de bicamadas (n) utilizados na fabricação de filmes de (HAX/CHIY)_n

Filme	pH	FI	n
(HA3/CHI3) ₃ 0mM	3	0	3
(HA3/CHI3) ₃ 100mM	3	100	3
(HA5/CHI5) ₃ 0mM	5	0	3
(HA5/CHI5) ₃ 100mM	5	100	3
(HA3/CHI3) _{3,5} 0mM	3	0	3,5
(HA3/CHI3) _{3,5} 100mM	3	100	3,5
(HA5/CHI5) _{3,5} 0mM	5	0	3,5
(HA5/CHI5) _{3,5} 100mM	5	100	3,5

Todas as águas de lavagem tiveram seu pH ajustado ao valor do pH da solução polimérica a fim de evitar modificações estruturais no filme. Em condições normais, a água Milli-Q utilizada no laboratório (LEQUIP) registrava um pH = 7,2. Após as imersões, os filmes foram secos com corrente de N₂ à temperatura ambiente. Na Figura 8, tem-se uma representação esquemática das etapas e dos seus respectivos tempos para um ciclo completo no equipamento *LbL Nanostructure Pro*, ou seja, para a deposição de uma bicamada.



Figura 8 - Esquema de funcionamento da *LbL Nanostructure Pro*

Os filmes formados por ácido hialurônico e quitosanas com propriedades controladas seguiram o mesmo procedimento de formação via LbL. No entanto, foram representados pela nomenclatura $(\text{HA}/\text{CHIX}_Y)_{3,5}$, onde X é o grau de acetilação da quitosana, Y é o pH das soluções poliméricas e 3,5 é o número de bicamadas, conforme a Tabela 3. Para estes filmes, as soluções poliméricas não continham sal (FI = 0mM). Neste trabalho, também foram produzidos filmes de quitosana e alginato de sódio. O procedimento adotado foi o mesmo, apenas substituindo HA por ALG.

Tabela 3 - Condições de pH e grau de acetilação (GA) da quitosana utilizados na construção de filmes de $(\text{HA}/\text{CHIX}_Y)_{3,5}$

Filme	pH	GA
$(\text{HA}/\text{CHI}20_3)_{3,5}$	3	20%
$(\text{HA}/\text{CHI}37_3)_{3,5}$	3	37%
$(\text{HA}/\text{CHI}20_5)_{3,5}$	5	20%
$(\text{HA}/\text{CHI}37_5)_{3,5}$	5	37%

4.2.4. Caracterização geral dos filmes

Os filmes obtidos por *layer-by-layer* foram caracterizados utilizando-se as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (AFM), Perfilometria, Ângulo de contato, Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios X (XPS) e Espectroscopia de UV-vis. As medidas efetuadas para a caracterização dos filmes PEMs, através das técnicas citadas, incluem desde a caracterização visual e morfológica dos filmes produzidos, com a avaliação de parâmetros como espessura, rugosidade, hidrofiliabilidade dos filmes e quantificação de grupos funcionais livres dos biopolímeros utilizados.

4.2.4.1. Perfilometria

Visando determinar o perfil da superfície e a espessura dos filmes, foi utilizada a técnica de perfilometria. Estas medidas foram realizadas através do contato e deslizamento de uma ponta de diamante sobre a superfície do filme. O deslocamento horizontal da ponta sobre a superfície do material promove o

deslocamento também vertical do filme devido sua rugosidade. Dessa maneira, é impressa uma topografia do filme.

Para medir a espessura do filme, um corte é feito no material com o auxílio de uma lâmina. Em seguida, num intervalo de 30 segundos, a ponta de diamante do equipamento inicia uma varredura, percorrendo um comprimento de 500 μm sobre a superfície do material analisado, aplicando uma força de 10 μN sobre este. A fenda resultante do corte da lâmina é representada pelo software na forma de um degrau. Assim, a diferença vertical entre este degrau e a superfície representa a espessura do material analisado (YOO *et al.*, 1998). A técnica foi realizada no perfilômetro Dektak 150 (Veeco, USA) disponível no Laboratório de Multiusuários (LAMULT), no Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) da Unicamp.

4.2.4.2. Ângulo de contato

A fim de determinar o caráter hidrofílico da camada externa da superfície das PEMS, foram realizadas medidas do ângulo de contato. O procedimento consiste na aplicação de gotas de água Milli-Q® de 20 μL sobre as superfícies das PEMs e na leitura do ângulo de contato formado entre a gota e o filme depois de um tempo de 3 a 5 s (YOO *et al.*, 1998). Posteriormente, faz-se uso de uma câmera a fim de capturar imagens das gotas de água na superfície dos filmes. Um software associado ao equipamento fornece o valor do ângulo de contato. A técnica é realizada em condição ambiente. Foi utilizado o goniômetro Easy Drop DSA150 (Krüss, Alemanha) disponível no laboratório do Prof. Dr. Fernando Galembeck, no Instituto de Química da UNICAMP.

4.2.4.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A topografia da superfície dos filmes foi analisada com elevada resolução utilizando-se a técnica de microscopia de varrimento de sonda (SPM). O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento, gerando imagens tridimensionais. A Figura 9 exemplifica os modos de operação em AFM. As análises foram realizadas no modo de não contato, onde as superfícies dos filmes ficaram

expostas ao ar, evitando qualquer alteração da superfície do filme. A técnica foi realizada utilizando-se o microscópio de força atômica NanoSurf (NanoSurf, USA) disponível no Laboratório de Multiusuários (LAMULT), no Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) da UNICAMP. As análises para cada filme foram realizadas em triplicata, determinando-se a rugosidade média quadrática (rms) dos filmes e calculando-se uma medida de desvio padrão. As imagens da topografia dos filmes apresentadas nos tópicos 5.1 e 5.3.1 são aquelas que mais se aproximam da média de rms.

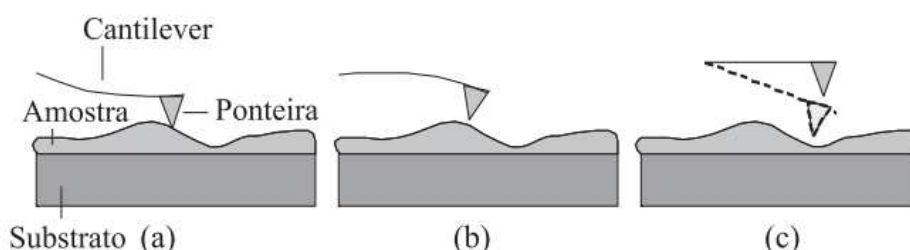


Figura 9 – Esquema dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente

Fonte: Ferreira (2006)

4.2.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de analisar a microestrutura do filme e prever algumas propriedades deste, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O MEV convencional é utilizado para análise de topografia e superfície. No entanto, por meio da integração de um Espectrômetro por energia dispersiva (EDS) ao MEV, é possível realizar uma microanálise elementar, identificando a composição química do material analisado.

As imagens de alta geradas em 3D, de alta resolução, com elevada profundidade de foco e de fácil interpretação auxiliarão na compreensão da microestrutura do filme polimérico, permitindo ampliações de até 300.000 vezes. Possibilitam, ainda, análises de superfície fraturada, análise de falhas, mapeamento químico de superfícies, avaliação do tamanho de partículas e porcentagem de fase em microestruturas.

O MEV foi realizado no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. O Microscópio Eletrônico de Varredura utilizado possui modelo Leo 440i com integrador de EDS de

modelo 6070, ambos da marca LEO ElectronMicroscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra).

4.2.4.6. UV-VIS

A fim de avaliar quantitativamente a presença de grupos funcionais aminos livres da quitosana e de grupos carboxílicos livres do ácido hialurônico nos filmes multicamadas, foram realizados tingimentos destes filmes com corantes específicos para os grupos funcionais. A utilização de corantes iônicos é largamente utilizada em filmes finos como forma de identificar os grupos funcionais disponíveis (CHUNG & RUBNER, 2002; LICHTER & VAN VLIET, 2009; YAMANLAR *et al.*, 2011).

Soluções de corantes iônicos rosa de bengala e azul de alciano foram utilizados a fim de analisar a localização dos terminais iônicos presentes nos filmes de polieletrólitos, bem como a homogeneidade estrutural dos mesmos. O corante azul de alciano, cujos picos de absorbância são observados no comprimento de onda de 617 nm, é um corante catiônico que tem a capacidade de se ligar a grupos livres de ácido carboxílico, ou seja, os grupos que não realizaram ligações iônicas com grupos amino presentes na quitosana. A Figura 10 abaixo apresenta a estrutura química do azul de alciano.

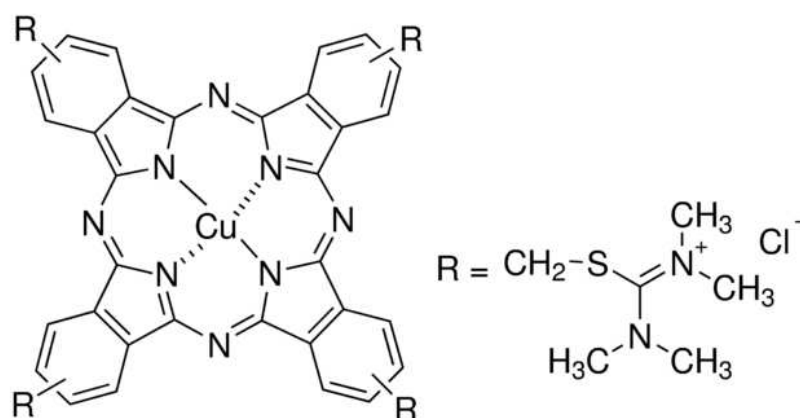


Figura 10 - Estrutura química do azul de alciano

A disponibilidade dos grupamentos iônicos amino presentes na quitosana, por sua vez, será determinada a partir da incorporação do corante rosa de bengala, cujo

pico de absorvência é observado no comprimento de onda de 567 nm. A estrutura do corante rosa de bengala é apresentada na Figura 11.

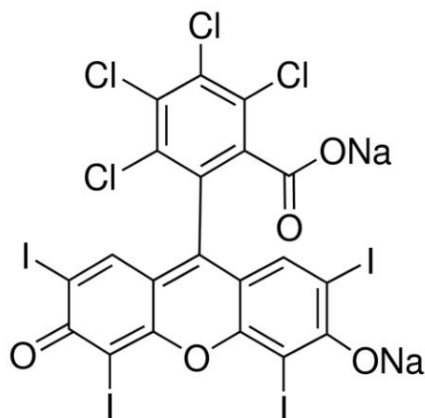


Figura 11 - Estrutura química do rosa de bengala

Estes corantes têm como características a capacidade de não deslocamento e não interação com os complexos polieletrólíticos formados, reagindo apenas com os grupos funcionais livre com os quais são específicos (YOO *et al.*, 1998; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). O preparo das soluções dos corantes iônicos, bem como sua incorporação, seguirá o procedimento descrito por Vasconcellos e colaboradores, 2010. Os corantes foram solubilizados em água Milli-Q® numa concentração de 0,001 M. A solução de azul de alciano teve seu pH ajustado para 3,0, enquanto a solução de rosa de bengala teve seu pH ajustado em 7,0. Os filmes foram imersos nas soluções de corantes por um tempo de 15 minutos. Supõe-se que este tempo seja suficiente para que a completa difusão do corante e estado de equilíbrio sejam alcançados. Segue-se, então, com duas lavagens consecutivas de 2 minutos em água Milli-Q® até retirar o excesso de corante das amostras. As águas de lavagem tiveram seu pH ajustado ao pH da solução de corante. Posteriormente, as PEMs foram secas em corrente de N₂ em temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram analisadas no Espectrofotômetro Ultravioleta-Visível (UV-Vis) de marca Shimadzu e modelo 1800, disponível no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. O modo de leitura foi realizado em absorvência, onde as medidas correspondem à absorção dos corantes pelos filmes depositados nas duas faces do

substrato. A faixa de varredura foi de 450-750nm. Todos os filmes foram preparados em duplicatas para cada corante e lidos apenas uma vez cada.

4.2.4.7. Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-X (XPS)

A técnica de Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios X (XPS) foi utilizada a fim de quantificar a composição química da superfície dos filmes multicamadas. Tem sido largamente utilizada para determinação de ligações químicas das superfícies e números de oxidação de elementos químicos presentes, através de medidas precisas das energias de pico dos foto-elétrons. A amostra é exposta a raios-X de baixa energia. A excitação induzida na amostra produz a emissão de foto-elétrons dos orbitais dos átomos da superfície, onde a energia desses elétrons é característica do elemento de onde são emitidos.

A análise foi realizada no MIT – Massachusetts Institute of Technology. Foi utilizado um espectrômetro de foto-elétrons de raios-x PHI VersaProbe II com uma varredura monocromática de Al (1,486.6 eV; 50 W; tamanho de ponto de 200 μm), varrendo uma área de amostra 200x700 μm , com uma energia passe de 117,4 eV e ângulo de decolagem de 45° para a varredura inicial de composição. A composição elementar foi determinada utilizando as áreas de pico obtidas por espectro de alta resolução e fatores de sensibilidade relativa fornecidos pelo programa PHI MULTIPAK (LEE *et al.*, 2015; GILBERT & RUBNER, 2013).

É, hoje, uma técnica bastante utilizada para medida de composição elementar de materiais isolantes (polímeros, por exemplo), medidas do crescimento e análise em profundidade de filmes finos (GILBERT *et al.*, 2013). As informações fornecidas por esta técnica podem ampliar a compreensão de como controlar a estrutura das PEMS, quais as alterações estruturais e de composição ocorrem entre as intercadas de difusão e como os polímeros se comportam na troca de deposição (GILBERT *et al.*, 2013).

4.2.5. Cultura celular

A etapa de cultura celular foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, no Instituto de Biologia da UNICAMP. Foram estudadas

neste trabalho as linhagens celulares de origem epitelial prostática tumorais (PC3, DU145 e LNCaP) e não tumoral (RWPE-1). Todas as linhagens foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, USA).

As linhagens tumorais DU-145 e LNCaP foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, enquanto a linhagem PC3 foi mantida em meio HAM F12 K, também suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

A linhagem RWPE-1 (não tumoral), por sua vez, foi mantida em meio Keratinocyte-SFM (1x) (Gibco, cat. No. 10724-011) e suplementado com 0,05 mg/mL de BPE (Extrato de Pituitária Bovina) e 5 mg/mL de EGF (Fator de Crescimento Epidermal) (Gibco, cat. No. 37000-015).

Todas as culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂ e observadas três vezes por semana com o auxílio de um microscópio ótico invertido a fim de verificar a morfologia e confluência celular. As trocas de meio celular se deram com lavagem delicada em meio DPBS Flush pH 7,0.

A etapa de subcultivo das células ocorreu uma vez por semana, com a ação de Tripsina, a fim de promover a liberação destas da superfície dos frascos de cultura celular. Um volume de 1 mL de tripsina 0,25%(v/v) foi utilizado para as linhagens tumorais, enquanto uma 1 mL de Tripsina 0,05%(v/v) foi utilizado para a linhagem não tumoral são utilizados para a liberação das células. Em seguida, as células são contadas em Câmara de Neubauer.

4.2.6. Teste de adesão celular

Após atingirem a primeira confluência, as células estão prontas para serem plaqueadas nos filmes. Dessa forma, suspensões de células foram suavemente pipetadas diretamente na superfície dos filmes de HA e CHI acomodados em placas de 6 poços. Em seguida, estas placas foram colocadas sobre uma plataforma vibratória dentro de uma incubadora. As amostras foram incubadas durante 15 minutos, seguida por uma agitação suave durante 15 minutos. Estas etapas foram repetidas duas vezes, totalizando um tempo de 1 hora de ensaio.

Vários tempos totais de ensaio, maiores e menores do que 1 hora, foram avaliados em experimentos preliminares. A fixação do tempo de 1 hora de ensaio se

deu por permitir a obtenção de uma diferença significativa de adesão celular entre os filmes LbL e seus controles. Os controles utilizados para esses testes foram lâminas de vidro sem nenhum recobrimento.

Logo após as etapas de incubação e agitação, os filmes foram lavados suavemente em tampão DPBS Flush pH 7,0 a fim de remover as células não ligadas. Talvez, esta etapa seja a que requer maior atenção, uma vez que uma lavagem mal realizada pode deslocar as células já aderidas.

As células aderidas, por sua vez, foram fixadas no filme utilizando uma solução de Paraformaldeído 2% (m/v) em PBS pH 7,4 durante 15 minutos. Uma segunda lavagem em DPBS Flush pH 7,4 foi realizada para remover esta solução. Posteriormente, os filmes foram deixados em meio PBS com detergente Tween-20 0,1% (v/v) durante 10 minutos. O detergente tem como função a permeabilização das células. Em seguida, as células foram marcadas com os corantes fluorescentes Faloidina e DAPI durante 30 minutos nas concentrações de 1:500 e 1:1000, respectivamente. A Faloidina tem por função marcar as fibras de actina que fazem parte do citoesqueleto da célula, enquanto o corante DAPI é uma droga que se liga fortemente na região A-T do DNA, demarcando o núcleo celular. Uma última lavagem foi realizada em PBS-T para retirar o excesso de corantes. A Figura 12 apresenta um resumo das etapas realizadas.

Os filmes foram analisados em um Microscópio Axio OBSERVER.z1 ZEISS. Foram retiradas quatro imagens de campos diferentes para cada filme. Cada imagem possui uma área de aproximadamente 15 mm^2 , enquanto o filme inteiro tem área de 625 mm^2 . As células foram contadas com o auxílio do *software* ImageJ.

É importante ressaltar que o número de células contido nas suspensões foi fixado em cada experimento e implementado nos ensaios de todas as linhagens celulares a fim de promover comparações posteriores, tanto nos filmes recobertos por LbL, quanto nos filmes sem recobrimento.

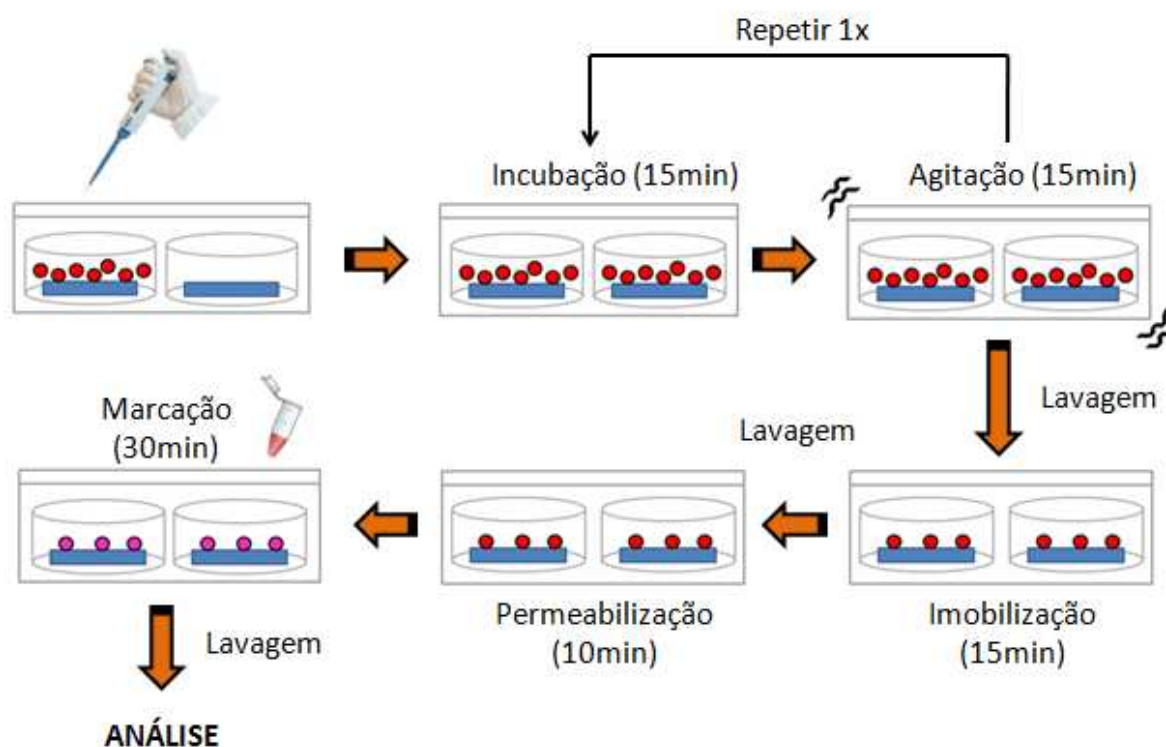


Figura 12 - Representação das etapas do processo de adesão celular

Fonte: Adaptada de Vasconcellos (2010)

4.2.6.1. Marcação com o anticorpo Anti-CD44

As linhagens celulares LNCaP, DU-145, PC3 e RWPE-1 foram marcadas com o anticorpo anti-CD44 FITC Mouse IgG1K conjugado com o marcador fluorescente PE (Ficoeritrina) a fim de quantificar a expressão do receptor CD44 através de uma citometria de fluxo. As células foram incubadas durante 1 hora com anti-CD44-PE numa concentração de 1:100. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão PBS. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 500 μL de meio completo e levadas para análise no citômetro de fluxo.

Foram também realizadas etapas de adesão celular, conforme descrito no tópico anterior 4.2.9, com a linhagem PC3 marcada com anti-CD44. Estes testes tiveram como objetivo a avaliação da influência do receptor CD44 na interação célula-filme. Na etapa de adesão celular sobre as PEMs de HA/CHI, foram pipetadas um total de $2,5 \times 10^5$ células em um volume de 0,5 mL de meio completo sobre cada filme utilizado.

4.2.6.2. Tratamento com Hialuronidase

As linhagens celulares LNCaP, DU-145, PC3 e RWPE-1 foram tratadas com hialuronidase numa concentração de 300 ug/mL durante 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma etapa de lavagem com 5 mL de tampão PBS. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e marcadas com o anticorpo anti-CD44 FITC Mouse IgG1K conjugado com o marcador fluorescente PE (Ficoeritrina) conforme está descrito no tópico 4.2.6.1. Esta citometria de fluxo, agora com células anteriormente tratadas com hialuronidase, teve como objetivo a análise da influência da enzima hialuronidase na disponibilidade de CD44 nestas linhagens celulares.

Além da etapa de citometria de fluxo, foram realizados testes de adesão celular com a linhagem PC3 tratada com hialuronidase a fim de investigar a atuação desta enzima no processo de adesão celular em filmes de HA/CHI. Nestes testes, foram pipetadas um total de $2,5 \times 10^4$ células num volume de 0,5 mL de meio completo sobre cada filme de HA/CHI.

5. RESULTADOS

Neste tópico, serão apresentados os resultados de caracterização das PEMs de HA e CHI de baixa e alta massa molecular, assim como seus desempenhos nos testes de adesão celular com células prostáticas tumorais e não-tumoral.

5.1. PEMs DE HA E CHI DE BAIXA MASSA MOLECULAR

5.1.1. Topografia

A topografia dos filmes de (HAX/CHIY)_n preparados nas condições de pH 3,0 ou 5,0, força iônica de 0 mM ou 100mM NaCl e, ainda, contendo 3 ou 3,5 bicamadas foi determinada através da técnica de Microscopia de Força atômica (AFM). Os valores de rugosidade média quadrática (rms), a obtenção das projeções das microscopias e o tratamento destas imagens foram obtidos pelo software Gwyddion®. As análises foram realizadas em filmes secos. A Figura 13 abaixo apresenta as medidas de rms dos filmes de (HAX/CHIY)_n em diferentes condições de força iônica (FI), pH e número de bicamadas (n).

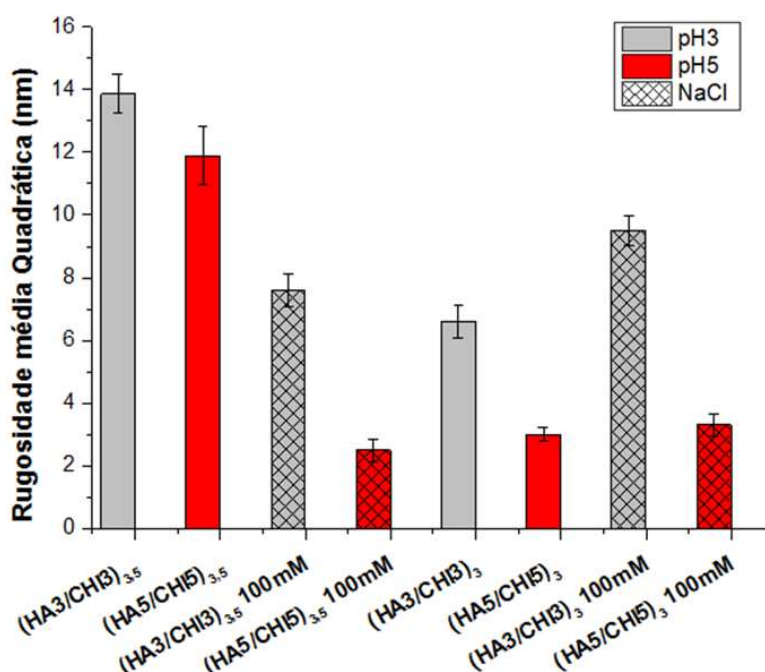


Figura 13 - Rugosidade média quadrática de filmes de (HAX/CHIY)_n em diferentes condições de pH, força iônica e número de bicamadas

As Figuras 14 e 15 apresentam as micrografias de AFM em 2D e 3D, onde as imagens exibidas são aquelas que mais se aproximam da média de rms. As médias de rms e desvios padrão em torno dessa média também são apresentados.

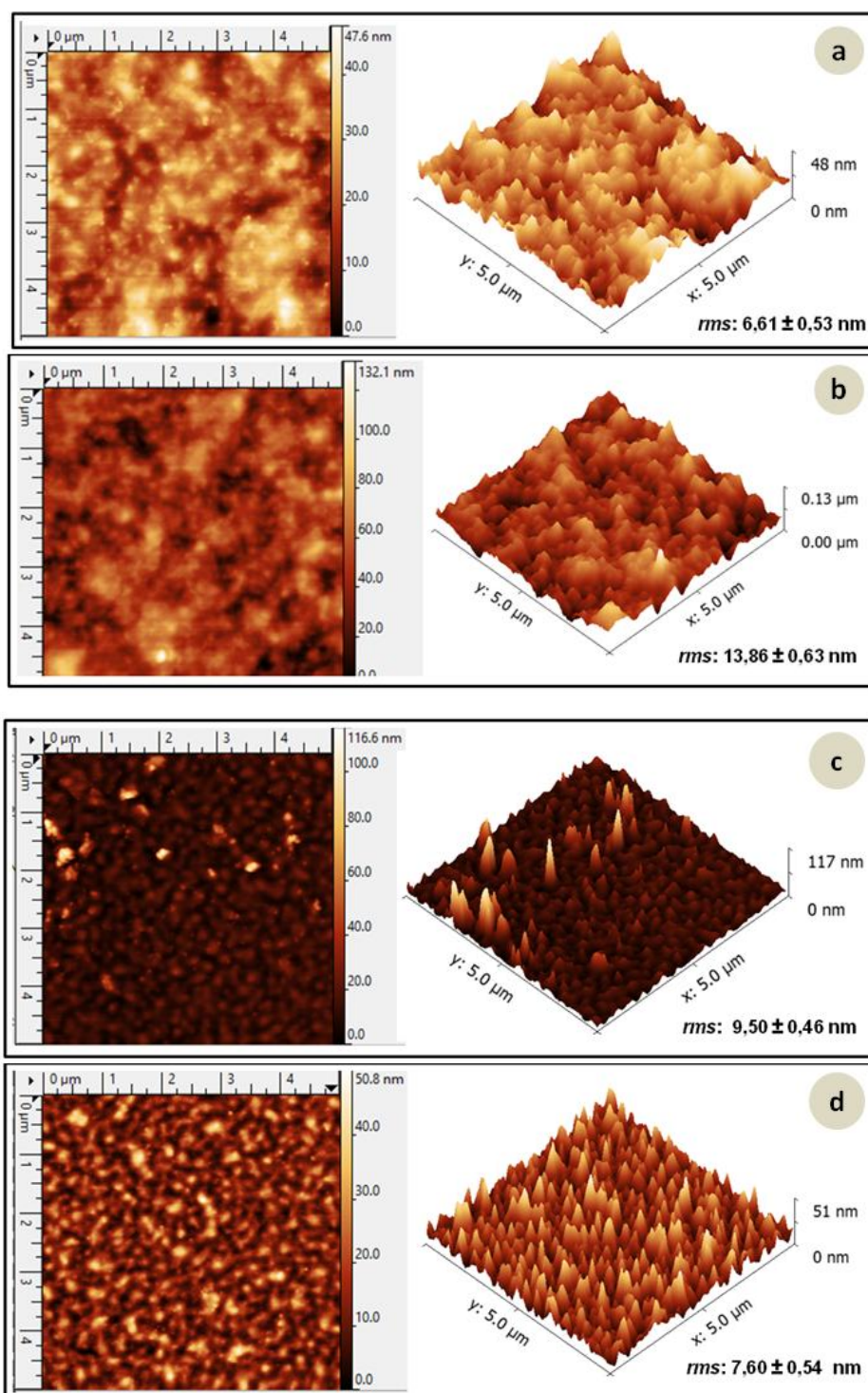


Figura 14 - Imagens de AFM (5 μm x 5 μm) dos filmes (a) $(\text{HA3/CHI3})_3$ 0 mM NaCl, (b) $(\text{HA3/CHI3})_{3,5}$ 0 mM NaCl, (c) $(\text{HA3/CHI3})_3$ 100 mM NaCl e (d) $(\text{HA3/CHI3})_{3,5}$ 100 mM NaCl

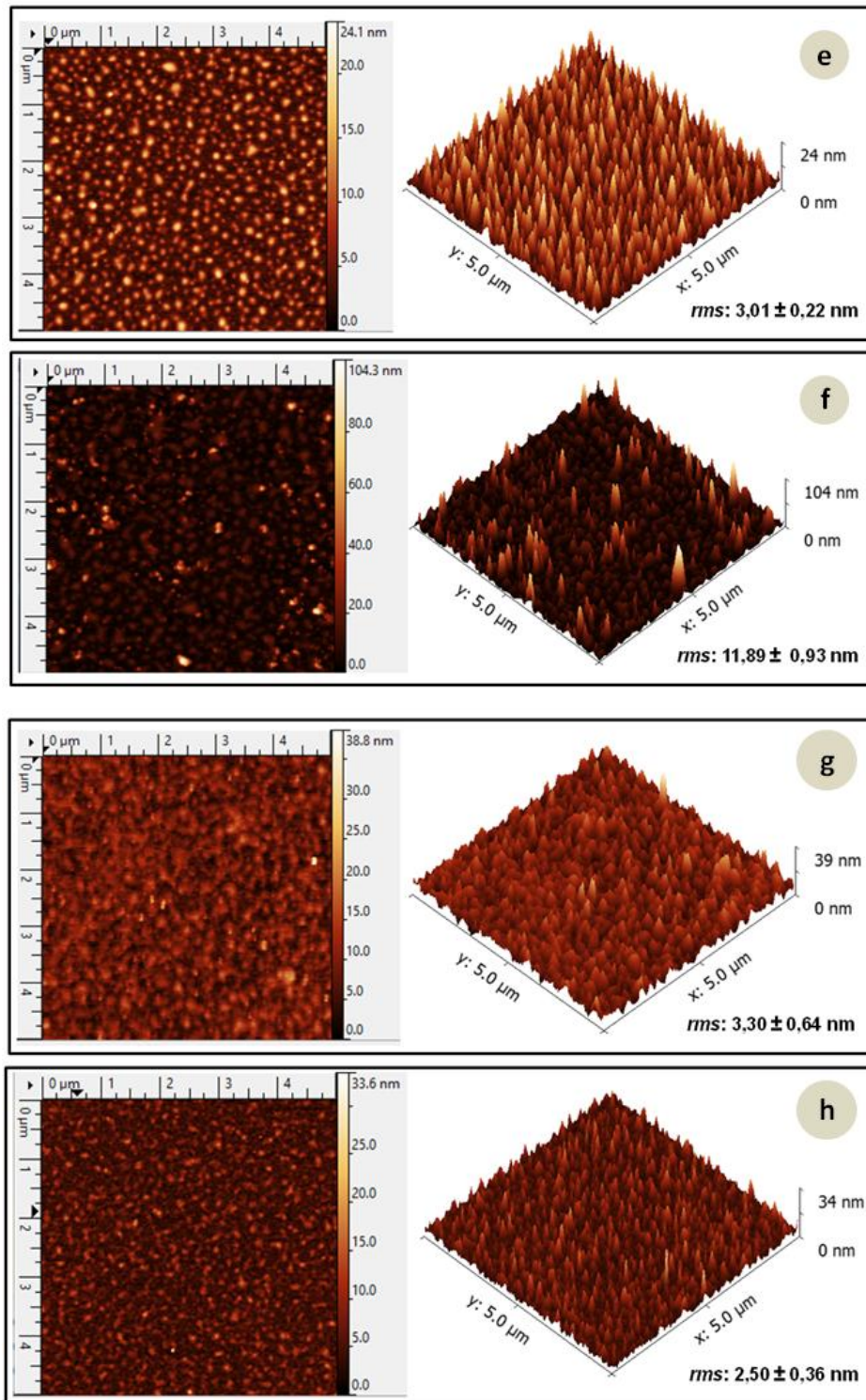


Figura 15 - Imagens de AFM (5 μm x 5 μm) dos filmes (e) (HA5/CHI5)₃ 0 mM NaCl, (f) (HA5/CHI5)_{3,5} 0 mM NaCl, (g) (HA5/CHI5)₃ 100 mM NaCl e (h) (HA5/CHI5)_{3,5} 100 mM NaCl

Analisando as micrografias, é possível observar que os polímeros são depositados em espécies de ilhas. O surgimento e crescimento dessas ilhas se dão devido às interações relacionadas com o excesso de compensação de carga entre CHI e HA (Richert *et al.*, 2004).

Uma análise dos efeitos do pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) foi realizada através de um Planejamento Fatorial (DOE) a fim de avaliar a influência desses fatores, individual e fatorialmente, na rugosidade média quadrática dos filmes. O resultado desta análise está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito das variáveis pH, Força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a rugosidade de filmes de HA/CHI

Fator	Efeito	p-valor
pH	-2,140	< 0,0001
FI	-1,590	< 0,0001
n	1,710	< 0,0001
pH*FI	-0,690	< 0,0001
pH*n	0,310	0,0076
FI*n	-2,380	< 0,0001
pH*FI*n	-0,037	0,7210

Consideradas estatisticamente significativas quando p assume valor menor do que 0,05, todas as variáveis, individualmente e suas interações dois a dois, mostraram-se significativas, exceto o cruzamento de pH, FI e n. Pode-se supor que a formação dos filmes preserve a conformação das cadeias destes polímeros em solução (LAVALLE *et al.*, 2002; FERY *et al.*, 2001), explicando possivelmente a influência dos fatores pH e FI na estrutura dos filmes.

Nestes filmes, observou-se que o aumento do pH promove uma diminuição da rugosidade média quadrática. É possível verificar que todos os filmes construídos em pH 3 são notadamente mais rugosos do que filmes construídos em pH 5. Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, o HA em solução encontra-se 50% ionizado em pH 3 e 99% ionizado em pH 5, enquanto a CHI apresenta-se 99% ionizada em pH 3 e 90% ionizada em pH 5. Assim, o pH atua diretamente no grau de ionização destes polímeros, uma vez que são polieletrólitos fracos. Dessa forma, as

cadeias destes polieletrólitos encontram-se mais carregadas em pH 5, promovendo a formação de estruturas multicamadas mais regulares e superfícies menos rugosas (ELZBIECIAK *et al.*, 2009).

O aumento da força iônica também aponta uma diminuição no valor de rms para os filmes estudados. A inclusão do número de bicamadas num planejamento fatorial 2^3 torna a análise generalista, uma vez que o efeito da FI é diferente entre filmes que contêm 3 bicamadas (CHI no topo) e 3,5 bicamadas (HA no topo), como apresentado na Tabela 5. Em filmes contendo CHI no topo, o aumento da FI aumenta a rugosidade dos filmes. Na ausência de sal, os segmentos dos polímeros em solução apresentam-se em conformações estendidas, resultante da repulsão entre cadeias de cargas iguais. No entanto, a adição de NaCl muda essa conformação, resultando numa configuração de espiral com a formação de loops que se assemelham a uma estrutura de bobina (BOHMER & EVERS, 1990), promovendo o aumento da rugosidade das PEMs.

Tabela 5 - Efeito do pH e FI em filmes de 3,5 bicamadas (HA no topo) e 3 bicamadas (CHI no topo)

Fator	3,5 bicamadas		3 bicamadas	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
pH	-3,5350	0,0000	-4,9000	0,0000
FI	-7,8250	0,0000	1,5933	0,0001
pH*FI	-1,5683	0,0031	-1,3000	0,0005

Em filmes com HA no topo, a tendência é contrária. Supõe-se que as cadeias de CHI podem estar difundindo de dentro dos filmes de HA/CHI, alcançando a superfície e formando complexos com os grupos de HA que não estão na interface das ilhas formadas pelos polímeros (RICHERT *et al.*, 2004). Essa complexação entre CHI e HA pode ser responsável pela diminuição da rugosidade apresentada por estes filmes. Vale ressaltar que o efeito combinado de pH*FI, independente do número de bicamadas, é significativo, enaltecendo-os como fatores-chave na modificação da topografia das PEMs de HA/CHI.

O aumento do número de bicamadas, por sua vez, promove um aumento na rugosidade dos filmes. Dessa forma, pode-se atribuir como causa a presença do HA no topo dos filmes e atribuir possivelmente este comportamento à maior cadeia molecular do HA. A combinação dois a dois dos fatores pH, FI e n tem efeitos relevantes na rms, uma vez que a modificação destas variáveis foi capaz de produzir filmes de diferentes perfis topográficos.

A Figura 16 apresenta a micrografia de AFM do vidro sem nenhum recobrimento, tratado segundo a metodologia de preparo dos substratos no tópico 2.1. Comparando-se com as micrografias das PEMs de biopolímeros, pode-se supor que a topografia do substrato não tenha afetado a topografia dos filmes, visto que em alguns filmes a rms obtida apresentou-se menor do que a rms do substrato. Dessa forma, pode-se atribuir a rugosidade obtida nas PEMs à complexação dos polieletrólitos e às condições na qual as PEMs foram formadas, tendo o substrato pouca influência no perfil topográfico.

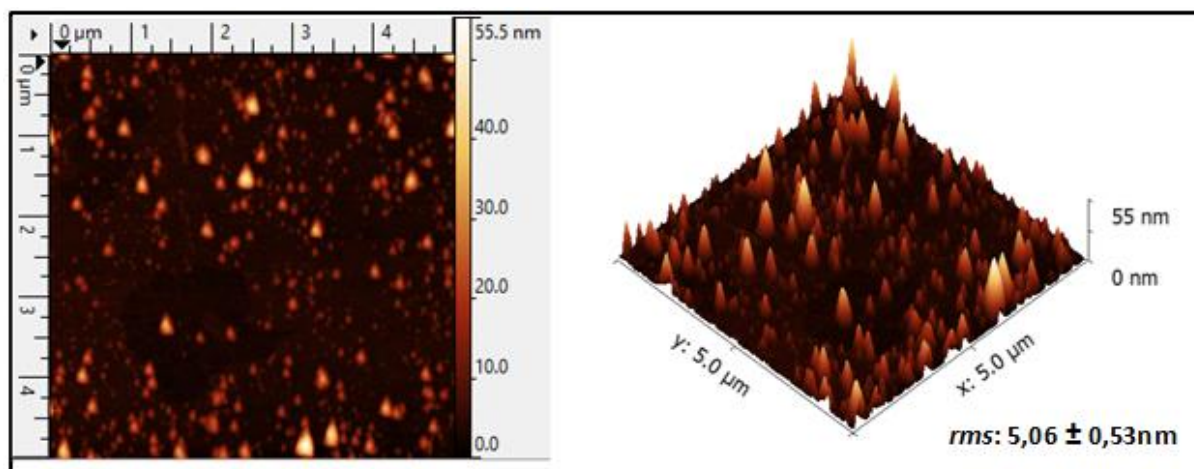


Figura 16 - Micrografia do substrato de vidro sem nenhum recobrimento

Análises de perfilometria também foram realizadas a fim de determinar a espessura dos filmes. No entanto, a ordem da espessura dos filmes HA/CHI encontrava-se no limite de detecção da máquina em virtude da baixa espessura, o que inviabilizou as medidas. Esperavam-se encontrar valores na ordem de 10-20 nm como apontam alguns estudos (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2016). A baixa espessura dos filmes sugere uma característica positiva para adesão de células, uma vez que a espessura destes filmes é comparável à espessura de filmes finos de

colágeno fabricados para diversas aplicações na área de engenharia tecidual (WANG *et al.*, 2016, FAUZI *et al.*, 2016).

A técnica de Microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada nos filmes em estudo na tentativa de determinar a espessura e a topografia dos filmes. No entanto, também não foi possível obter bons resultados em virtude da baixa espessura dos filmes. Os filmes também foram caracterizados através da técnica de Ângulo de contato, mas também não foram obtidos bons resultados. As micrografias de MEV, assim como as medidas de ângulo de contato, encontram-se nos anexos deste trabalho.

5.1. 2. Determinação dos grupos funcionais livres

A fim de avaliar quantitativamente a presença dos grupos funcionais da quitosana e do ácido hialurônico, foram utilizados testes com corantes específicos para cada grupo funcional, juntamente com uma análise de espectroscopia UV-vis. A possibilidade de incorporação de corantes iônicos, assim como outros compostos, em sítios dentro das multicamadas dos filmes é uma grande vantagem possibilitada pela técnica *LbL*. As análises de espectroscopia UV-Vis, por sua vez, permitem quantificar a incorporação de corante, tornando-se possível identificar a disponibilidade de grupos funcionais livres.

A identificação de grupos funcionais que não realizam ligações sugere que os corantes iônicos possuam moléculas pequenas e que não titulem grupos eletrostaticamente unidos (YOO *et al.*, 1998). Foram escolhidos os corantes Azul de alciano (AA) e Rosa de bengala (RB) para se ligarem e interagirem com os grupos funcionais livres do ácido hialurônico e da quitosana, respectivamente. A Figura 17 abaixo apresenta o resultado do tingimento do AA e do RB em algumas PEMs.

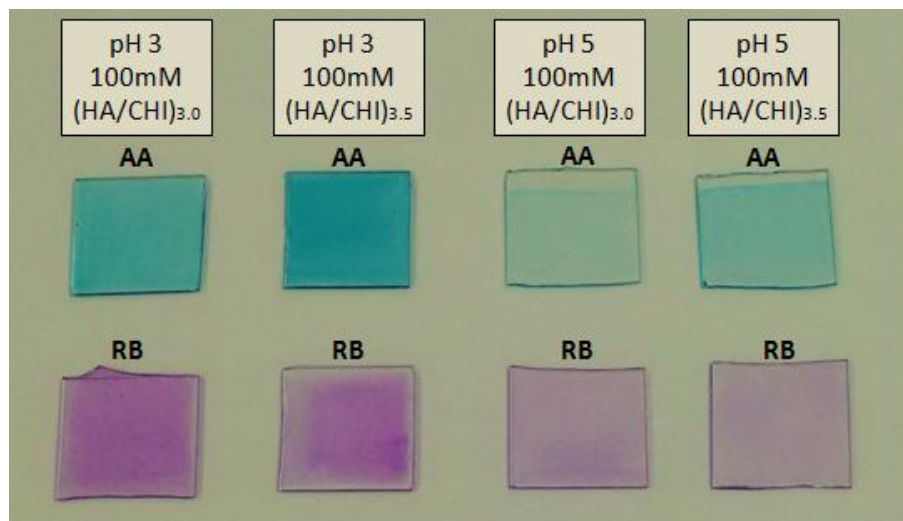


Figura 17 - Tingimento de PEMs de HA/CHI com corantes azul de alciano (AA) e rosa de bengala (RB)

Por se tratar de um corante tetracatiônico, o azul de alciano tem sido bastante utilizado para determinar a localização de grupos livres de ácidos carboxílicos de substâncias aniônicas, como o ácido hialurônico (FAGNOLA *ET al.*, 2009; ETIENNE *et al.*, 2005; WHITEMAN, 1973). Por sua vez, o rosa de bengala é um corante aniônico, sendo utilizado para investigar a presença de grupos negativos (LICHTER e RUBNER, 2009), como os grupos de amônio da CHI.

Considerando que existe uma interpenetração entre as multicamadas dos dois polímeros e que a disponibilidade de grupos funcionais livres se dá superficial e internamente, supôs-se a difusão completa dos corantes. Assim, passado o tempo de 15 minutos de tingimento, assume-se que todos os grupos funcionais livres do filme foram acessados pelo corante, assim como a proporcionalidade entre a quantidade de corante absorvida e o número de cargas livres das cadeias moleculares dos polieletrólitos. Supôs-se também que os corantes não promovem o descolamento do equilíbrio originado entre as interações da quitosana e do ácido hialurônico (YOO *et al.*, 1998).

Os resultados do tingimento com o corante azul de alciano para os filmes multicamadas preparados com as condições pH 3,0 ou pH 5,0, 3 ou 3,5 bicamadas, 0 ou 100mM estão apresentados na Figura 18.

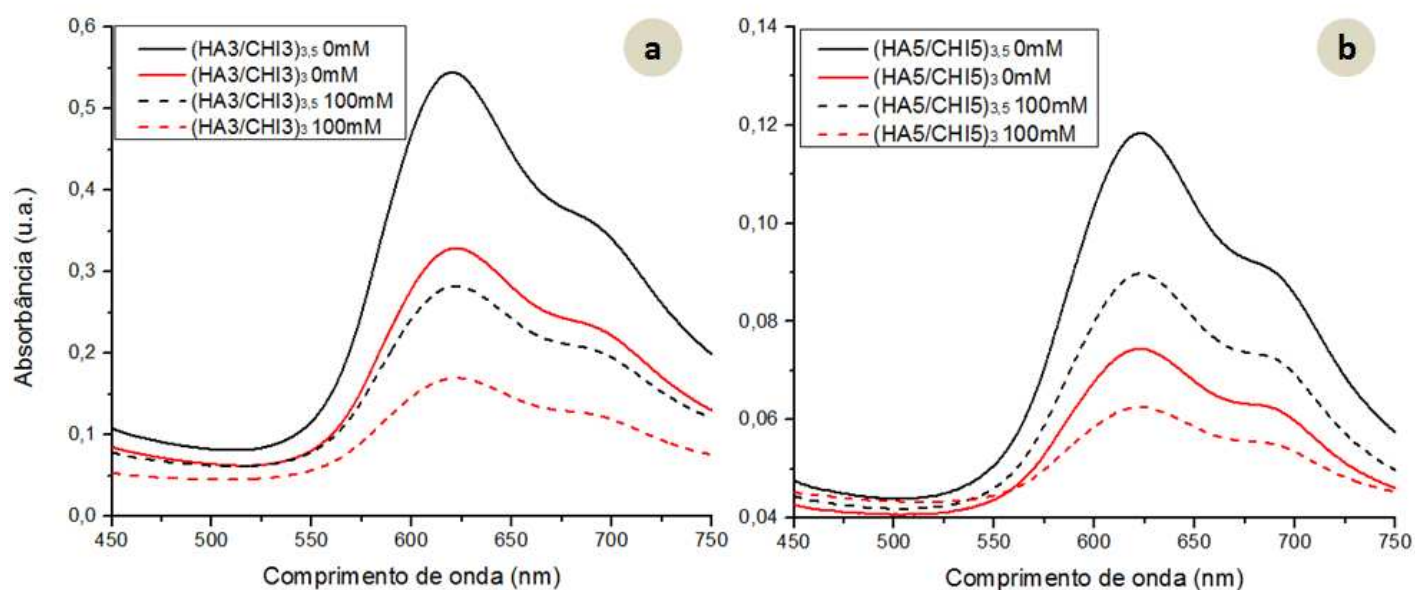


Figura 18 - Absorbância do corante azul de alciano para filmes de (a) $(\text{HA3/CHI3})_n$ 0 e 100 mM e (b) $(\text{HA5/CHI5})_n$ 0 e 100 mM, onde n assume os valores 3 e 3,5

Os resultados da incorporação do corante Rosa de Bengala para todas as condições de preparo das PEMs, já citadas, estão apresentados na Figura 19 abaixo.

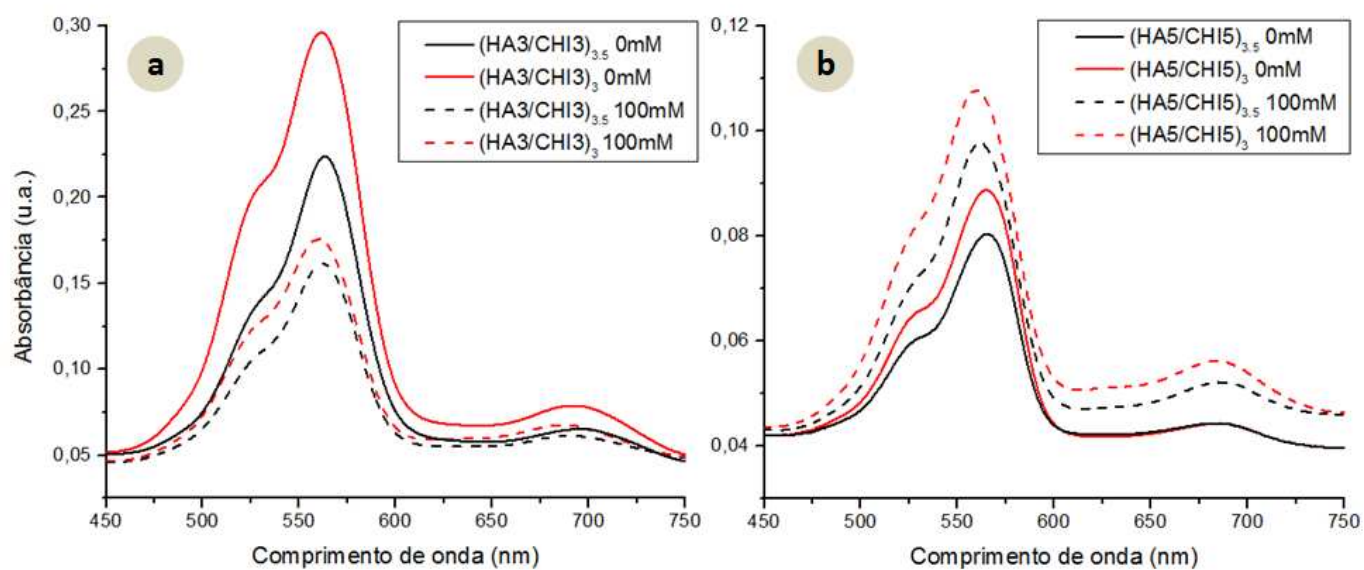


Figura 19 - Absorbância do corante rosa de bengala para filmes de (a) $(\text{HA3/CHI3})_n$ 0 e 100 mM e (b) $(\text{HA5/CHI5})_n$ 0 e 100 mM, onde n assume os valores 3 e 3,5

Os efeitos dos fatores pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) foram avaliados, individual e fatorialmente, através de um Planejamento Fatorial (DOE). Os resultados dessas avaliações para o azul de alciano e rosa de bengala estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Efeito do pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a incorporação do corantes azul de alciano para PEMs de HA/CHI

Fator	Efeito	p-valor
pH	-0.12	< 0.0001
FI	-0.057	< 0.0001
n	0.049	< 0.0001
pH*FI	0.049	< 0.0001
pH*n	-0.033	< 0.0001
FI*n	-0.016	0.0003
pH*FI*n	0.010	0.0047

Tabela 7 - Efeito do pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a incorporação do corantes rosa de bengala para PEMs de HA/CHI

Fator	Efeito	p-valor
pH	-0.058	< 0.0001
FI	-0.019	0.0001
n	-0.012	0.0024
pH*FI	+0.026	< 0.0001
pH*n	0,008	0.0195
FI*n	0,007	0.0279
pH*FI*n	-0,007	0.0260

É possível concluir através do estudo da influência dos fatores, dentro de um nível de significância de 5%, que as variáveis pH, FI e número de bicamadas são significantes (valor p em vermelho nas Tabelas 6 e 7) de maneira individual e conjunta sobre a absorbância dos corantes azul de alciano e rosa de bengala.

Da análise dos efeitos, pode-se constatar que o aumento do pH promove a diminuição da disponibilidade de grupos carboxílicos, revelando os filmes construídos em pH 3, independente do número de bicamadas e FI, como os que possuem o maior número de carboxilas livres. O aumento do pH também diminuiu a disponibilidade de grupos amino da quitosana.

Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, o HA em solução encontra-se 50% ionizado em pH 3 e 99% ionizado em pH 5, enquanto a CHI em solução em solução apresenta-se 99% ionizada em pH 3 e 90% ionizada em pH 5. Considerando que a conformação dessas cadeias em solução seja preservada na construção do filme, existe uma maior quantidade de grupos carboxila não ionizados em pH 3 e uma maior quantidade de carboxilas ligados a grupos amino em pH 5. Dessa forma, a maior disponibilidade de grupos carboxílicos não ionizados em pH3 sugere uma maior complexação com o corante AA, justificando a maior absorbância deste corante nos filmes preparados em pH 3.

A mudança de pH provoca apenas uma discreta variação na quantidade de grupos ionizados da CHI em solução. No entanto, ambos os polímeros (CHI e HA) exibem altos graus de ionização em pH 5. Dessa forma, existe uma maior quantidade de grupos aminos livres em pH 3 em virtude da baixa ionização do HA nessa faixa, justificando a maior absorbância de rosa de bengala nos filmes preparados em pH 3.

O aumento da força iônica, por sua vez, atua na diminuição dos grupos funcionais livres nos filmes estudados. Este efeito foi observado para o tingimento com ambos os corantes. Este efeito é esperado, uma vez que a adição de sal compromete a disponibilidade dos grupos funcionais, onde a presença do íon "Na⁺" funciona como uma espécie de "blindagem" nos grupos funcionais (Ren *et. al*, 2005).

O aumento do número de bicamadas atua na diminuição da absorbância do rosa de bengala e no aumento da absorbância de azul de alciano. Este resultado é esperado para os filmes estudados, uma vez que o aumento do número de bicamadas expõe o ácido hialurônico na superfície do filme, aumentando o número de grupos livres de ácido carboxílico no filme e, conseqüentemente, aumentando a incorporação de AA e diminuindo a incorporação de RB.

Analisando-se a Figura 16, é possível perceber, apesar do pequeno aumento do número de bicamadas, a coloração azulada mais intensa em filmes com HA

como polímero do topo, ou seja, com 3.5 bicamadas. Seguindo-se o mesmo raciocínio, a coloração rosa mostra-se mais acentuada em filmes com quitosana como polímero do topo, ou seja, com 3 bicamadas. Estes resultados são esperados já que a camada superficial é determinante para a maior absorbância do corante específico para o grupo funcional.

Outros corantes podem ser utilizados para a determinação dos grupos carboxila do HA. O corante azul de metileno, por exemplo, foi utilizado com a finalidade de detectar grupos carboxila em hidrogéis de HA modificados com recobrimentos *LbL* de poli-Llisina(PLL) e ácido hialurônico, constatando que os géis funcionalizados por *LbL* exibiram tons azuis mais fortes à medida que se aumentava o número de bicamadas (Yamanlar e Sant, 2001), corroborando com o resultado obtido para as PEMs de HA/CHI.

Filmes construídos em pH mais baixo, sem sal e com 3.5 bicamadas apresentaram maior disponibilidade de grupos carboxílicos livres. Considerando que a adesão celular se deva à interação HA-CD44, seria esperado, a priori, uma maior adesão em filmes construídos nessa configuração. Dessa forma, o uso desta técnica mostra-se capaz de explorar as mudanças nas quantidades de segmentos da cadeia polimérica do ácido hialurônico e da quitosana que estão acessíveis ou não, tentando estabelecer uma resposta na seletividade do filme quanto à adesão de células tumorais.

5.2. PEMs DE HA E QUITOSANAS CONTROLADAS

Neste tópico, serão apresentadas as caracterizações para os filmes de ácido hialurônico e quitosanas de alto peso molecular com graus de acetilação diferentes (20% e 37%). Foram utilizadas as técnicas de Microscopia de Força atômica (AFM), Espectroscopia UV-Vis e Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-x (XPS).

5.2.1. Determinação dos grupos funcionais livres

A incorporação de corantes a fim de avaliar a presença dos grupos funcionais amino da quitosana e grupos carboxílicos do ácido hialurônico também foi realizada

para um conjunto de filmes formados por HA e quitosanas controladas quanto ao seu grau de acetilação.

Os resultados do tingimento com os corantes iônicos Rosa de Bengala e Azul de alciano estão apresentados na Figura 20 abaixo.

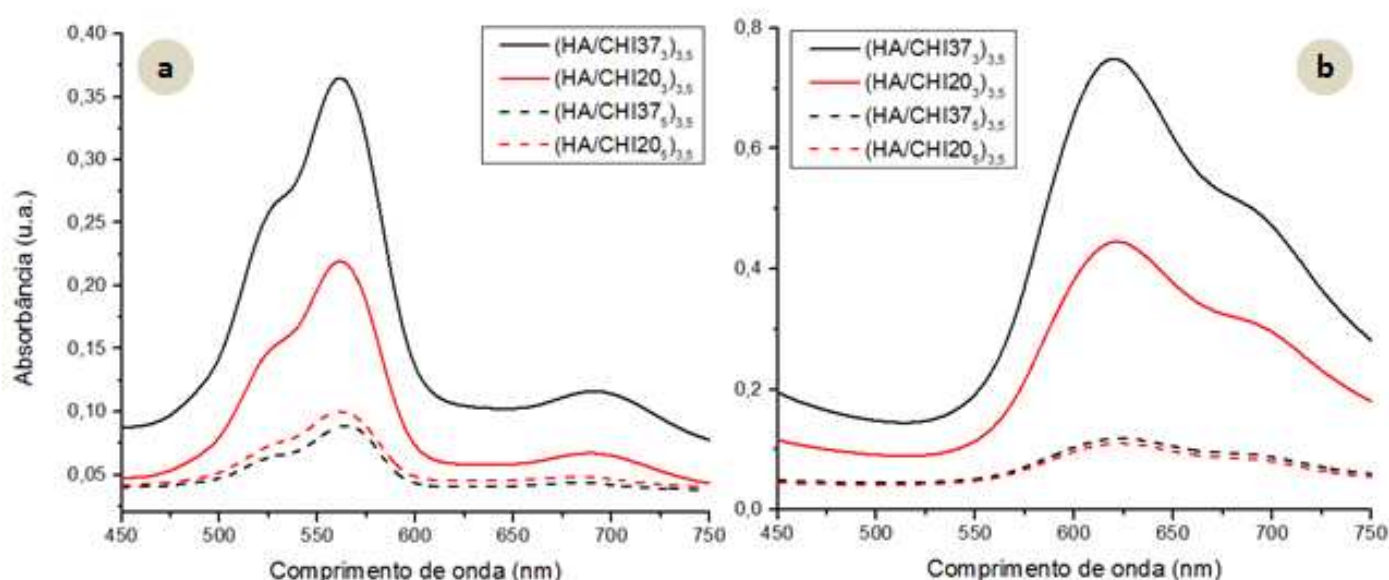


Figura 20 - Absorbância dos corantes (a) rosa de bengala e (b) azul de alciano para PEMs de ácido hialurônico e quitosanas controladas

A avaliação dos efeitos das variáveis pH e grau de acetilação (GA), assim como seus efeitos cruzados, foi realizada através de um Planejamento Fatorial (DOE) dentro de um nível de 5% de significância. O resultado para os corantes Azul de alciano e Rosa de bengala está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeito do pH e do Grau de acetilação (GA) sobre a incorporação do corantes azul de alciano e rosa de bengala para PEMs de HA/CHI

Fator	Azul de alciano		Rosa de bengala	
	Efeito	p	Efeito	p
pH	-0,240	0,0014	-0,080	0,0008
GA	0,080	0,0592	0,030	0,0257
pH*GA	-0,075	0,0705	-0,035	0,0156

É possível concluir que o pH é individualmente significativo na disponibilidade de grupos funcionais amino e carboxílicos livres nos filmes estudados, tendo seu aumento resultado na diminuição da incorporação dos corantes. Logo, o aumento do pH promoveu uma diminuição na disponibilidade de grupos funcionais livres da quitosana e do ácido hialurônico. Este comportamento pode ser explicado da mesma maneira que foi apresentada no tópico 5.2, uma vez que a tendência foi repetida.

Independente do GA da CHI, os filmes construídos em pH 3 apresentaram maior incorporação dos corantes AA e RB, dado que o HA encontra-se 50% ionizado segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, viabilizando uma maior quantidade de grupos não ionizados de HA e grupos amino da CHI disponíveis para se ligarem aos corantes.

O grau de acetilação da quitosana, por sua vez, foi apenas significativo na absorbância do rosa de bengala, uma vez que o aumento do GA promove uma diminuição direta da quantidade de grupos amino livres, interferindo na incorporação do rosa de bengala. O aumento da quantidade de grupos amino protonados na quitosana de menor grau de acetilação diminui a disponibilidade de grupos amino não ionizados capazes de se ligar ao RB, resultando numa menor incorporação de RB. Esta tendência foi observada independente da faixa de pH, mas ocorrendo de forma mais pronunciada em pH 3 onde a ionização do HA afeta de forma mais significativa. O efeito cruzado do pH e do GA foi significativo apenas na absorbância do corante rosa de bengala, tendo o aumento destes fatores proporcionado uma diminuição da disponibilidade de grupos amino.

5.2.2. Topografia dos filmes

A topografia dos filmes também foi caracterizada a partir de Microscopia de Força atômica (AFM). A Figura 21 registra o resultado de rugosidade média quadrática (rms) para os filmes multicamadas formados por ácido hialurônico e quitosanas com propriedades controladas.

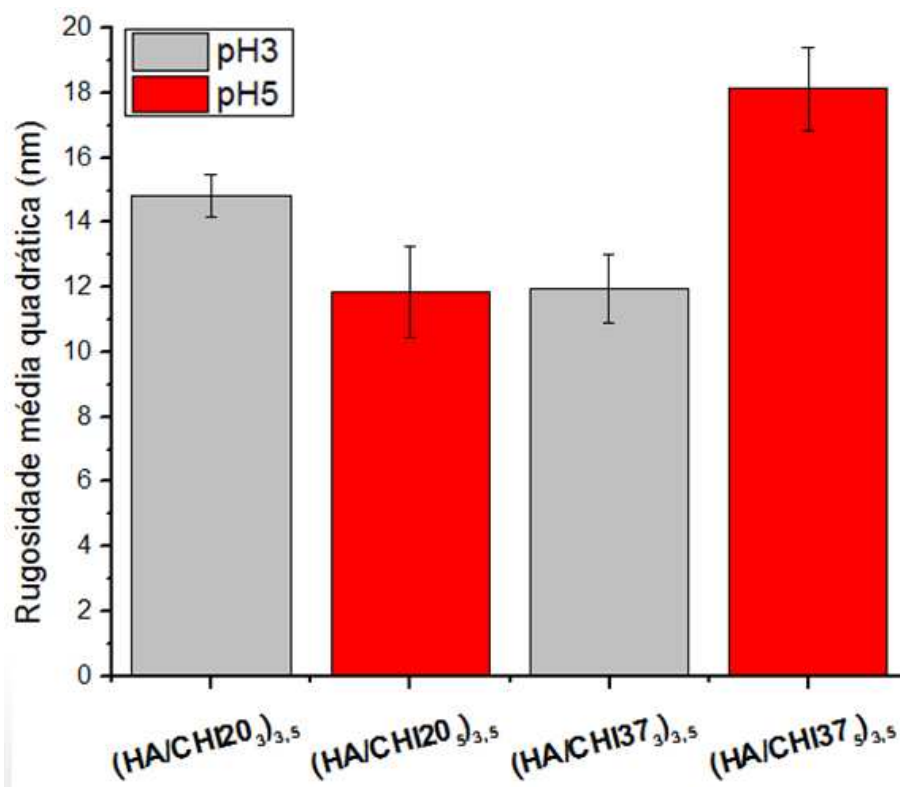


Figura 21 - Valores de rugosidade média quadrática para filmes de $(HA/CHIX_y)_{3,5}$, onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI

A avaliação dos efeitos individuais das variáveis pH e grau de acetilação (GA), assim como seus efeitos cruzados, foi realizada através de um Planejamento Fatorial (DOE) dentro de um nível de 5% de significância. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. É possível concluir que os fatores pH e grau de acetilação são significativos de forma individual e cruzada na rugosidade dos filmes $(HA/CHIX_y)_{3,5}$.

Tabela 9 - Efeito das variáveis pH e grau de acetilação sobre a rugosidade média quadrática de filmes $(HA/CHIX_y)_{3,5}$

Fator	Efeito	p
pH	1,5967	0,0415
GA	1,7033	0,0322
pH*GA	4,5800	0,0001

O aumento do pH promoveu um acréscimo na rugosidade dos filmes estudados. Este comportamento foi diferente do obtido no tópico 5.1 para os filmes de HA e CHI de baixo peso molecular. Sabe-se que o pH atua diretamente no grau de ionização da CHI e HA em solução, segundo a equação de Henderson-Hasselbalch. Em pH 5, as cadeias destes polieletrólitos fracos encontram-se mais carregadas, promovendo a formação de estruturas multicamadas mais regulares e superfícies menos rugosas (Elzbieciak *et al.*, 2009).

Realizando-se uma análise individual, percebe-se que o aumento do pH reduziu a rms nas PEMs formadas com quitosanas de 20% de grau de acetilação, conforme o esperado. O efeito foi contrário para as PEMs formadas com quitosanas de 37% de grau de acetilação, sugerindo que a diminuição de grupos amino tenha efeito positivo e de maior dominância na rugosidade dos filmes.

O aumento do grau de acetilação, por sua vez, promoveu individualmente um aumento na rugosidade dos filmes de $(\text{HA}/\text{CHIX}_y)_{3,5}$. Pode-se supor que a diminuição da quantidade de grupos aminos implica numa redução do número de interações entre estes grupos e os grupos carboxila, resultando num aumento da rugosidade dos filmes construídos nesta condição. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores (TAKETA & BEPPU, 2014).

O aumento do fator $\text{pH} \cdot \text{GA}$ também atua no acréscimo da rugosidade, identificando estes como fatores-chave para a modificação da topografia dos filmes $(\text{HA}/\text{CHIX}_y)_{3,5}$. A Figura 22 apresenta as imagens em 2D e 3D da topografia dos filmes estudados nesta seção.

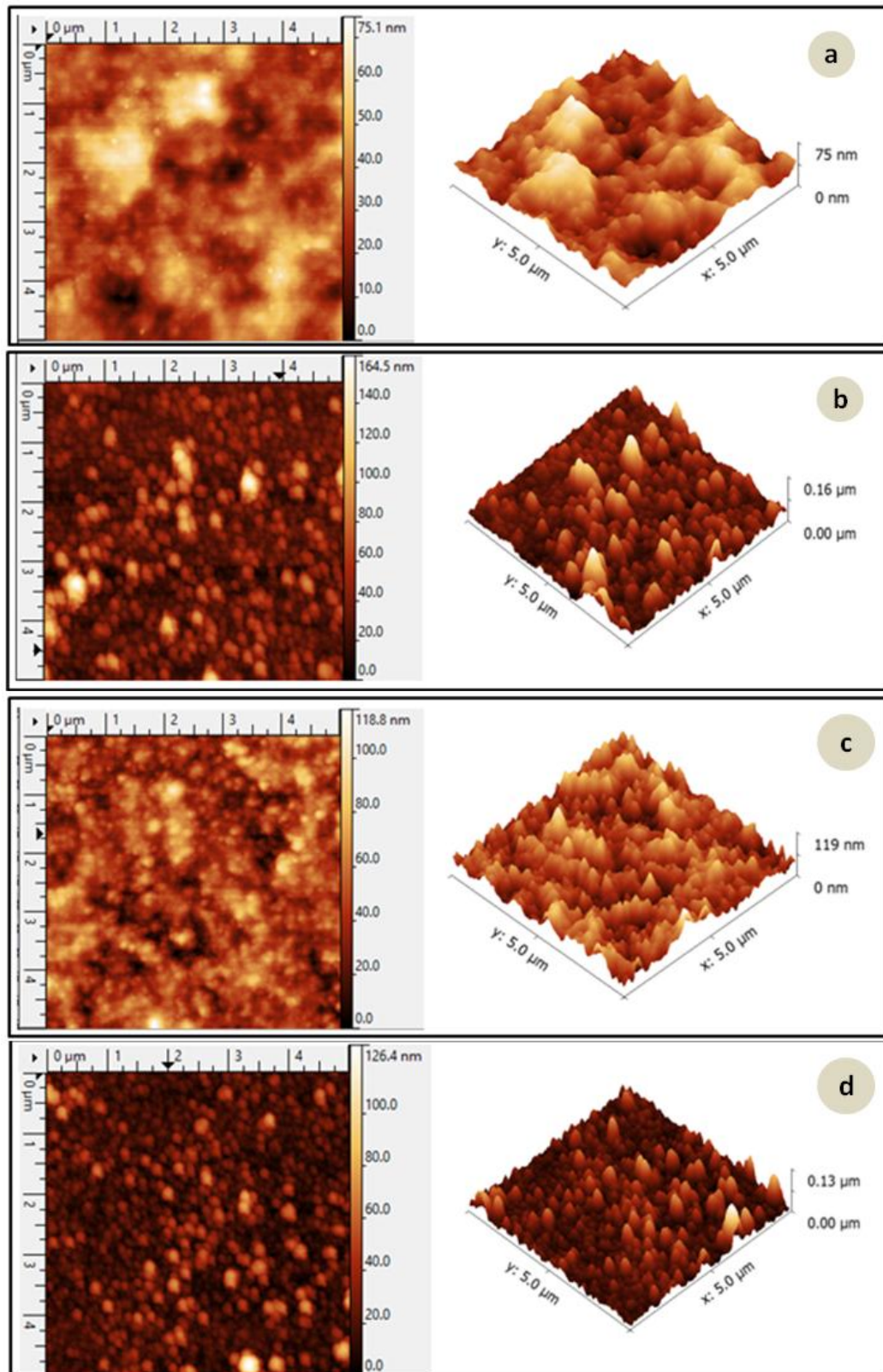


Figura 22 - Imagens de AFM (5 μm x 5 μm) de filmes com 3.5 bicamadas de (a) (HA/CHI37) em pH 3 (b) (HA3/CHI37) em pH 5, (c) (HA/CHI20) em pH 3 e (d) (HA3/CHI20) em pH 5

5.2.3. Composição Química

Os filmes $(\text{HA/CHIX}_y)_{3,5}$ foram caracterizados pelo registro da foto-emissão das bandas C 1s e N 1s a fim de determinar a composição química dos filmes. O sinal de C 1s pode ser decomposto em três picos, tendo suas energias de ligação (BE) e grupos atribuídos aos sinais dos picos exibidos na Figura 23. A técnica de Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-X (XPS) utilizada possui um limite de detecção de 5 a 10 nm a partir da superfície.

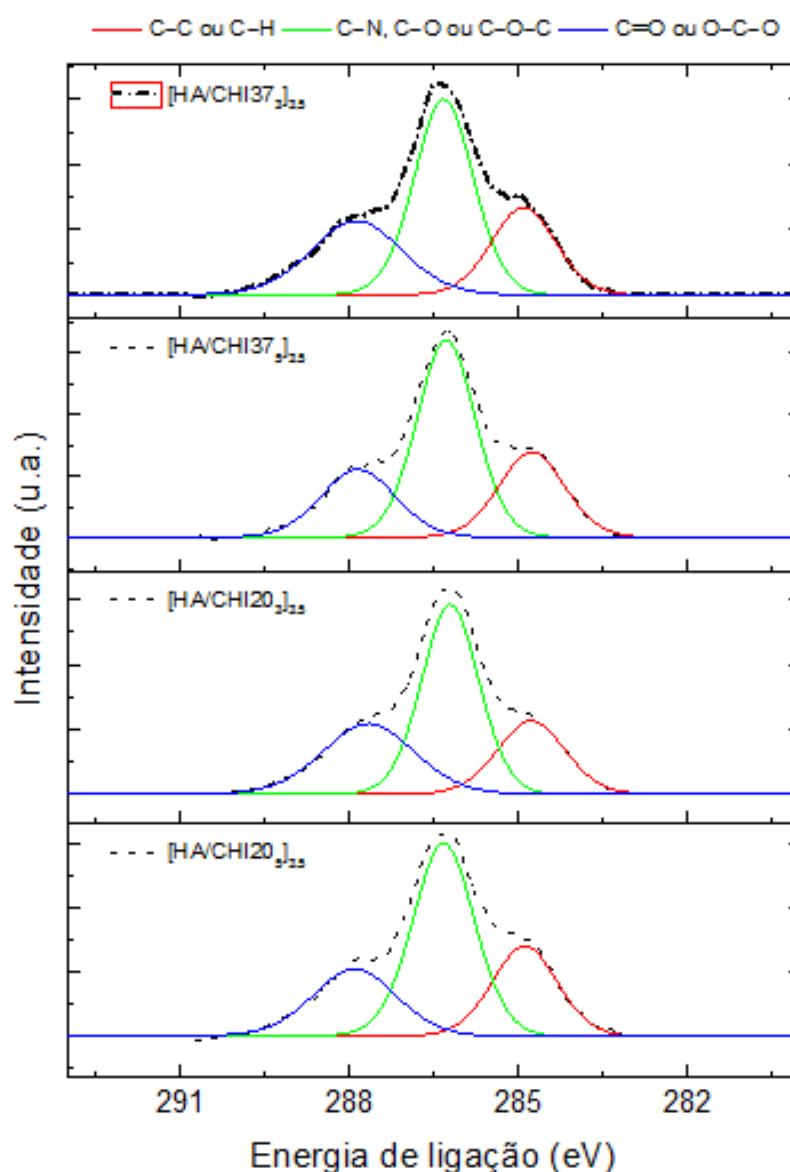


Figura 23 - Espectros de XPS do C 1s para os filmes de $(\text{HA/CHIX}_y)_{3,5}$, onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI

Analisando-se os resultados do espectro de C 1s, é possível perceber que o aumento do pH, para um mesmo tipo de quitosana, promove uma diminuição na concentração do pico relativo aos grupos C=O e O-C-O. Esse efeito pode ser explicado com base nos grupos carboxila do HA em solução, que se apresentam 50% ionizado em pH3 e 99% ionizado em pH 5, segundo a equação de Henderson-Hasselbalch. Considerando que essa configuração em solução seja preservada na construção dos filmes, supõe-se que o excesso de HA não ionizado na superfície dos filmes construídos em pH 3 seja responsável pelo pico mais pronunciado, já que a energia necessária para retirar um elétron de um grupo não ionizado (COOH) é bem maior do que a energia de ionização de seu respectivo ânion (COO⁻). Dessa forma, o HA atua numa compensação de cargas, mostrando-se como o componente majoritário do filme em relação à CHI. As concentrações atômicas do carbono são apresentadas na Figura 24.

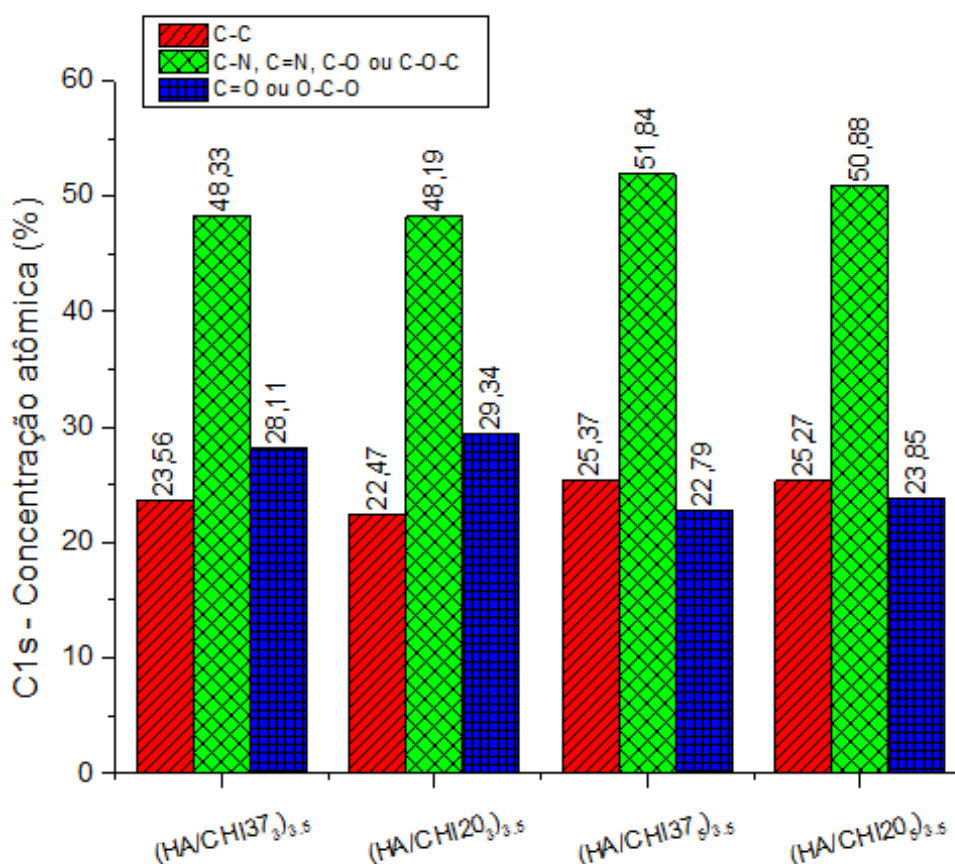


Figura 24 - Concentração atômica do carbono para filmes de (HA/CHI_X)_{3,5}, onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI

Ainda no espectro de C 1s, pode-se verificar que a diminuição do grau de acetilação, num mesmo valor de pH, aumenta discretamente a concentração do grupo C=O. Isso pode ser explicado pela existência de uma maior concentração de grupos amino protonados nas PEMs formadas por quitosana de menor grau de acetilação, revelando neste filme uma predominância de forças eletrostáticas na sua construção e, teoricamente, uma maior quantidade de ligações entre os grupos (-NH_3^+) e (-COO^-). A maior energia de ionização destas ligações, quando comparada à energia de ionização dos grupos COO^- , pode explicar os picos mais pronunciados nas PEMs formadas por quitosana de menor grau de acetilação.

O sinal de N 1s pode ser decomposto em dois picos, onde suas energias de ligação (BE) e grupos atribuídos aos sinais, assim como as respectivas concentrações atômicas, são exibidos na Figura 25 abaixo.

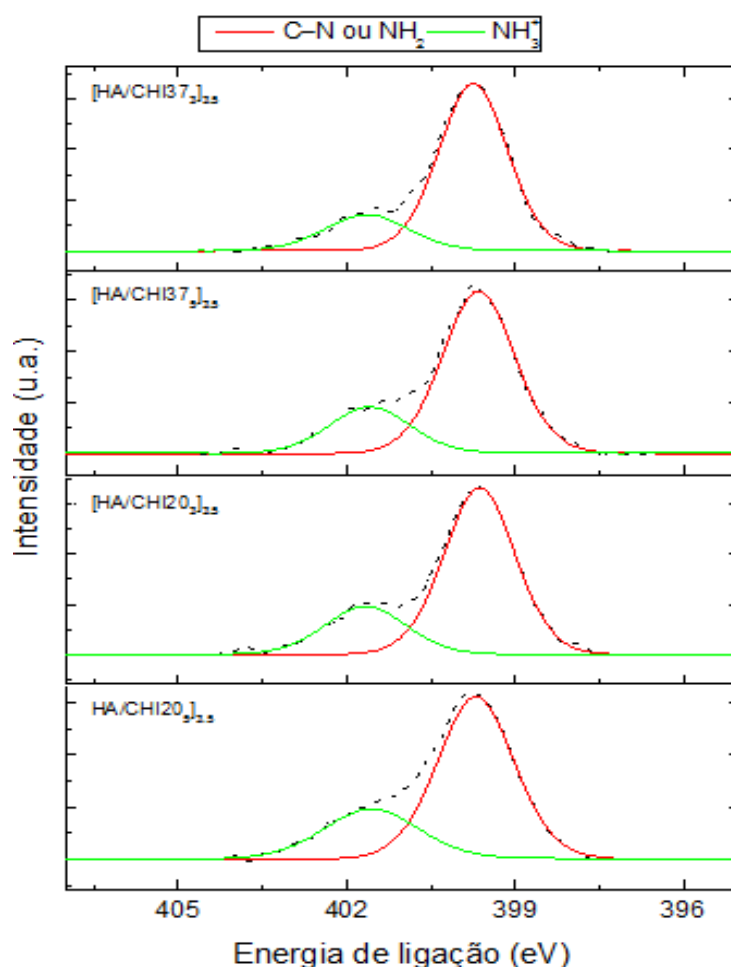


Figura 25 - Espectro de XPS de N 1s para os filmes de $(\text{HA/CHIX}_Y)_{3,5}$, onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI

Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, a CHI em solução apresenta-se 99% ionizada em pH 3 e 90,9% ionizada em pH 5. De posse do espectro de XPS do N 1s, é possível identificar que o aumento do pH, para um mesmo tipo de quitosana, promove um aumento do grupo -NH_3^+ , revelando que os polímeros em estudo interagem primordialmente por ligações eletrostáticas em pH 5, uma vez que CHI e HA apresentam-se com altos graus de ionização. Já em pH 3, ligações não-eletrostáticas são mais atuantes e contribuem para o crescimento do filme (*e.g.* ligações de hidrogênio), o que pode ser associado com a baixa ionização do HA.

A mudança do tipo de quitosana, por sua vez, num mesmo valor de pH, aumentou o pico de protonação do nitrogênio conforme a diminuição do grau de acetilação, reforçando a ideia de que as interações se dão primordialmente por ligação eletrostática com o aumento dos grupos -NH_3^+ . As ligações formadas entre estes grupos e os grupos carboxila do HA apresentam alta energia de ligação, explicando o pico mais pronunciado. A Figura 26 apresenta o gráfico de concentração atômica de nitrogênio para os filmes $(\text{HA/CHIX}_Y)_{3,5}$.

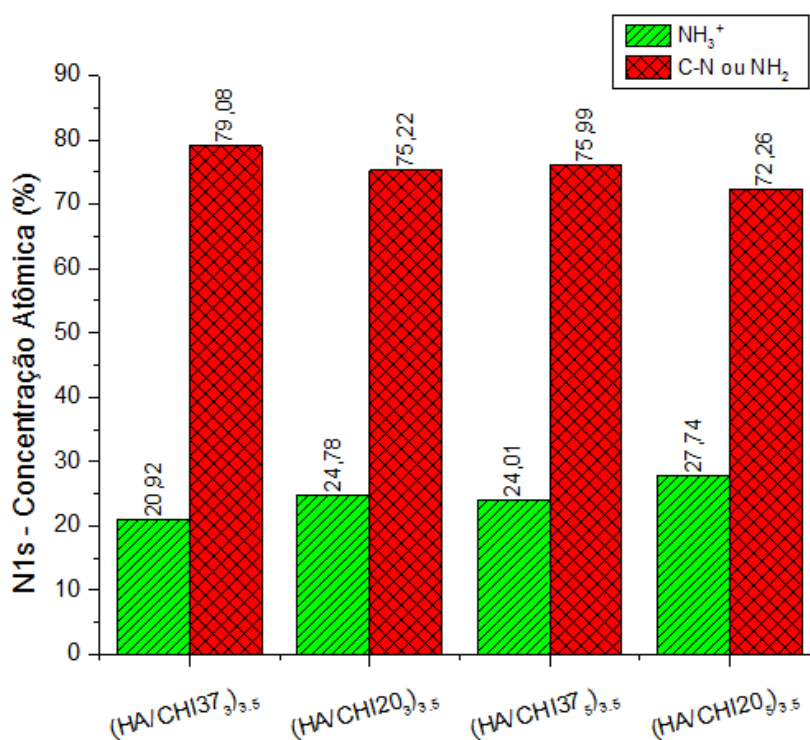


Figura 26 - Concentração atômica de nitrogênio em filmes de $(\text{HA/CHIX}_Y)_{3,5}$, onde y é o pH das soluções de HA/CHI e X o grau de acetilação da CHI

5.3. ADESÃO CELULAR

Neste tópico, serão apresentados os resultados de adesão celular das linhagens tumoral (PC3, DU-145, LNCaP) e não-tumoral (RWPE-1) em filmes formados por ácido hialurônico e quitosana em diferentes pesos moleculares e graus de acetilação. Como forma de controle para estes testes, também foi avaliada a adesão das linhagens celulares em substratos sem nenhum recobrimento LbL. Especificamente para a linhagem PC3, foram utilizados outros tipos de controle: i) tratamento com hialuronidase, ii) tratamento com anti-CD44 e iii) adesão em PEMs formadas por alginato de sódio e quitosana.

5.3.1. Ensaios Preliminares

Ensaios preliminares foram realizados com a incubação das linhagens celulares LNCaP, DU-145 e PC3 em filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM e em substratos sem nenhum recobrimento (controle). Estes testes tiveram como objetivo a prova de conceito da adesão celular e identificação do possível potencial seletivo de PEMs de HA/CHI na captura de células tumorais.

A escolha dos filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM foi baseada em estudo anterior (Vanconcellos *et al.*, 2010) que indicou esta como sendo a melhor configuração de filme para captura seletiva de Linfócitos B. Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia apresentada no tópico 4.2.3.

Os substratos foram cortados com ponta de diamante em tamanhos de 25x25mm e acomodados em placas de cultura com 6 poços, como pode ser visto na Figura 27. Cada substrato foi recoberto com um volume de 0,5mL de meio completo contendo um número de células igual a $2,5 \times 10^4$. Nesta etapa, ainda não estava consolidada a metodologia de adesão celular descrita no tópico 4.2.9.

Nesta etapa, foi avaliado o tempo de adesão celular. Através de experimentos preliminares, verificou-se que o tempo de 1 hora era suficiente para estabelecer uma diferença significativa de adesão destas linhagens entre as PEMs e seus controles. Dessa forma, foram realizadas duas incubações e duas agitações, contabilizando um tempo de 1 hora. Em seguida, uma lavagem com 1mL de DPBS Flush pH 7,0 foi realizada. Posteriormente, os substratos foram colocados em meio completo livre de

células para análise. Tempos mais longos também foram avaliados, mas não apontavam seletividade satisfatória, visto que a adesão ocorria de maneira acentuada nas PEMs e no controle, já que se tratam de células aderentes.

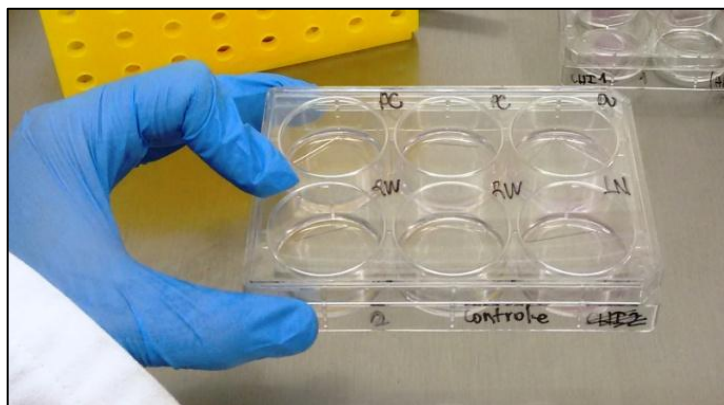


Figura 27 - Incubação das células nos substratos acomodados em placa de cultura de 6 poços

As superfícies dos slides foram observadas em Microscópio Ótico Axiovert S100 da marca ZEISS com a lente objetiva 5X/0.12. As células aderidas foram contadas com o auxílio do software ImageJ. A razão de adesão para todas as linhagens, definida como o quociente entre o número de células aderidas no filme (HA3/CHI3)_{3.5} 100mM e o número de células aderidas no respectivo controle, está apresentada na Figura 28.

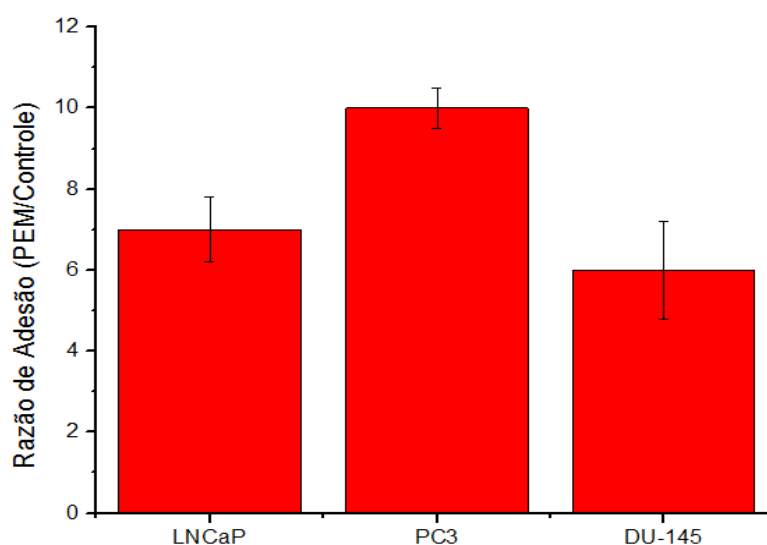


Figura 28- Razão de adesão das linhagens LNCaP, DU-145 e PC3 em filmes (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM

A linhagem PC3 obteve melhor desempenho de adesão quando comparada com as demais linhagens, apresentando uma adesão 10 vezes maior nos filmes recobertos via LbL do que nas lâminas sem recobrimento. As linhagens LNCaP e DU-145 apresentaram razões de adesão menores, mas também significativas.

Estes ensaios tiveram como importância a prova do conceito da adesão de células tumorais em PEMs de HA/CHI, a fixação do tempo de adesão de 1 hora como parâmetro de teste e a escolha da linhagem PC3 para a avaliação da configuração de filme potencialmente mais seletiva para a captura celular através da variação dos fatores pH, força iônica, número de bicamadas e grau de acetilação da CHI.

5.3.2. Avaliação dos fatores pH, FI e n na adesão celular

Os fatores pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) foram variados no processo de construção das PEMs de (HAX/CHIY)_n a fim de determinar a influência destas variáveis na captura seletiva de células da linhagem PC3 e estabelecer a otimização das condições de preparo das PEMs. Esperava-se encontrar a configuração de filme de maior potencial seletivo. O gráfico da Figura 29 apresenta os resultados de adesão da linhagem PC3 para os oito tipos de PEMs. O gráfico foi construído a partir de 4 medidas de adesão (número de células aderidas) para cada tipo de filme, onde a barra representa o erro padrão em torno da média.

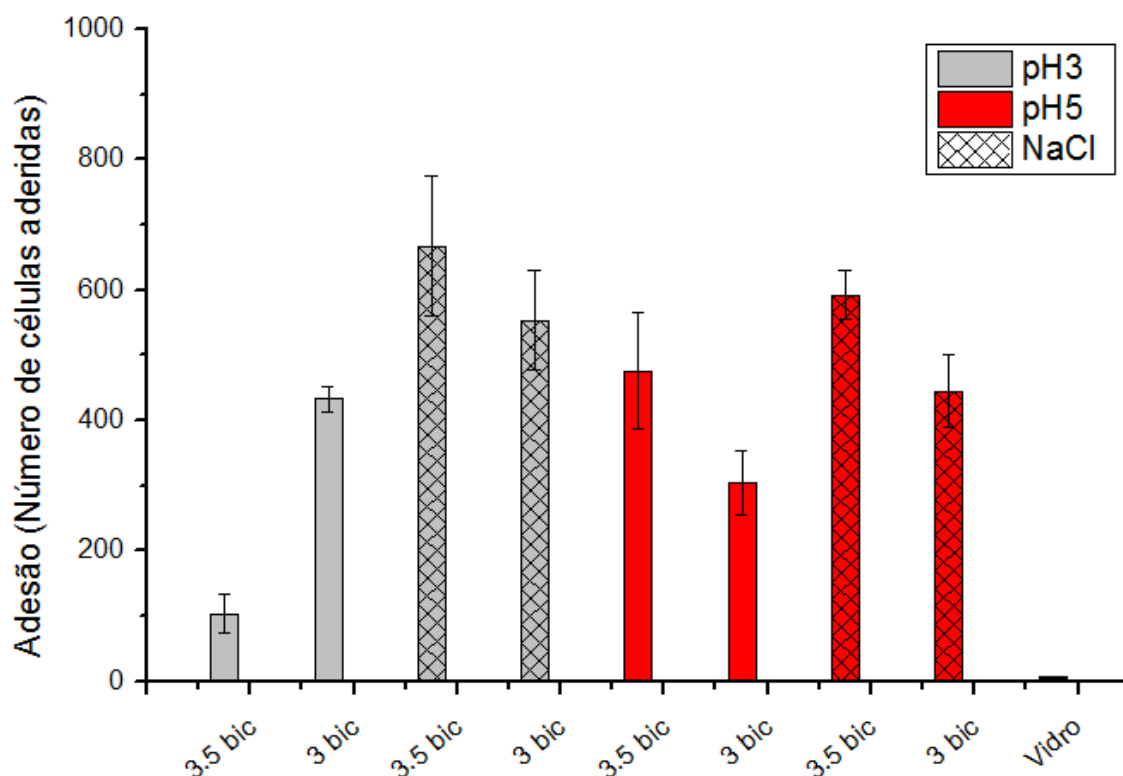


Figura 29 - Adesão celular da linhagem PC3 em PEMs de HA/CHI construídas em diferentes condições de pH (3 e 5), força iônica (0 e 100 mM) e número de bicamadas (3 e 3.5)

Considera-se que a interação responsável pela adesão celular se dê entre o ácido hialurônico presente na superfície dos filmes e o CD44, receptor específico para hialuronato presente na matriz extracelular (SWISTON *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Analisando-se a Figura 28, pode-se perceber uma diferença significativa de adesão entre alguns filmes. Dessa forma, é possível supor a disponibilidade de HA na superfície de cada um desses filmes como o parâmetro mais relevante na adesão celular.

Os efeitos dos fatores pH, força iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a adesão celular da linhagem PC3 foram avaliados, individual e fatorialmente, através de um Planejamento Fatorial (DOE). Os resultados estão representados na Tabela 10.

A análise da influência dos fatores, dentro de um nível de significância de 5%, aponta que o pH, assim como o número de bicamadas, não teve significância, de maneira individual, no número de células aderidas. No entanto, estas variáveis quando combinadas com as demais tiveram relevância na adesão celular. A força iônica foi a única variável a exibir significância individualmente.

Tabela 10 - Influência dos fatores pH, iônica (FI) e número de bicamadas (n) sobre a adesão celular da linhagem PC3

Fator	Efeito	p-valor
pH	7,77	0,7368
FI	117,23	< 0,0001
n	13,45	0,5613
pH*FI	-53,05	0,0290
pH*n	66,48	0,0077
FI*n	52,39	0,0309
pH*FI*n	-58,58	0,0170

A independência do número de bicamadas pode ser explicada pela interpenetração das multicamadas de HA e CHI (YOO *et al.*, 1998). Partindo dessa ideia, independente do último polímero a ser depositado no filme, existirão grupos amino e carboxila disponíveis, corroborando com os resultados de UV-vis apresentados no tópico 5.2. Dessa forma, a adesão celular não foi bloqueada em filmes com 3 bicamadas (CHI no topo), mas apenas diminuída quando comparada com os filmes construídos com 3.5 bicamadas (HA no topo).

O pH atua diretamente no grau de ionização do HA em solução, segundo a equação de Henderson-Hasselbalch. De acordo com os resultados de UV-vis, filmes construídos em pH 3 apresentam maior disponibilidade de HA. No entanto, o pH não exibiu relevância na adesão celular. Pode-se supor, dessa forma, que exista um nível ótimo ou máximo para que ocorra a adesão celular.

O ácido hialurônico pode atuar como mediador direto na adesão célula-célula. Um bom exemplo disso é a agregação de diversas linhagens de células, que se mostra inibida com altas concentrações de HA (Underhill e Toole, 1981; Green *et al.*, 1988), enquanto baixas concentrações de HA induzem a agregação de linhagens de linfócitos e macrófagos (Green *et al.*, 1988). A Figura 30 exhibe este comportamento entre células.

Estendendo esse comportamento para o processo de adesão célula-filme, pode-se supor que um excesso de HA atuaria inibindo a adesão celular, enquanto a existência de um valor médio ou ótimo favoreceria a ligação entre os receptores CD44 e o HA presente nas PEMs. Partindo desta hipótese, seria possível supor que

o contato entre filmes com maiores quantidades de HA e células cancerígenas não seja o melhor arranjo para promover a adesão seletiva destas células.

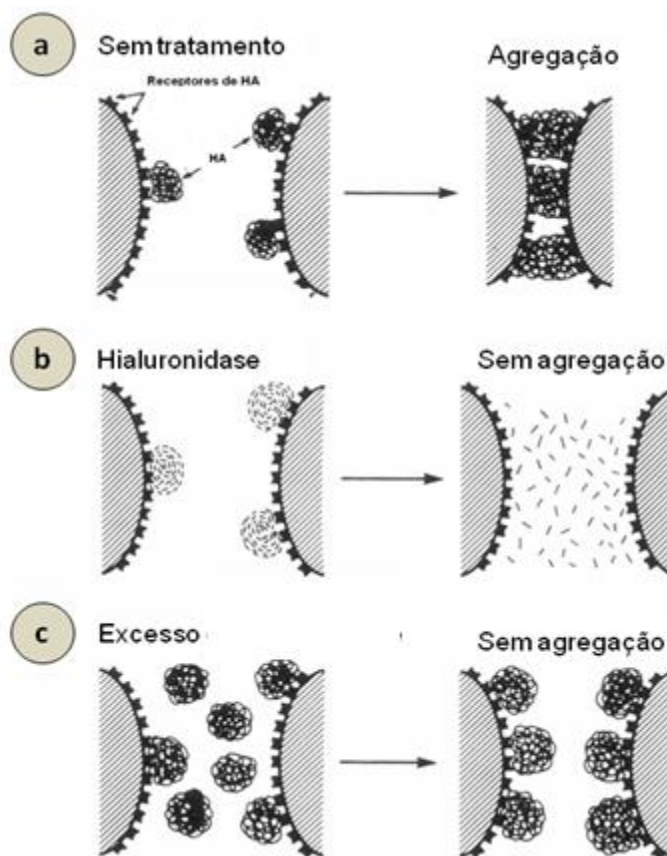


Figura 30 - Agregação célula-célula em (A) baixos níveis de HA, (B) tratada com hialuronidase e (C) altos níveis de HA

Fonte: Adaptada de HAY (1991).

A força iônica foi a única variável que promoveu, individualmente, significância no número de células aderidas. O efeito apresentado na Tabela 10 indica que seu aumento (de 0 para 100mM) promove um aumento na adesão celular. Como já foi discutido no tópico 5.2, a adição de sal atua como um bloqueador de grupos funcionais livres, atuando na diminuição de grupos carboxila disponíveis para reação com o corante azul de alciano. Dessa forma, pode-se supor que houve uma diminuição do que poderia ser um excesso de ácido hialurônico na superfície dos filmes, favorecendo a adesão celular e corroborando com a suposição anteriormente levantada.

Este resultado pode também ser fundamentado de acordo com o conceito de dupla camada elétrica. A fim de entender este efeito, devem-se considerar todas as

cargas envolvidas no processo de interação célula-filme. Na superfície dos filmes, encontram-se cargas negativas dos grupos carboxila do HA e cargas positivas dos grupamentos amino da CHI. Na superfície das células, por sua vez, encontram-se cargas positivas do receptor extracelular CD44, juntamente com as cargas negativas de grupos carboxilas do HA, amplamente distribuído na matriz extracelular. A adesão celular seria, dessa forma, aumentada com a redução do potencial elétrico superficial, resultante da diminuição dos grupos carboxila disponíveis, promovendo uma maior interação célula-filme em virtude da menor repulsão entre os grupamentos de HA presentes no filme LbL e nas células.

O aumento do fator cruzado $FI \cdot n$ também se mostrou significativo, promovendo um acréscimo na adesão celular, uma vez que o aumento do sal diminui a disponibilidade de HA e o aumento da bicamada expõe o HA na superfície. A combinação dos fatores pH e n atua na mesma tendência, apontando filmes de pH 5 e 3.5 bicamadas como a melhor configuração. O cruzamento dos três fatores, por sua vez, tem seu aumento associado com a diminuição da adesão celular.

As Figuras 31 e 32 apresentam as micrografias de adesão da linhagem PC3 em filmes de (HAX/CHIY) n . Em praticamente todas as condições de pH e FI, aumentar o número de bicamadas, ou seja, disponibilizar HA no topo promoveu um aumento da adesão celular. Dessa forma, pode-se perceber que os resultados de adesão celular para PEMs de HA e CHI de baixo peso molecular apresentam uma tendência, indicando 3,5 bicamadas e a presença de sal como condições de otimização para a construção de filmes seletivos para células cancerígenas. Apesar de não ser estatisticamente significativo de forma individual, o pH apresenta efeito na adesão celular quando combinado com as demais variáveis, tornando-o também um fator-chave.

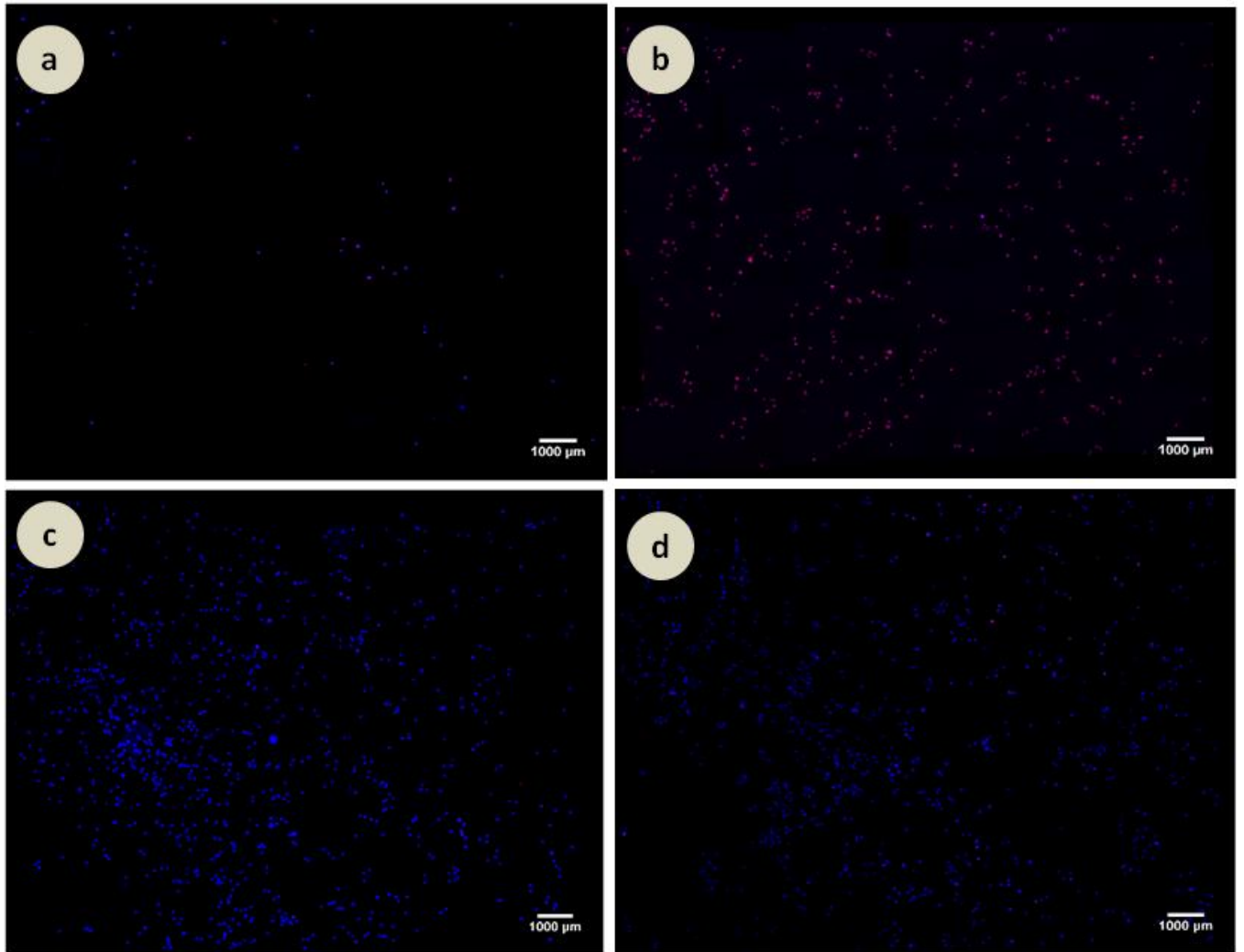


Figura 31 - Micrografias de adesão da linhagem PC3 em (a) $(\text{HA3/CHI3})_{3.5}$ 0 mM, (b) $(\text{HA3/CHI3})_3$ 0mM, (c) $(\text{HA3/CHI3})_{3.5}$ 100mM e (d) $(\text{HA3/CHI3})_3$ 100 mM

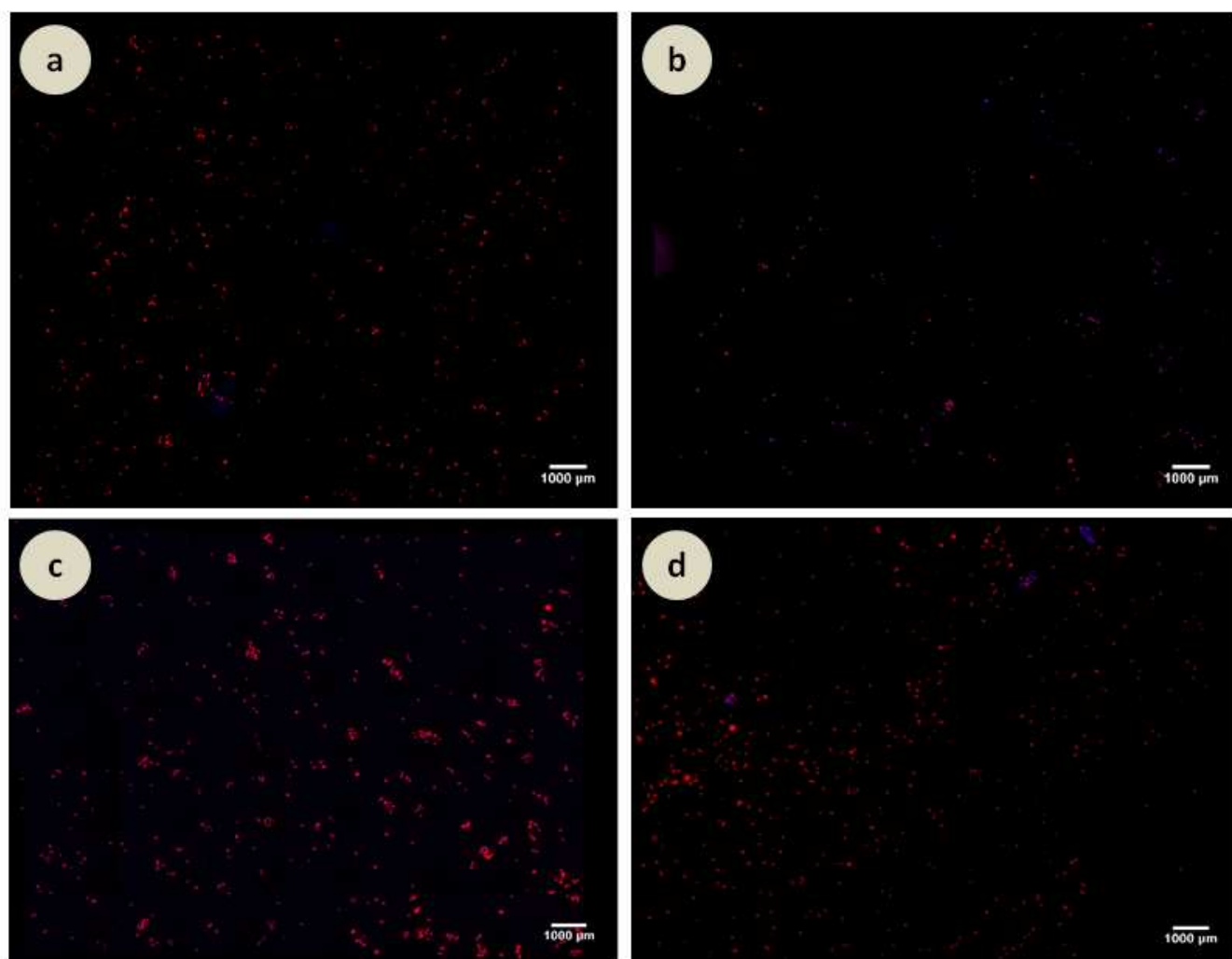


Figura 32 - Micrografias de adesão da linhagem PC3 em (a) (HA5/CHI5)_{3.5} 0Mm, (b) (HA5/CHI5)₃ 0mM, (c) (HA5/CHI5)_{3.5} 100mM e (d) (HA5/CHI5)₃ 100mM

5.3.3. Avaliação da seletividade de filmes (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM para as linhagens PC3, DU-145, LNCaP e RWPE-1

De posse dos resultados obtidos no tópico anterior, escolheram-se os filmes (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM como aqueles de maior potencial seletivo. Utilizando-se estes filmes, seguiram-se os testes de adesão celular para as linhagens DU-145, LNCaP e RWPE-1. A escolha do pH 3 como a variável de trabalho para estes testes deve-se à configuração de *loops* e *tails* assumida pelos grupos carboxilas do HA nessa faixa de pH. Em pH 3, o HA encontra-se com baixa densidade de carga, promovendo um espaçamento entre seus grupos carboxila ionizados. Dessa forma, a adesão seria

facilitada por uma conformação geométrica, que é favorecida pela baixa ionização do HA (Vasconcellos *et al.*, 2010).

Os resultados de adesão celular para todas as linhagens estão demonstrados no gráfico da Figura 33. O gráfico foi construído a partir de quatro medidas de adesão (número de células aderidas) para cada linhagem aderida na PEM (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM.

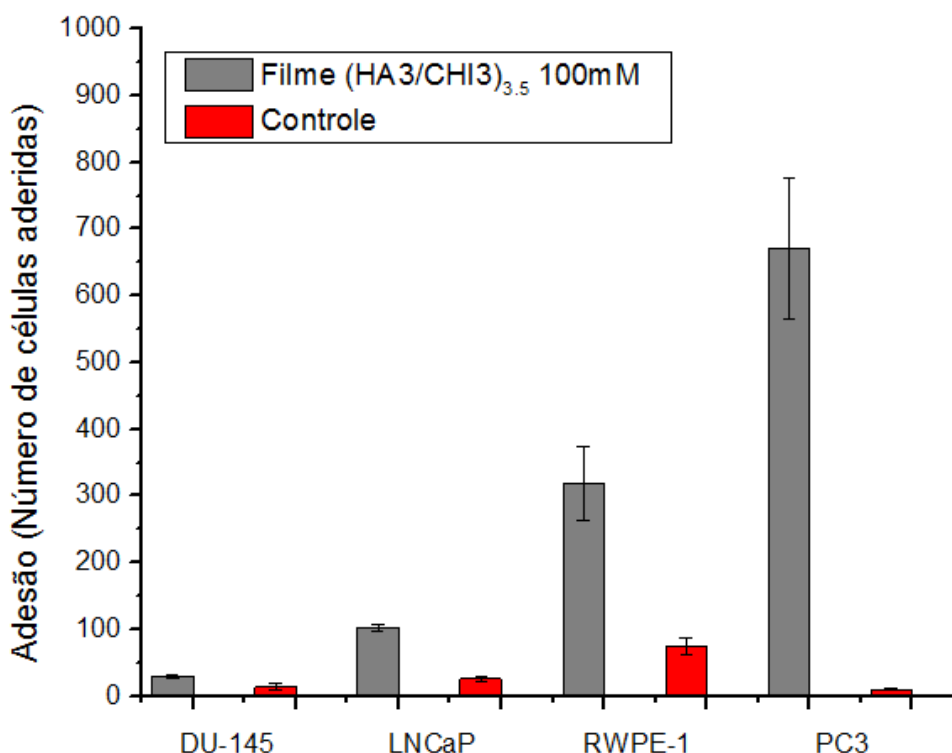


Figura 33 - Adesão celular das linhagens DU-145, LNCaP, RWPE-1 e PC3 em filmes (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM e em lâminas de vidro sem recobrimento (controle), onde a barra representa o erro padrão em torno da média

Pode-se verificar que a linhagem PC3 manteve-se com o maior número de células aderidas, conforme já indicavam os ensaios preliminares no tópico 5.4.1. Por sua vez, as linhagens tumorais LNCaP e DU-145 apresentaram valores baixos de adesão quando comparadas à linhagem PC3. Pode-se sugerir que a adesão destas linhagens seja mais fraca do que a adesão estabelecida pela linhagem PC3. As inúmeras etapas de lavagem descritas no tópico 4.2.6, não realizadas nos ensaios preliminares relatados no tópico 5.4.1, podem ter contribuído para esta diminuição

de adesão. A linhagem LNCaP, em especial, apresenta um crescimento não uniforme em monocamada e muito lento, apresentando-se na forma de aglomerados frouxamente ligados, o que reforça a suscetibilidade a sucessivas lavagens.

Estudos imuno-histoquímicos mostraram que as células tumorais de xenoenxertos de LNCaP foram negativas para CD44, enquanto as células tumorais de xenoenxertos PC3 expressam CD44 fortemente, quase em 100% e de forma difusa (Palapattu *et al.*, 2009; Marhaba R *et al.*, 2008). A expressão negativa de CD44 para a linhagem LNCaP relatada em alguns estudos talvez seja a razão pela qual os filmes de HA/CHI não se mostraram seletivos para estas células.

A linhagem DU-145 apresentou os resultados menos significativos de adesão celular. No entanto, estudos apontaram expressões positivas de CD44 nessa linhagem celular (Palapattu *et al.*, 2009). Pode-se ainda supor que a melhor condição de adesão para a linhagem PC3 não seja reproduzível para todas as linhagens.

O CD44 é uma glicoproteína composta por quatro domínios funcionais servindo como uma molécula de adesão celular para ácido hialurônico (Nagano e Okazaki, 2013). Sua isoforma normal (CD44std) é predominantemente expressa em subconjuntos de células epiteliais normais (NAOR e SIONOV, 1997). A isoforma CD44v, por sua vez, é altamente expressa em carcinomas (NAGANO e OKAZAKI, 2013).

A linhagem não-tumoral RWPE-1 foi escolhida como tentativa de controle e comparação com as linhagens tumorais. No entanto, a linhagem RWPE-1 apresentou uma medida expressiva de adesão. Estudos (NI *et al.*, 2014) apontam que expressão de CD44std foi encontrada moderadamente positiva na linhagem de células RWPE-1 e até fortemente positiva em todos os tecidos normais de próstata. Dessa forma, o significativo número de células aderidas em filmes (HA3/CHI3)_{3.5} 100Mm pode ser reflexo da expressão positiva de CD44std na linhagem RWPE-1.

Assim, a adesão de uma linhagem celular em filmes funcionalizados com ácido hialurônico pode ser relacionada com a disponibilidade de receptores CD44 presentes na matriz extracelular. O CD44 serviria dessa forma como uma espécie de marcador ou sinalizador no monitoramento da evolução prognóstica e para avaliação dos mecanismos de evolução de um tumor.

Dessa forma, entender a relação deste receptor com grupos carboxila é importante para propor mecanismos de diagnóstico. A correlação da expressão de CD44 com o perfil clínico-patológico já foi avaliado em estudos que mostraram a expressão desta molécula com leucemias que apresentavam formas tumorais da doença (CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 1997).

5.3.4. Concentração de CD44 nas linhagens tumorais

As linhagens PC3, LNCaP e DU-145 foram submetidas a uma citometria de fluxo a fim de quantificar a presença do receptor CD44 na superfície extracelular. Este ensaio foi realizado com as linhagens citadas em duas condições diferentes: i) linhagem sem nenhum tratamento e ii) tratamento com hialuronidase.

A fim de localizar os receptores CD44, utilizou-se o anticorpo anti-CD44 conjugado com marcador fluorescente. Os resultados da citometria de fluxo estão apresentados no gráfico da Figura 34 abaixo, onde a barra representa o desvio padrão em torno da média.

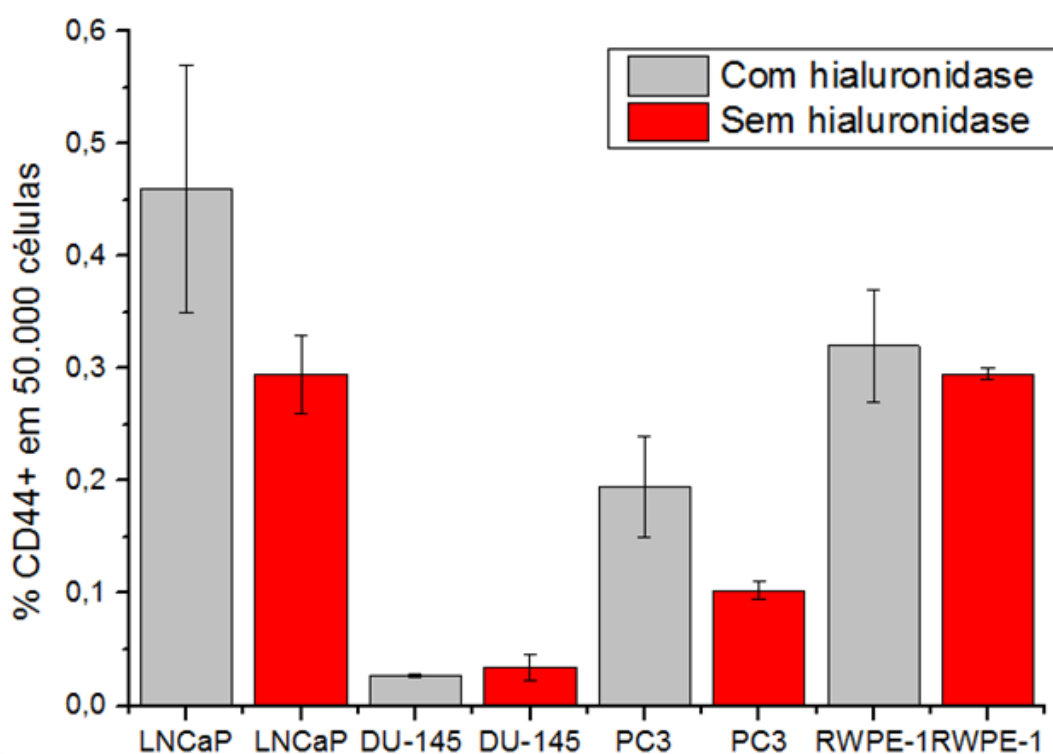


Figura 34 - Porcentagem de CD44 nas linhagens LNCaP, DU-145, PC3 e RWPE-1 nas condições de ausência e tratamento com hialuronidase

A expressiva porcentagem de CD44 presente na linhagem PC3 sugere o bom desempenho de adesão dessas células nas PEMs de HA/CHI. O resultado da significativa adesão da linhagem RWPE-1 pode também ser explicado pela significativa expressão de CD44 nesta linhagem. A reduzida porcentagem de CD44 presente na linhagem DU-145 pode ser a razão pela qual estas células apresentaram uma também reduzida adesão nas PEMs (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM, conforme apresentado no tópico 5.4.3.

A linhagem LNCaP, por sua vez, apresentou uma expressiva porcentagem de CD44 em suas células. No entanto, muitas linhagens celulares que expressam fortemente CD44 não exibem, necessariamente, interações dependentes e associadas ao HA (Miyake *et al.*, 1990). Além disso, seu crescimento em monocamada com a formação de massas disformes reforça a baixa adesão nas PEMs de HA/CHI apresentada no tópico anterior.

Verifica-se, através deste ensaio, que a hialuronidase atua na despolimerização do HA na superfície extracelular e aumenta a disponibilidade do receptor CD44 nas linhagens LNCaP e PC3. Dessa forma, as linhagens tratadas com hialuronidase apresentam um maior número de sítios CD44 potencialmente capazes de promover adesão celular em superfícies funcionalizadas com HA.

5.3.5. Influência da hialuronidase na adesão celular

A partir dos resultados da citometria de fluxo que indicaram um aumento da porcentagem de CD44 na linhagem PC3 quando tratada com hialuronidase, decidiu-se investigar a adesão destas células tratadas com hialuronidase nas PEMs (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM e (HA5/CHI5)_{3.5} 100 mM. Os resultados de adesão celular para a linhagem PC3 tratada e não tratada com hialuronidase estão apresentados na Figura 35.

Analisando-se o gráfico, conclui-se que a linhagem PC3 quando tratada com hialuronidase obteve um número de células aderidas superior à linhagem PC3 sem tratamento. Esta tendência se manteve tanto nos filmes construídos em pH 3 com um aumento em torno de 32%, quanto nos filmes construídos em pH5 com um aumento em torno de 15%.

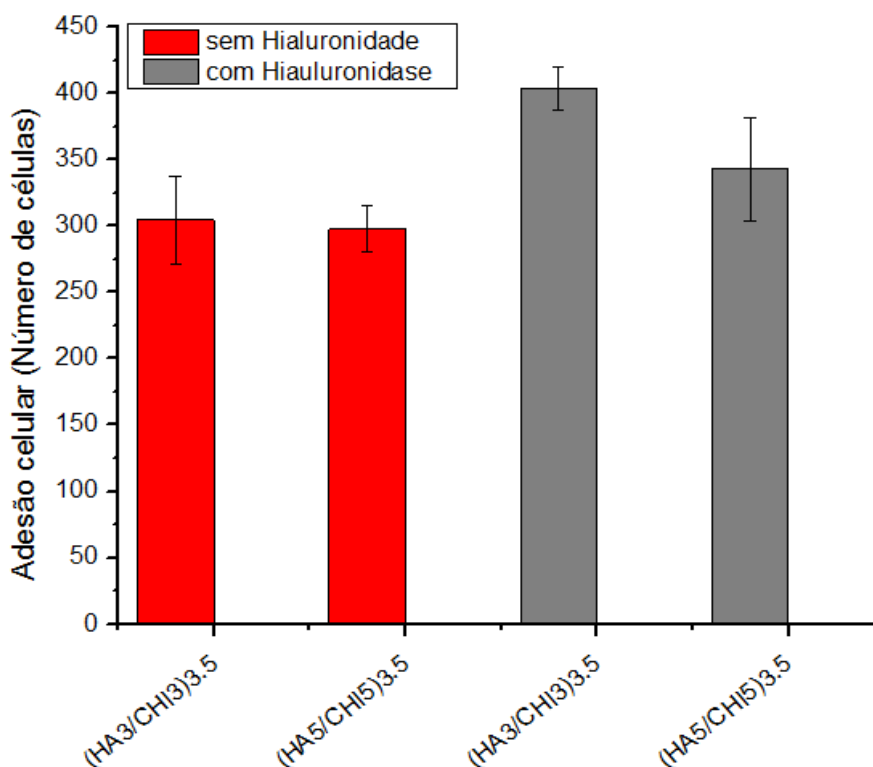


Figura 35 - Resultado da adesão da linhagem PC3 tratada e não tratada com hialuronidase em filmes de (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM e (HA5/CHI5)_{3.5} 100 mM

Considerando que a adesão celular se dê entre o par CD44-HA, pode-se apenas explicar este fenômeno analisando a disponibilidade de CD44 e HA na superfície extracelular, visto que a quantidade de HA nas PEMs permaneceu inalterada. De acordo com os resultados do tópico anterior, a ação da hialuronidase promove um aumento da disponibilidade de sítios do receptor CD44, sugerindo uma maior adesão celular, corroborando com os resultados da Figura 35.

Uma vez despolimerizado o HA presente na matriz extracelular, pode-se supor que houve uma diminuição do excesso de HA entre a célula e o filme, o que favoreceria a adesão celular. Talvez seja essa a razão do maior aumento de adesão em filmes de pH 3, já que estes apresentam maior inibição à adesão em virtude da maior disponibilidade de HA. Portanto, a adesão celular mostra-se como reflexo da maior disponibilidade de CD44 e, ainda, da diminuição de HA existente na superfície da célula.

A Figura 36 exibe uma representação da ação da hialuronidase na superfície da célula, que atua como uma espécie de disponibilizador dos receptores CD44

existentes que estavam impedidos de promover adesão por conta da presença de HA.

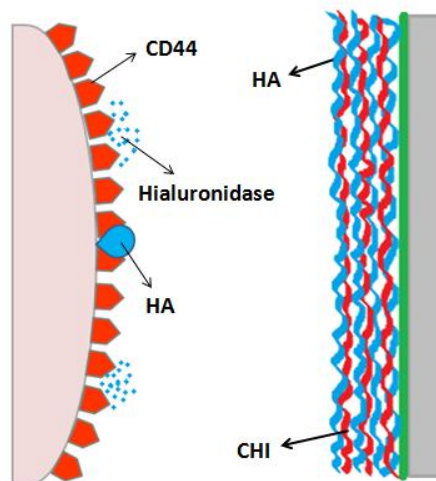


Figura 36 - Ação da hialuronidase na superfície extracelular da linhagem PC3

5.3.6. Influência do receptor CD44 na adesão celular

Decidiu-se avaliar também a influência do anticorpo específico para o receptor CD44 na adesão celular da linhagem PC3 em PEMs de $(HA3/CHI3)_{3.5}$ 100 mM. Os resultados de adesão celular para a marcação com o anti-CD44 estão apresentados na Figura 37.

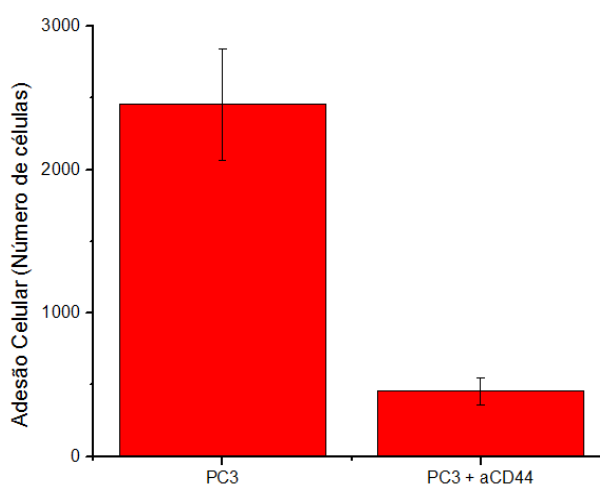


Figura 37 - Adesão celular da linhagem PC3 sem tratamento e marcadas com anti-CD44 em filmes $(HA3/CHI3)_{3.5}$ 100 mM

O anticorpo anti-CD44 tem como função ligar-se ao epítopo do receptor do CD44. Analisando a Figura 37, percebe-se que a adesão celular da linhagem PC3 marcada com o anticorpo em filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100 mM foi diminuída em torno de 80% quando comparada à adesão da linhagem PC3 sem nenhum tratamento nos mesmos filmes. Estes resultados levam à suposição que as ligações do anti-CD44 aos receptores CD44 funcionaram como espécies de bloqueadores, impedindo que estes se ligassem ao HA presente nos filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100 mM.

Estudos anteriores demonstraram uma diminuição da adesão em células de leucemia linfoblástica aguda com a utilização de um novo anticorpo para o CD44 (Bendall *et al*, 2013). O novo anticorpo de CD44 identificou um epítopo que é expresso em células de leucemia linfoblástica aguda. Tendo como função ligar-se ao domínio de ligação ao ácido hialurônico na molécula de CD44, atuou também na inibição de adesão celular. A Figura 38 apresenta uma ilustração de como ocorre essa inibição na superfície da célula.

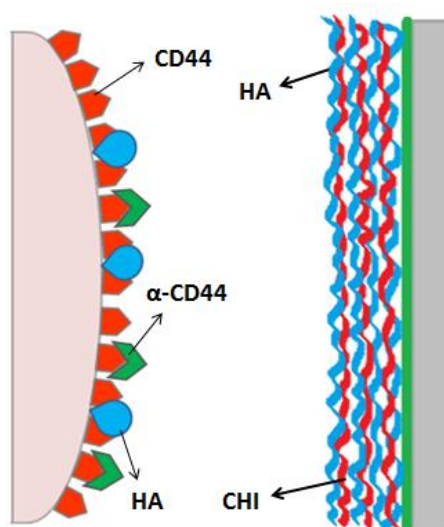


Figura 38 - Ilustração da ação do anticorpo anti-CD44 na superfície extracelular

5.3.7. Influência do HA na adesão celular

A fim de avaliar a relevância da presença de ácido hialurônico em filmes de (HAX/CHIY)_n para a promoção de adesão celular, as condições de pH 3, 100 mM e 3,5 bicamadas foram reproduzidas para a produção via LbL de filmes multicamadas formados por alginato (ALG) e quitosana (CHI) de acordo com o tópico 4.2.3. A escolha do ALG como controle para esses testes foi baseada em alguns critérios.

Assim como o HA, o ALG possui baixa densidade de cargas em pH 3 e alta densidade de cargas em pH 5, é um polímero natural biocompatível, não tóxico e comumente associado à CHI para a formação de filmes multicamadas (YANG *et al.*, 2007; VASCONCELLOS *et al.*, 2010).

Dessa forma, PEMs de (ALG3/CHI3)_{3,5} 100mM e (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM tiveram sua seletividade de captura celular avaliada com a linhagem PC3. Os resultados destes ensaios estão apresentados na Figura 39.

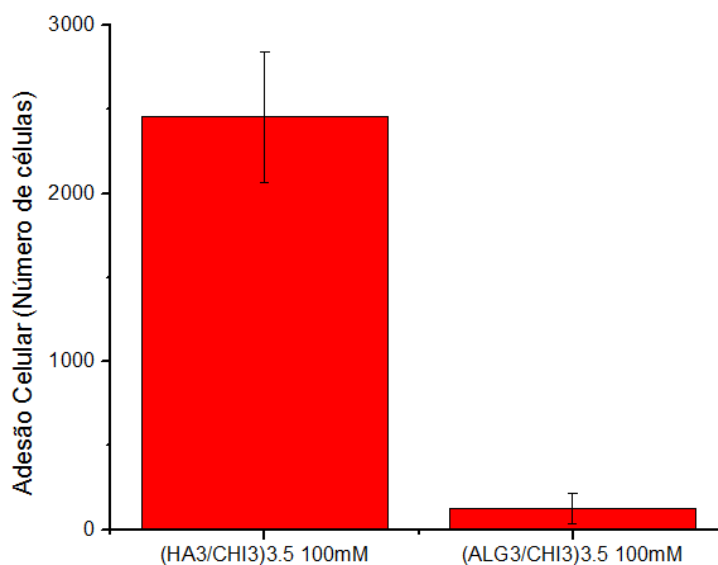


Figura 39 - Adesão celular da linhagem PC3 em filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100 mM e (ALG3/CHI3)_{3,5} 100 mM

Percebe-se que a presença do HA mostra-se fundamental para que ocorra a adesão celular, tendo em vista que esta diminui em torno de 95% quando o polieletrólito HA é trocado por ALG. A adesão ainda existente em filmes de (ALG3/CHI3)_{3,5} 100 mM pode ser explicada por atrações eletrostáticas entre as células, com cargas positivas oriundas da presença dos receptores CD44, e a superfície negativa dos filmes que contam com ALG como último polímero depositado na superfície. Também pode-se destacar o efeito de aderência, típico dessas células, como algo preponderante na adesão celular. Naturalmente, células de aderência tem a tendência de se aderirem em um determinado substrato, o que pode ser observado nas PEMs (ALG3/CHI3)_{3,5} 100 mM.

Estudos anteriores apontaram uma redução de adesão de linfócitos B em PEMs de ALG/CHI quando comparada com a adesão destas células em PEMs de

HA/CHI (Vasconcellos *et al.*, 2010). A Figura 40 exibe as micrografias de adesão da linhagem PC3 sem tratamento e marcada com anti-CD44 em PEMs de (HA3/CHI3)_{3.5} 100 mM e da mesma linhagem sem tratamento em PEMs de (ALG3/CHI3)_{3.5} 100mM.

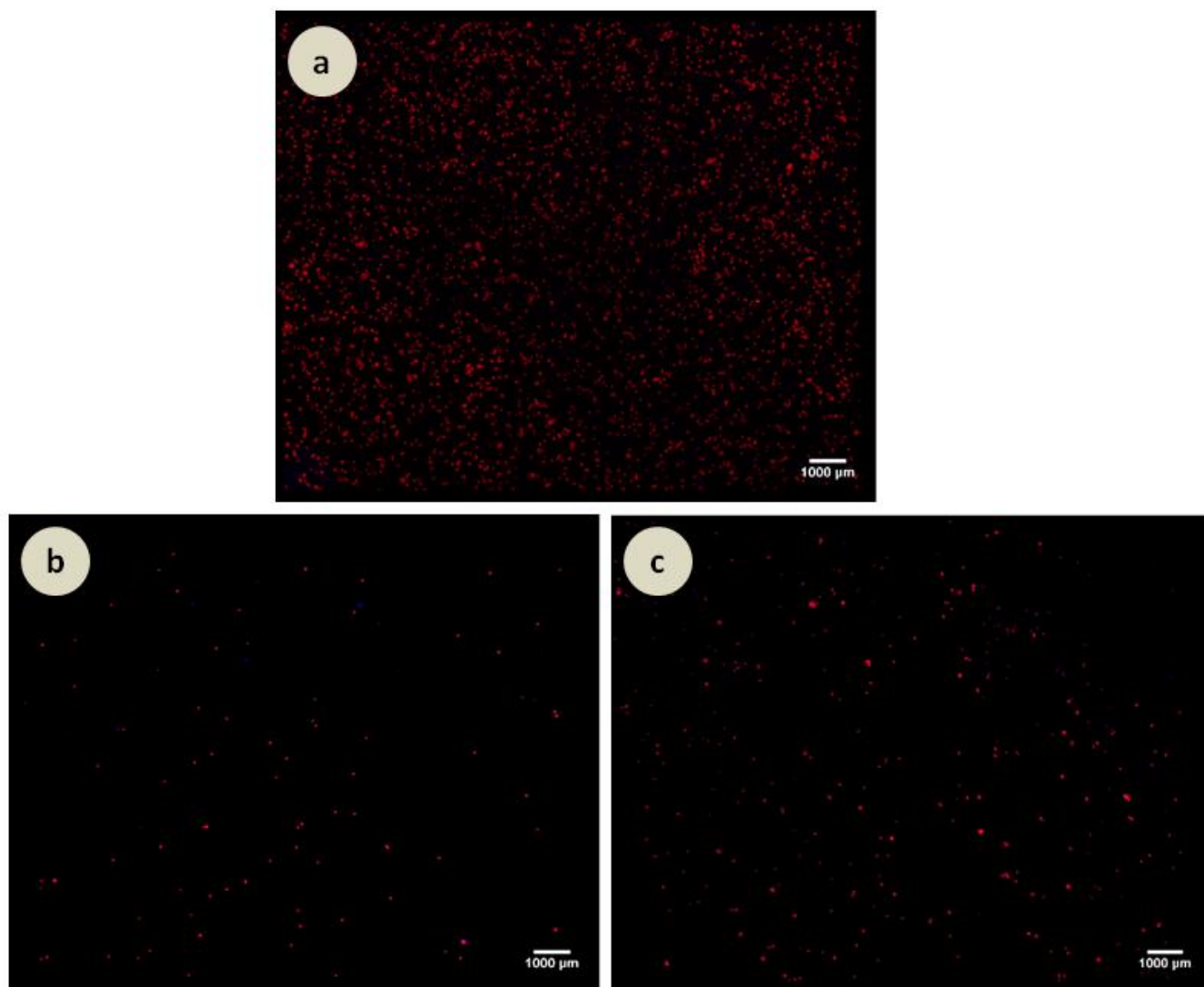


Figura 40 - Micrografias de adesão celular da linhagem PC3 (a) sem tratamento em PEMs de (HA3/CHI3)_{3.5} 100mM (b) sem tratamento em PEMs de (ALG3/CHI3)_{3.5} 100mM e (c) marcada com anti-CD44 em PEMs de (HA3/CHI3)_{3.5} 100mM

5.3.8. Avaliação do pH e grau de acetilação na adesão celular

Nestes testes, foi avaliada a captura seletiva celular da linhagem PC3 em filmes construídos com ácido hialurônico e quitosana de alto peso molecular em

diferentes graus de acetilação. Desejava-se investigar a influência do pH e grau de acetilação na adesão celular, quando fixados o número de bicamadas (3,5, ou seja, HA como polímero de topo) e a força iônica (0 mM NaCl). Os resultados de adesão em filmes de $(\text{HA/CHIX})_{3,5}$ estão apresentados na Figura 41.

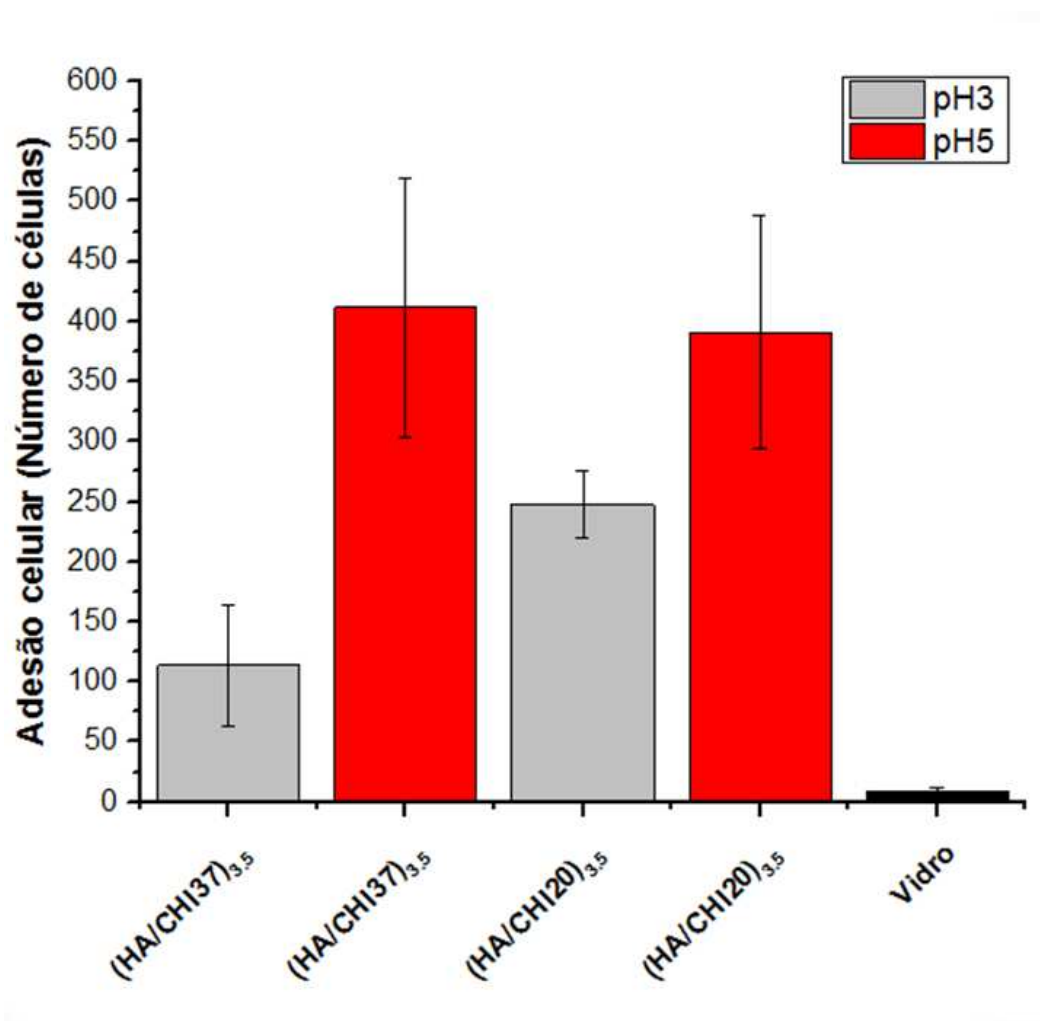


Figura 41 - Adesão celular da linhagem PC3 em filmes de $(\text{HA/CHIX})_{3,5}$, onde X é o grau de acetilação da quitosana

Os efeitos dos fatores pH e grau de acetilação (GA) sobre a adesão celular foram avaliados, individualmente e nas suas interações de ordem superior, através de um Planejamento fatorial (DOE). As variáveis são consideradas estatisticamente significantes quando possuem p-valor < 0,05. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Influência dos fatores pH e grau de acetilação (GA) sobre a adesão da linhagem PC3

Fator	Efeito	p-valor
pH	220,63	0,0001
GA	-56,63	0,1721
pH*GA	72,63	0,0698

A análise da influência dos fatores, dentro de um nível de significância de 5%, aponta que apenas a variável pH é significativa, individualmente, no número de células aderidas. Seu aumento atua promovendo um aumento da adesão celular. De maneira contrária, o grau de acetilação (GA) não se mostrou significativa nesta análise, assim como seu efeito conjugado com o pH.

Considera-se que a interação responsável pela adesão celular seja entre o ácido hialurônico presente na superfície dos filmes e o CD44, receptor específico para hialuronato presente na matriz extracelular (SWISTON *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Pode-se supor que o aumento do grau de acetilação não foi suficiente para alterar a disponibilidade de grupos carboxilas do HA na superfície das células, corroborando com os resultados de XPS apresentados no tópico 5.3.3, que apontaram uma mudança discreta na concentração do grupo C=O.

Além disso, verificou-se também que os filmes construídos em pH 5 apresentaram as menores concentrações de ácido hialurônico e os maiores valores de adesão celular. Novamente, os arranjos com as menores disponibilidades de HA mostram-se seletivamente mais eficazes na captura celular, reforçando a hipótese levantada no tópico 5.4.2, baseada no comportamento de agregação célula-célula (Underhill e Toole, 1981; Green *et al.*, 1988).

É possível concluir, através da análise DOE, que o pH afeta diretamente a superfície dos filmes e, portanto, a adesão de células sobre estes, já que atua diretamente no grau de ionização dos polímeros em estudo. A Figura 42 apresenta as micrografias de adesão das células PC3 nas PEMs estudadas nesta seção.

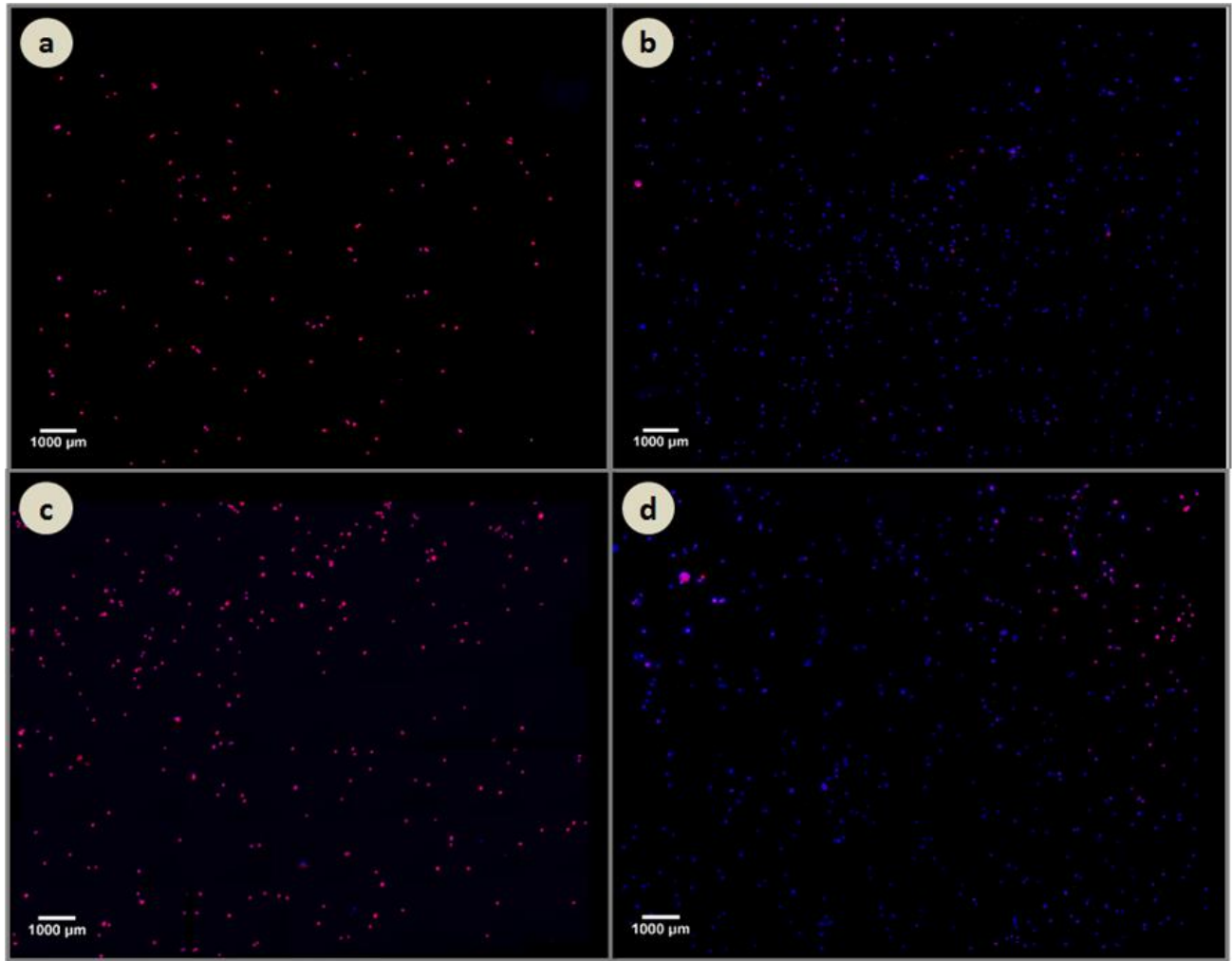


Figura 42 - Micrografias da adesão da linhagem PC3 em filmes (a) (HA/CHI37₃)_{3,5} (b) (HA/CHI37₅)_{3,5} (c) (HA/CHI20₃)_{3,5} e (d) (HA/CHI20₅)_{3,5}

6. DISCUSSÃO GERAL

A técnica *Layer-by-Layer*, de fato, mostra-se no cenário atual como uma alternativa bastante versátil, fácil e de baixo custo para o desenvolvimento de materiais com propriedades químicas e físicas bem controladas em diversas áreas da ciência. Neste trabalho, através do ajuste de variáveis experimentais como pH, força iônica, grau de acetilação das soluções polieletrólíticas e número de bicamadas depositadas, foi possível promover modificações na estrutura dos filmes multicamadas, alterando o perfil topográfico dos filmes, a disponibilidade de grupos funcionais e concentração atômica.

Estes filmes tiveram seu caráter seletivo de captura celular avaliado para diferentes linhagens tumorais. Considerando-se que a interação responsável pela adesão celular se dê entre o ácido hialurônico presente na superfície dos filmes e o CD44, receptor específico para hialuronato presente na matriz extracelular (SWISTON *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2010), o ácido hialurônico atuou como mediador direto da adesão célula-filme.

Explorando a agregação célula-célula, que se mostra inibida com altas concentrações de HA (Underhill e Toole, 1981; Green *et al.*, 1988), investigou-se a disponibilidade dos grupos carboxila do HA nos filmes HA/CHI com o auxílio das técnicas de Espectroscopia de UV-Vis e Espectroscopia de Foto-elétrons de Raios-x (XPS) a fim de entender o comportamento célula-filme. Esperava-se, dessa forma, encontrar valores de adesão mais significativos em filmes com baixas concentrações de HA. Os diferentes tipos de filmes fabricados via LbL tiveram diferentes desempenhos nos testes de adesão celular com a linhagem tumoral PC3. Os filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM e (HA5/CHI5)_{3,5} 100mM apresentaram os valores mais significativos de adesão celular durante uma hora de incubação.

Os resultados de UV-vis permitiram determinar que os filmes construídos em pH 3 apresentaram uma maior disponibilidade de grupos carboxila do HA. No entanto, o aumento da força iônica atuou como bloqueador, reduzindo a disponibilidade de grupos funcionais e aumentando a adesão celular, identificando a FI, nesses ensaios, como o fator mais decisivo para promoção de adesão nos filmes (HAX/CHIY)_n. Dessa forma, concentrações mais baixas de HA proporcionaram uma adesão mais significativa para a linhagem PC3, o que justifica o destaque dos filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM e (HA5/CHI5)_{3,5} 100mM.

Os resultados de AFM permitiram compreender que todos os parâmetros (pH, FI, número de bicamadas, GA da CHI) foram decisivos no perfil topográfico dos filmes. Apesar de entender a adesão como um fenômeno de superfície, não foi possível correlacionar os valores de rugosidade dos filmes com os resultados de adesão celular para a linhagem PC3. Dessa forma, pode-se supor que a rugosidade não atua como uma propriedade preponderante na adesão celular, sugerindo que outras características atuam de forma mais decisiva nas interações célula-filme. Pode-se ainda atribuir a diferença na ordem de tamanho do filme, numa ordem de nm, e da célula, numa ordem de μm , como um fator decisivo para a falta de influência da rugosidade no processo de adesão celular.

Em praticamente todas as condições de pH e FI, aumentar o número de bicamadas promoveu um aumento da adesão celular. Entretanto, os filmes $(\text{HA3/CHI3})_3$ 0mM apresentaram maior adesão e a metade da rugosidade quando comparados com os filmes $(\text{HA3/CHI3})_{3,5}$ 0mM, fugindo da tendência apresentada. Pode-se supor que o aumento da rugosidade, neste caso, pode ter atuado como limitante da adesão, sugerindo que superfícies mais rugosas provavelmente possam dificultar as células de estabelecerem prolongamentos e uma efetiva adesão.

Os resultados de XPS apontaram que a concentração de grupos carboxílicos do HA é diminuída significativamente com o aumento do pH e discretamente alterada com a mudança do grau de acetilação. Dessa forma, os filmes $(\text{HA/CHIX}_5)_{3,5}$ apresentaram o maior potencial seletivo, ratificando o pH como um fator-chave na fabricação das PEMs. Além disso, o acompanhamento das variações nas concentrações atômicas dos elementos na superfície realizada pela técnica de XPS permitiu o melhor entendimento das interações ocorridas no processo de construção dos filmes multicamadas de quitosana e ácido hialurônico.

Na tentativa de se compreender o comportamento da interação CD44-HA, a linhagem PC3 foi tratada com hialuronidase e marcada com o anticorpo específico para CD44. O tratamento da linhagem PC3 com o anticorpo específico para CD44 reduziu significativamente a adesão celular. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Lesley *et al.*, 1990 e Green *et al.*, 1988. O tratamento com hialuronidase, por sua vez, promoveu um aumento no número de células PC3 aderidas. A citometria de fluxo realizada corrobora com este resultado, uma vez que aponta que a porcentagem de CD44 disponível é maior nas células tratadas com

hialuronidase. Dessa forma, estes ensaios comprovam que a adesão celular, aumentada ou diminuída, é reflexo da quantidade de epítomos disponíveis dos receptores CD44.

As linhagens LNCaP e DU-145 tiveram sua adesão avaliada em filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM. No entanto, apresentaram baixas medidas de adesão quando comparadas com a linhagem PC3. A baixa adesão da linhagem DU-145 pode ser explicada pela baixa porcentagem de receptores CD44 apontada na citometria de fluxo. A linhagem LNCaP, apesar da significativa porcentagem de CD44, apresentou uma baixa adesão. Muitas linhagens celulares expressam fortemente CD44, mas não apresentam interações dependentes de HA (Miyake *et al.*, 1990). Além disso, pode-se ainda acrescentar o seu crescimento em monocamada e a formação de massas disformes como possíveis causas para a reduzida adesão.

Para reforçar a necessidade e importância do HA no processo de adesão celular, a adesão da linhagem PC3 também foi avaliada em filmes (ALG3/CHI3)_{3,5} 100 mM. A adesão destas células, quando comparadas com a adesão das mesmas em filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100 mM, foi expressivamente reduzida, em torno de 95%.

Pôde-se, através das técnicas de caracterização utilizadas e dos testes de adesão realizados, compreender quais parâmetros são significativos na construção de filmes seletivos para captura de células tumorais e entender como se comporta a interação CD44-Hialuronato, responsável pela adesão celular.

7. CONCLUSÃO

A utilização da técnica LbL foi capaz de promover a construção de PEMs de HA/CHI que se mostraram potencialmente seletivas na captura de células da linhagem tumoral PC3. Alterações de pH, força iônica, grau de acetilação da quitosana e número de bicamadas depositadas atuaram diretamente na rugosidade, na disponibilidade de grupos funcionais e concentração atômica dos filmes. De posse das técnicas de caracterização utilizadas, pôde-se perceber o HA como mediador direto no processo de adesão célula-filme. Foi possível maximizar a medida de adesão através do ajuste das variáveis pH, força iônica e número de bicamadas. Os filmes (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM e (HA5/CHI5)_{3,5} 100mM apresentaram os valores mais significativos de adesão celular.

A avaliação de adesão celular da linhagem PC3 quando tratada com hialuronidase e marcada com o anticorpo específico para CD44, assim como a troca do HA das PEMs por ALG na associação com CHI, permitiram compreender a disponibilidade de CD44 na superfície extracelular e atribuir como fator decisivo a presença do HA nos filmes para a ocorrência de adesão. Dessa forma, é possível verificar a potencial aplicação destes filmes como espécies de plataforma para a captura seletiva de linhagens tumorais prostáticas. Entendendo a linhagem PC3 como um modelo de célula tumoral, os resultados deste estudo apontam a possibilidade da utilização das técnicas e conceitos demonstrados em inúmeras aplicações, tais como mecanismos rápidos de diagnóstico, cascatas de sinalização celular e biossensoriamento.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Escolha de outra linhagem não tumoral para utilização como forma de controle e comparação com a adesão de linhagens tumorais. Recomenda-se que esta seja livre da expressão de CD44 a fim de estabelecer comprovações quanto à interação CD44-hialuronato no processo de adesão celular.
- Investigação dos parâmetros pH, força iônica, grau de acetilação da quitosana e número de bicamadas na construção de filmes seletivos para a avaliação da adesão celular das linhagens DU-145 e LNCaP. Isso seria necessário considerando-se que a configuração ótima de filme para a linhagem PC3 pode não ser reprodutível para as outras linhagens.
- Avaliação da cinética de adesão de cada linhagem por se tratarem de células aderentes, visto que o tempo mostra-se como parâmetro determinante na seletividade dos filmes construídos.
- Fabricação e caracterização de filmes por *Spray Coating*, uma vez que o método mostra-se mais rápido e proporciona uma economia de reagentes.
- Avaliação da adesão da linhagem não-tumoral RWPE-1 marcada com o anticorpo anti-CD44 em filmes CHI/HA a fim de reforçar a atribuição da adesão celular desta linhagem em virtude da expressiva presença do receptor CD44.
- Caracterização em estado úmido das PEMs de CHI/HA utilizando as técnicas de Microscopia de força atômica e Espectroscopia de UV-Visível e, também, em estado sólido após as etapas de adesão celular com o objetivo de analisar as modificações na superfície e estrutura dos filmes em ambas as condições.
- Avaliação da qualidade de adesão através da análise dos prolongamentos celulares sobre o filme a partir das microscopias sinalizadas com o corante Faloidina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5th edition. Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders. 2015.
- ARIGA, K.; HILL, J. P.; JI, Q. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 9, 2319-2340. 2007.
- ASSIS, O. B. G. e SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.13, p. 223-228. 2003.
- BANERJI, S.; WRIGHT, A. J.; NOBLE, M.; MAHONEY, D. J.; CAMPBELL, I. D.; DAY, A. J.; JACKSON, D. G. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14, 234-239. 2007
- BENDALL L. J.; JAMES, A.; ZANNETTINO A., Simmons PJ, Gottlieb DJ, Bradstock KF. A novel CD44 antibody identifies an epitope that is aberrantly expressed on acute lymphoblastic leukaemia cells. *Immunol Cell Biol*, 81(4) 311-9. 2003.
- BONGAERTS, J. H. H., COOPER-WHITE, J. J., STOKES, J. R. Low Biofouling ChitosanHyaluronic Acid Multilayers with Ultra-Low Friction Coefficients. *Biomacromolecules*, v.10, p.1287-1294. 2009.
- BOUDOU, T.; CROUZIER, T.; REN, K.; BLIN, G.; PICART, C. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* 22, 441-467. 2010.
- BUNKER, B. C., TALLANT, D. R., HEADLEY, T. J., TURNER, G. L. e KIRKPATRICK, R. J. The structure of leached sodium borosilicate glass. *Physics and Chemistry of Glasses*, v. 29, n.3, p.106-120. 1988.
- CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Effects of sonication on the reactivity of chitin towards its descatylation. *International Journal of Polymeric Materials*, v.51, n.8, p. 695-700. 2002.
- CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; SAVINO, W.; MAIA, R. C.; DOBBIN, J. A.; CARRIÇO, K.; HARAB, H. C.; OLIVEIRA, M. S. P. Correlação entre a expressão celular do CD44 e formas tumorais das leucemias linfoblásticas. *Revista brasileira de cancerologia*, 43, n1. 1997.
- CHUA, P.-H., NEOH, K.-G., KANG, E.-T. e WANG, W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*, v.29, n.10, p.1412-1421. 2008.

- CHUNG A. J., M. F. RUBNER. Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, 18 1176-1183. 2002.
- CLARK, S. L. e HAMMOND, P. T. The Role of Secondary Interactions in Selective Electrostatic Multilayer Deposition. *Langmuir*, v.16, n.26, p.10206-10214. 2000.
- CLELAND, R. L., WANG, J. L. e DETWEILER, D. M. Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid. *Macromolecules*, v.15, n.2, p.386-395. 1982.
- CROLL, T. I., O'CONNOR, A. J., STEVENS, G. W. e COOPER-WHITE, J. J. A Blank Slate? Layer-by-Layer Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan onto Various Surfaces. *Biomacromolecules*, v.7, n.5, p.1610-1622. 2006.
- DECHER, G. e SCHLENOFF, J. B. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 2002. 2008.
- DECHER, G. e SCHMITT, J. Fine-Tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Progress in Colloid Polymer Science*, v.89, p.160-164. 1992.
- DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277, 1232-1237. 1997.
- DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .3. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210, 831-835. 1992.
- DELEZUK, J. A. D .M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. *Polymer International*, v.60, n.6, p.903-909, 2011.
- DENUZIERE, A., FERRIER, D. e DOMARD, A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosanhyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers*, v.29, n.4, p.317-323. 1996.
- DICKINSON, L. E.; HO, C. C.; WANG, G. M.; STEBE, K. J.; GERECHT, S. Functional surfaces for high-resolution analysis of cancer cell interactions on exogenous hyaluronic acid. *Biomaterials* 31, 5472-5478. 2010.
- DIASPRO, A., SILVANO, D., KROL, S., CAVALLERI, O. e GLIOZZI, A. Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir*, v.18, n.13, p.5047- 5050. 2002.
- DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S.; BYRNE, J. D. Macrophages Recognize Size and Shape of Their Targets. *Plos One*, 5. 2010.

- DOSHI, N.; SWISTON, A. J.; GILBERT, J. B.; ALCARAZ, M. L.; COHEN, R. E.; RUBNER, M. F.; MITRAGOTRI, S. Cell-Based Drug Delivery Devices Using Phagocytosis-Resistant Backpacks. *Advanced Materials*, 23, H105-H109. 2011.
- DUBAS, S. T. e SCHLENOFF, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules*, v.32, n.24, p.8153-8160. 1999.
- DUBAS, S. T. e SCHLENOFF, J. B. Swelling and Smoothing of Polyelectrolyte Multilayers by Salt. *Langmuir*, v.17, n.25, p.7725-7727. 2001.
- ELZBIECIAK, M.; KOLASIŃSKA, M.; ZAPOTOCZNY, S.; KRASSTEV R.; NOWAKOWSKA, M.; WARSZYŃSKI, P. Nonlinear growth of multilayer films formed from weak polyelectrolytes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343, 89-95. 2009.
- ETIENNE, O., SCHNEIDER, A., TADDEI, C., RICHERT, L., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C., EGLES, C. e PICART, C. Degradability of Polysaccharides Multilayer Films in the Oral Environment: an in Vitro and in Vivo Study. *Biomacromolecules*, v.6, n.2, p.726-733. 2005.
- FAGNOLA, M., PAGANI, M. P., MAFFIOLETTI, S., TAVAZZI, S. e PAPAGNI, A. Hyaluronic acid in hydrophilic contact lenses: Spectroscopic investigation of the content and release in solution. *Contact Lens & Anterior Eye : The Journal of the British Contact Lens Association*, v.32, n.3, p.108-112. 2009.
- FAUZI, M. B.; LOKANATHAN, Y.; AMINUDDIN, B. S.; RUSZYMAH, B. H. I.; CHOWDHURY, S. R. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thin films for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 163-171. 2016.
- FENG, Q., ZENG, G., YANG, P., WANG, C. e CAI, J. Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.257-258, p.85-88. 2005.
- FERREIRA, A. A. P. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA APLICADA EM IMUNOENSAIOS. Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 137-142, 2006.
- FERY, A.; SCHOLER B.; CASSAGNEAU T., CARUSO F., Nanoporous Thin Films Formed by Salt- Induced Structural Changes in Multilayers of Poly(acrylic acid) and Poly(allylamine), *Langmuir*, 17, 3779-3783. 2001.
- FOUDA, M. M. G.; SHAFEI, A. E. L; SHARAF, S., HEBEISH, A. Microwave curing for producing cotton fabrics with easy care and antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers*, 77 651-655. 2009.

- GILBERT, J. B.; O'BRIEN, J. S.; SURESH, H. S.; COHEN, R. E.; RUBNER, M. F. Orientation Specific Attachment of Polymeric Microtubes on Cell Surfaces. *Advanced Materials*, 25, 5948-5952. 2013.
- GILBERT, J. B.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E. Depth-profiling X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis of interlayer diffusion in polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 6651-6656. 2013.
- GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH, P. J. C., THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *Febs Letters*, v. 32, p. 195-198, 1973.
- GREEN, S. J., TARONE, G., AND UNDERHILL, C. B. Aggregation of macrophages and fibroblasts is inhibited by a monoclonal antibody to the hyaluronate receptor, *Exp. Cells Res.* 178:224-232, 1988.
- HILLBERG, A. L. e TABRIZIAN, M. Biorecognition through Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly: In-Situ Hybridization on Living Cells. *Biomacromolecules*, v.7, n.10, p.2742- 2750. 2006.
- HAY, Elizabeth D. **Cell Biology of Extracellular Matrix**. Second Edition. New York: Plenum Press, 1991.
- HUCK, W. T. S., STROOCK, A. D. e WHITESIDES, G. M. Synthesis of Geometrically Well Defined, Molecularly Thin Polymer Films. *Angewandte Chemie International Edition*, v.39, n.6, p.1058-1061. 2000.
- ICZKOWSKI, K. A.; BAI, S.; PANTAZIS, C. G. Prostate cancer overexpresses CD44 variants 7-9 at the Messenger RNA and protein level. *Anticancer Res.* 23:3129-40, 2003.
- ILER, R. K., Multilayers of Colloidal Particles. *Journal of Colloid Interface Science*, v.21, p.569- 594. 1966.
- J. HERNÁNDEZ-MONTELONGO, E.G. Lucchesi, I. Gonzalez, W.A.A. Macedo, V. F. NASCIMENTO, A. M. MORAES M.M. BEPPU; M.A. COTTA. Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: an antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 141 499-506, 2016.
- JIN, R.-H.; YUAN, J.-J. Biomimetically Controlled Formation of Nanotextured Silica/Titania Films on Arbitrary Substrates and Their Tunable Surface Function. *Advanced Materials*, 21, 3750-3753. 2009.
- JOENSUU, H.; KLEMI, P. J., TOIKKANEN, S.; JALKANEN, S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol.* 143: 867-74, 1993.

- KING, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). *Food Hydrocolloids*, v. 2, p. 115-188, 1983.
- KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F.; MISTRY, J.; MIRAFAT, M.; SMART, G.; GROOCKOCK, M. R.; WILLIAMS, H. J. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 55, 65-76. 2004.
- KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29, 17-25. 2007.
- KOTZ, J. Polyelectrolyte Complexes (Overview). Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 1996.
- KUMAR, M. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 46, 1-27. 2000.
- LAPIK, L. J. Hyaluronan Preparation, structure, properties and applications. *Chemical reviews*, v.98, .8, p. 2662-2684, 1998.
- LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous desactylation of and chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*, v.5, n.3, p.992-1001, 2004.
- LAJIMI, R. H., ABDALLAH, A. B., FERJANI, E., ROUDESLI, M. S. e DERATANI, A. Change of the performance properties of nanofiltration cellulose acetate membranes by surface adsorption of polyelectrolyte multilayers. *Desalination*, v.163, n.1-3, p.193-202. 2004.
- LAUGEL, N., BETSCHA, C., WINTERHALTER, M., VOEGEL, J. C., SCHAAF, P. e BALL, V. Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, n.39, p.19443-19449. 2006.
- LAVALLE, P.; GERGELY, C.; CUISINIER, F.J.G.; DECHER, G.; SCHAAF, P., VOEGEL, J.C.; PICART, C.. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules*, 35, 4458-4465. 2002.
- LEE, H.; GILBERT, J. B.; ANGILÈ, F. E.; YANG, R.; LEE, D.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, (1), 1004-1011. 2015.
- LESLEY, J.; ENGLISH, N.; CHARLES, C.; HYMAN, R. The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding. *Eur J Immunol.* 30:245-253, 2000.

- LICHTER, J. A. e RUBNER, M. F. Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations. *Langmuir*, v.25, n.13, p.7686-7694. 2009.
- LICHTER J. A., K. J. VAN VLIET, M. F. RUBNER. Desing of antibacterial surfaces and interfaces: polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform. *Macromolecules*, 42 8573-8586. 2009.
- LIU, Y.; LU, H.; ZHONG, W.; SONG, P.; KONG, J.; YANG, P.; GIRAULT, H. H.; LIU, B. Multilayer-Assembled Microchip for Enzyme Immobilization as Reactor Toward LowLevel Protein Identification. *Analytical Chemistry*, v.78, p.801-808. 2006.
- LIU, Y.; TAN, J.; THOMAS, A.; OU-YANG, D.; MUZYKANTOV, V. R. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Therapeutic delivery* 2012, 3, 181-94.
- BOHMER, M. R.; EVERS, O. A., SCHEUTJENS, J.M.H.M. Weak polyelectrolytes between two surfaces: adsorption and stabilization, *Macromolecules*, 23, 2288-2301. 1990.
- MARHABA, R.;KLINGBEIL, P.; NUEBEL, T., NAZARENKO, I.; BUECHLER, M. W.; , ZOELLER, M. CD44 and EpCAM: Cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med*.;8:784–804. 2008.
- MIYAKE, H.; HARA, I.; OKATOMO, I.; GOHJI, K.; YAMANAKA, K.; ARAKAWA, S.; SAYA, H.; KAMIDONO, S. Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J Urol*. 160:1562-6. 1998.
- MOE, S. T., DRAGET, K. I., SKJAK-BRAEK, G., SMIDSRØD, O. Alginates. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications*, New York: Marcel Dekker, p. 245-286, 1995.
- MOON, J. J.; SUH, H.; BERSHTEYN, A.; STEPHAN, M. T.; LIU, H. P.; HUANG, B.; SOHAIL, M.; LUO, S.; UM, S. H.; KHANT, H.; GOODWIN, J. T.; RAMOS, J.; CHIU, W.; IRVINE, D. J. Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoraland cellular immune responses. *Nature Materials* 2011, 10, 243-251.
- NAGANO, O.; OKAZAKI, S.; SAYA, H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene* 2013;32(44): 5191–5198.
- NAOR, D.; SIONOV, R. V., ISH-SHALOM, D. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241–319
- NECAS, J; BARTOSIKOVA. L.; BRAUNER, P; J., K. Hyaluronic acid (hyaluronan) a reviem. *Veterinarni Medicina*, v.53, n.8, p.397-411, 2008.
- NI, J.; COZZI, P. J.; HAO, J. L.; BERETOV, J.; CHANG, L.; DUAN, W.; SHIGDAR, S.; DELPRADO, W. J.; GRAHAM, P. H.; BUCCI, J.; KEARSLEY, J. H.; YONG,

- L. CD44 Variant 6 is Associated With Prostate Cancer Metastasis and Chemo-/Radioresistance. *Prostate* 74(6):602-17, 2014.
- PALAPATTU, G. S.; WU, C.; SILVERS, C. R.; MARTIN, H. B.; WILLIAMS, K.; SALAMONE, L.; BUSHNELL, T.; HUANG, L. S.; YANG, Q.; HUANG, J. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cells of human prostate cancer. *Prostate*. 2009;69:787–798.
- PARADIS, V.; ESCHWEGE, P.; LORIC, S.; DUMAS, F.; NATHALIE, B.; BENOIT, G.; JARDIN, A.; BEDOSSA, P. De novo expression of CD44 in prostate cancer. *Clin. Pathol.* 51:798-802, 1998.
- PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 33-45, 2003.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer Science*, v. 34, n.7, p. 641-678, 2009.
- Ren K., Y. Wang, J. Ji, Q. Lin, J. Shen, Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: Effect of ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46 (2005) 63-69.
- RICHERT, L., ENGLER, A. J., DISCHER, D. E. e PICART, C. Elasticity of Native and CrossLinked Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules*, v.5, n.5, p.1908. 2004 B.
- RICHERT, L., LAVALLE, P., PAYAN, E., SHU, X. Z., PRESTWICH, G. D., STOLTZ, J.-F., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C. e PICART, C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir*, v.20, n.2, p.448- 458. 2004 A.
- RICHERT, L., LAVALLE, P., VAUTIER, D., SENGER, B., STOLTZ, J. F., SCHAAF, P., VOEGEL, J. C. e PICART, C. Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules*, v.3, n.6, p.1170-1178. 2002.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632, 2006.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57, 397-430. 2008.
- RINAUDO, M., PAVLOV, G. e DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, v.40, n.25, p.7029-7032. 1999.
- RIVA, R.; RAGELLE, H.; DES RIEUX, A.; DUHEM, N.; JEROME, C.; PREAT, V. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Chitosan for Biomaterials li*, 244, 19-44. 2011.

- ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. London: The Macmillian Press. 1992.
- SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v.13, n.4, p.242-249. 2003.
- SCHNEIDER, A., PICART, C., SENGHER, B., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C. e FRISCH, B. Layerby-Layer Films from Hyaluronan and Amine-Modified Hyaluronan. *Langmuir*, v.23, n.5, p.2655-2662. 2007 A.
- SCHNEIDER, A., RICHERT, L., FRANCIUS, G., VOEGEL, J.-C. e PICART, C. Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films. *Biomedical Materials*, v.2, n.1, p.S45-S51. 2007 C.
- SCHNEIDER, A., VODOUHE, C., RICHERT, L., FRANCIUS, G., LE GUEN, E., SCHAAF, P., VOEGEL, J.-C., FRISCH, B. e PICART, C. Multifunctional Polyelectrolyte Multilayer Films: Combining Mechanical Resistance, Biodegradability, and Bioactivity. *Biomacromolecules*, v.8, n.1, p.139-145. 2007 B.
- SCHNEIDER, A.; VODOUHE, C.; RICHERT, L.; FRANCIUS, G.; LE GUEN, E.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J.-C.; FRISCH, B.; PICART, C. Multifunctional polyelectrolyte multilayer films: Combining mechanical resistance, biodegradability, and bioactivity. *Biomacromolecules*, 8, 139-145. 2007.
- SHIRATORI, S. S. e RUBNER, M. F. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*, v.33, n.11, p.4213-4219. 2000.
- SIGNINI, R. CAMPANA-FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.11, n.2, p.58-64. 2001.
- SIGNINI, R. DESBRIÈRES, J.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, n.4, p.351-357. 2000.
- SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Chitosan: Hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. *Química Nova*, 29, 776-785. 2006.
- SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. Faraday Discuss. *Chemical Society*, v. 57, p. 263-274. 1974.
- SMULOVITZ, C.; DICKINSON, L. E.; GERECHT, S. Micropatterned Surfaces for the Study of Cancer and Endothelial Cell Interactions with Hyaluronic Acid. *Israel Journal of Chemistry*, 53, 710-718. 2013.

- STOCKTON, W. B. e RUBNER, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules*, v.30, n.9, p.2717-2725. 1997.
- SUCH, G. K., JOHNSTON, A. P. R., CARUSO, F. Engineered hydrogen-bonded polymer multilayers: from assembly to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, v.40, p.19-29. 2011.
- SVALDO-LANERO, T., KROL, S., MAGRASSI, R., DIASPRO, A., ROLANDI, R., GLIOZZI, A. eCAVALLERI, O. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy*, v.107, n.10-11, p.913-921. 2007.
- SWISTON, A. J.; CHENG, C.; UM, S. H.; IRVINE, D. J.; COHEN, R. E.; RUBNER, M. F. Surface Functionalization of Living Cells with Multilayer Patches. *Nano Letters*, 8, 4446-4453. 2008
- 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. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2013.
- TAKETA, T. B.; BEPPU, M. M. Layer-by-Layer Thin Films of Alginate/Chitosan and Hyaluronic Acid/Chitosan with Tunable Thickness and Surface Roughness. *Materials Science Forum*, v. 783-786, p. 1226-1231. 2014.
- TAMMI, M. I.; DAY, A. J.; TURLEY, E. A. Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4581-4584. 2002.
- TAO, X., CHEN, H., SUN, X.-J., CHEN, J.-F. e ROA, W. H. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin loaded in self-assembled bio-polyelectrolyte microshells. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, n.2, p.376-381. 2007.
- THIERRY, B., WINNIK, F. M., MERHI, Y., SILVER, J. e TABRIZIAN, M. Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules*, v.4, n.6, p.1564-1571. 2003.
- TOOLE, B. P. Hyaluronin in Morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 12:79-87. 2001.
- TOOLE, B. P.; WIGHT, T. N.; TAMMI, M. I. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4593-4596. 2002.
- UNDERHILL, C. B.; TOOLE, B. P. Receptors for hyaluronate on the surface of parent and virus-transformed cell lines – Binding and aggregations studies. *Exp. Cell Res*. 131:419-424, 1981.
- UHLSTEIDL, M.; MULLERHOLZNER, E.; ZEIMET, A. G.; ADOLF, G. R.; DAXENBICHLER, G.; MARTH, C.; DAPUNT, O. Prognostic value of CD44 splice variant expression in ovarian cancer. *Oncology* 52:400-06, 1995.

- VASCONCELLOS, F. C.; SWISTON, A. J.; BEPPU, M. M.; COHEN, R. E.; RUBNER, M. F. Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: Hyaluronic Acid Mediated B Lymphocyte Adhesion. *Biomacromolecules*, 11, 2407-2414. 2010.
- VASCONCELLOS, F. C. **Produção de nanoestruturas de biopolímeros através de deposição “Layer-by-Layer” com propriedades antibacterianas e de imobilização de linfócitos** . Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.
- WANG, K.; WANG, W.; YE, R.; LIU, A.; XIAO, J.; LIU, Y.; ZHAO, Y. Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: Effect of starch type and concentrations. *Food Chemistry*, 216, 209-216. 2016.
- W.R. GOMBOTZ, S. WEE. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267-285. 1998.
- WHITEMAN, P. The Quantitative Measurement of Alcian Blue-Glycosaminoglycan Complexes. *Biochem. J.*, v.131, p.343-350. 1973.
- WU, M.-Y., CHEN, N., LIU, L.-K., YUAN, H, LI, Q.-L. e CHEN, S.-H. Chitosan/Alginate Multilayer Scaffold Encapsulating Bone Marrow Stromal Cells *In Situ* on Titanium. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.24, p301-315. 2009.
- YAMANLAR S., S. SANT, T. BOUDOU, C. PICART, A. KHADEMHOSEINI. Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 32, 5590-5599. 2001
- YANG, Y.; HE, Q.; DUAN, L.; CUI, Y.; LI, J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*, 28, 3083-3090. 2007.
- YAN, L., HUCK, W. T. S., ZHAO, X.-M. e WHITESIDES, G. M. Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) on a Reactive SAM Using Microcontact Printing. *Langmuir*, v.15, n.4, p.1208-1214. 1999.
- YANG, Y., HE, Q., DUAN, L., CUI, Y. e LI, J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*, v.28, n.20, p.3083-3090. 2007.
- YE, S., WANG, C., LIU, X. e TONG, Z. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *Journal of Controlled Release*, v.106, n.3, p.319-328. 2005.
- YONG-WOO, C.; JINHO, J; CHONG, R.P.; SOHK-WON. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, v.1, n.4, p. 609-614, 2000.

- YOO, D.; SHIRATORI, S. and RUBNER, M. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 31(13), p. 4309-4318, 1998.
- ZOLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from na abundantly expressed molecule. *Nature Reviews Cancer* 11:254-267. 2011.

ANEXOS

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As Figuras 43 e 44 abaixo apresentam os resultados de MEV para alguns filmes de (HAX/CHIY)_n.

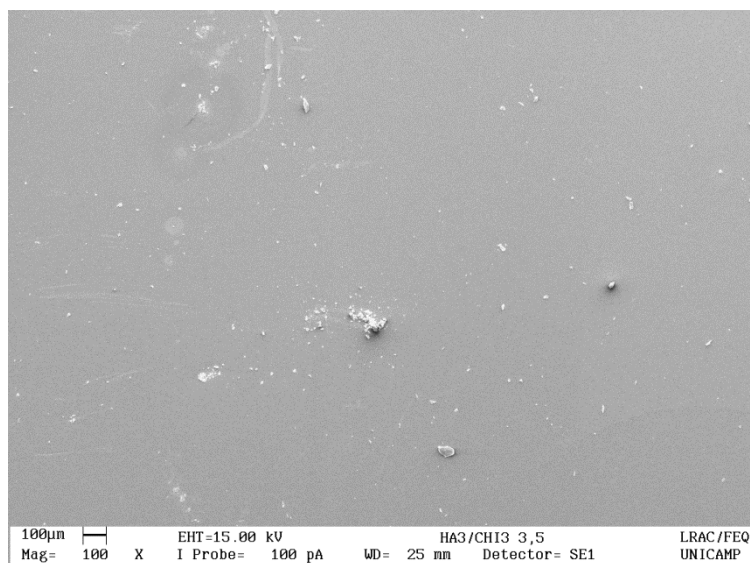


Figura 43 - MEV da superfície do filme (HA3/CHI3)_{3,5} 100mm

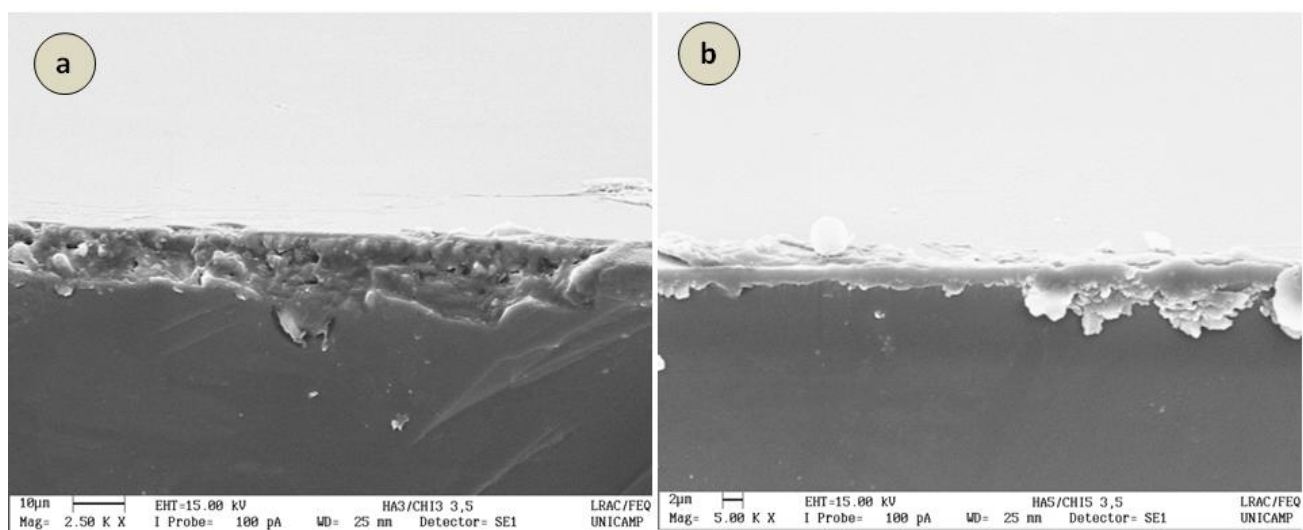


Figura 44 - MEV da seção transversal dos filmes (a) (HA3/CHI3)_{3,5} 100mm e (b) (HA5/CHI5)_{3,5} 100mm

Observando-se as microscopias, pode-se perceber que o MEV não foi suficiente para determinar a espessura dos filmes multicamadas através das seções transversais. Superficialmente, o MEV também não conseguiu identificar a rugosidade dos filmes. Esta técnica foi utilizada em quase todas as condições de filmes estudadas neste trabalho, não apontando em nenhum dos casos bons resultados.

ÂNGULO DE CONTATO

A Figura 45 apresenta os resultados das medidas de ângulo de contato para filmes contendo 3 e 3,5 bicamadas depositadas, respectivamente. É possível concluir que os filmes contendo HA no topo (3,5 bicamadas) apresentam maior caráter hidrofílico em virtude do menor ângulo entre o plano em que se encontra a gota e a tangente que passa pela sua superfície. A maior hidrofiliabilidade nestes filmes pode ser explicada pela presença dos grupos funcionais carboxila e hidroxila do HA.

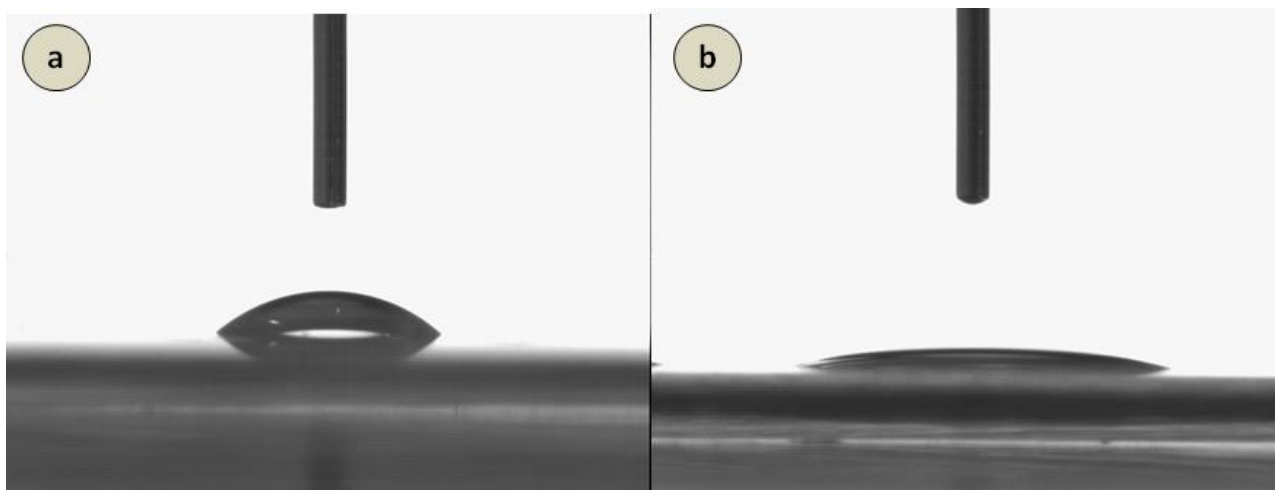


Figura 45 - Imagem de gota de 5µL depois de 10s em filme (a) (HA3/CHI3)₃ 100mM e (b) (HA3/CHI3)_{3,5} 100mM

A dificuldade desta análise se encontrou na determinação do ângulo de contato nos filmes de 3,5 bicamadas, uma vez que o goniômetro não foi capaz de medir este ângulo. O problema não ocorreu nos filmes de 3 bicamadas. Esta tendência foi repetida em todas as condições de filme com 3 e 3,5 bicamadas, revelando os filmes com CHI no topo como os mais hidrofóbicos.

Na tentativa de contornar o problema, o tempo e volume da gota foram diminuídos, mas não resultou efeito nas medições. Dessa forma, é possível concluir que o polímero do topo atua diretamente na capacidade de molhabilidade da superfície, podendo-se, assim, utilizar a adsorção sequencial dos polieletrólitos HA e CHI para controlar o caráter hidrofílico da superfície.