Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Estudo das interações de proteínas osteogênicas com lipídios em
filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett”**

Thais Tognoli Paterlini

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Estudo das interações de proteínas osteogênicas com lipídios em
filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett”**

Thais Tognoli Paterlini

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Paterlini, Thais Tognoli

Estudo das interações de proteínas osteogênicas com lipídios em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Ribeirão Preto, 2018.

81 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Colágeno. 2. Anexina. 3. Langmuir-Blodgett

“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro”.

(Leonardo da Vinci)

Dedicatória

À minha mãe Fátima por ter me incentivado e sonhado junto comigo por esse título;

Ao meu pai Carlos pelo apoio incondicional;

À minha irmã Tatiana por ser meu exemplo.

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e aos meus Anjos de Luz por guiarem meus passos.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ramos, por ter me recebido tão bem, pelos conhecimentos transmitidos e por toda ajuda, tanto na minha vida acadêmica, quanto na vida pessoal. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides: Marco, Rafael, Vanessa, Débora, Lucas Urbano e Larissa. Muito obrigada por todos os momentos especiais que passamos juntos. Em especial, aos amigos Camila, Tamires e Lucas por todos os momentos, dentro e fora da USP. Mais especial ainda, ao grande amigo Marcos, pela paciência, me auxiliando nos experimentos e nas discussões do trabalho e principalmente, levando alegria aos meus dias. Levarei sempre vocês em meu coração.

Ao Laboratório de Sistemas Biomiméticos de Membrana e principalmente ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pela colaboração e pela disponibilidade de reagentes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, em especial aos técnicos Rodrigo e Lourivaldo pela colaboração nas análises desse trabalho.

À minha mãe (eternamente presente no meu coração), ao meu pai e à minha irmã: sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus avós: Nello, Izabel, Santo e Aparecida, por serem a base da minha família e exemplos de humildade e amor.

Ao Fernando, pela cumplicidade e pelo incentivo.

À Ana Júlia, minha irmã do coração.

À Cecília, por alegrar os meus dias. Meu amor por você é incondicional.

Ao Humberto, pelo carinho, amizade e apoio, tornando essa jornada muito mais simples.

À Cacau e Babi, pela alegria e amor de todos os dias.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pela bolsa e auxílios ao Laboratório.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido”

(Marie Curie)

Índice

Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vii
Símbolos, siglas e abreviaturas	viii
1 Introdução	16
1.1 Membrana celular	16
1.2 Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett	17
1.3 Interação lipídio-proteína	23
1.4 Tecido ósseo	24
1.5 Biomineralização óssea	26
1.5.1 Anexina	28
1.6 Biomateriais	29
1.6.1 Titânio	30
1.7 Principais técnicas de caracterização dos filmes LB	32
1.7.1 Quantificação da massa depositada - Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)...	32
1.7.2 Espectroscopia de Infravermelho	33
1.7.3 Difração de raios X	34
1.7.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
1.7.5 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície	35
2 Objetivos	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 Materiais e Métodos	40
3.1 Materiais	40
3.2 Preparo da solução de colágeno	40
3.3 Obtenção da AnxA5	40
3.4 Monocamadas de Langmuir	41
3.4.1 Monocamadas de lipídio puro	41
3.4.2 Monocamadas mistas de lipídios, colágeno e AnxA5	42
3.5 Pré-tratamento dos suportes metálicos para deposição dos filmes LB	42
3.6 Formação dos filmes LB e das matrizes orgânicas	43
3.7 Preparo do SBF	44
3.8 Caracterização dos Filmes LB.....	45
3.8.1 Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)	45
3.8.2 Espectroscopia de Infravermelho	45
3.8.3 Difração de raios X	45
3.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	46

3.8.5 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície	46
4 Resultados e Discussão	48
4.1 Caracterização das Monocamadas de Langmuir de DPPC	48
4.1.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir de DPPC	51
4.2 Caracterização das Monocamadas de Langmuir de DPPS	53
4.2.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir de DPPS	55
4.3 Caracterização das Monocamadas de Langmuir mistas de DPPC e DPPS	57
4.3.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir mistas de DPPC e DPPS	60
4.4 Formação dos Filmes LB	61
4.5 Caracterização dos Filmes Langmuir-Blodgett	61
4.5.1 Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)	61
4.5.2 Avaliação da bioatividade dos filmes LB.....	62
a) Espectroscopia de Infravermelho.....	63
b) Difração de raios X.....	65
c) Microscopia Eletrônica de Varredura.....	66
4.5.3 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície	68
5 Conclusões	71
6 Referências	74

Resumo

PATERLINI, Thais T. **Estudo das interações de proteínas osteogênicas com lipídios em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett**. 2018. 61 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O estudo das propriedades das membranas celulares, assim como sua interação com íons e moléculas é de fundamental importância para o entendimento de processos biológicos complexos, como a formação do tecido ósseo. O osso natural é constituído por compostos orgânicos, especialmente proteínas como o colágeno, e por minerais, como a hidroxiapatita. O processo pelo qual ocorre a formação do componente inorgânico é chamado de biomineralização, um processo complexo mediado pela liberação de vesículas da matriz (VM), secretadas em locais específicos a partir de osteoblastos. Essas VM são ricas nas principais biomoléculas envolvidas nesse processo, como as proteínas anexina, em especial a anexina V (AnxA5), que exercem papel importante como, formação de canais de cálcio e ligação com o colágeno, criando assim um microambiente adequado para a formação inicial e propagação dos cristais de hidroxiapatita a partir de fibrilas de colágeno. No presente estudo foi possível incorporar colágeno e AnxA5 em sistemas modelo para estudos de biomineralização, utilizando-se monocamadas de Langmuir e os filmes Langmuir-Blodgett (LB). As monocamadas foram formadas com os principais grupos carregados de lipídios encontrados nas VM: fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilserina (PS). As monocamadas formadas por lipídios, colágeno e AnxA5 foram depositadas sobre discos de titânio utilizando-se a técnica dos filmes LB. Os filmes formados foram expostos a uma solução que simula o pH e força iônica do fluido corpóreo, de maneira a mimetizar a precipitação de hidroxiapatita. As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e difração de raios X (EDX). Além disso, estudou-se as propriedades de molhabilidade e energia livre de superfície das amostras de titânio modificadas. Colágeno e AnxA5 interagiram com os lipídios, como mostrado nas isotermas. Interação preferencial foi observada no sistema binário contendo DPPC e DPPS e na presença de íons cálcio, como ocorre nos sistemas naturais. A presença das proteínas e dos fosfolipídios nos filmes LB sobre as superfícies de titânio foram essenciais para formação de nanopartículas de hidroxiapatita biomimética.

Palavras chaves: 1.Colágeno; 2.Anexina; 3.Langmuir-Blodgett

Abstract

PATERLINI, Thais T. Study of the interactions of osteogenic proteins with lipids in Langmuir and Langmuir-Blodgett films. 2018. 61 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The study of the properties of cell membranes, as well as their interaction with ions and molecules, is of fundamental importance for the understanding of complex biological processes, such as the formation of bone tissue. The natural bone consists of organic compounds, especially proteins like collagen, and minerals, such as hydroxyapatite. The process which the formation of the inorganic component takes place is called biomineralization, a complex process mediated by the release of matrix vesicles (MV), secreted at specific sites from osteoblasts. These MVs are rich in the main biomolecules involved in this process, such as annexin proteins, especially annexin V (AnxA5), which play an important role as calcium channels formation and binding with collagen, thus creating a suitable microenvironment for formation initial and propagation of the hydroxyapatite crystals from collagen fibrils. In the present study, it was possible to incorporate collagen and AnxA5 into model systems for biomineralization studies using Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett (LB) films. The monolayers were formed with the main lipid groups found in MVs: phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS). The monolayers formed by lipids, collagen and AnxA5 were deposited on titanium plates using the LB film technique. The films were exposed to a solution that simulates the pH and ionic strength of the body fluid in order to mimic the precipitation of hydroxyapatite. The samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), infrared vibration spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). In addition, the wettability and surface free energy properties of the modified titanium samples were studied. Collagen and AnxA5 interacted with lipids, as shown in the isotherms. Preferential interaction was observed in the binary system containing DPPC and DPPS and in the presence of calcium ions, as occurs in natural systems. The presence of the proteins and the phospholipids in the LB films on the titanium surfaces were essential for the formation of biomimetic hydroxyapatite nanoparticles.

Keywords: 1.Collagen; 2. Annexin; 3.Langmuir-Blodgett

Índice de figuras

Figura 1 – Modelo de mosaico fluido de uma membrana biológica.....	17
Figura 2 – Esquema de uma molécula anfifílica.....	18
Figura 3 – Esquema de uma cuba de Langmuir.....	18
Figura 4 – Esquema das forças que agem nas moléculas da superfície e no interior do líquido.....	19
Figura 5 – Isoterma π vs A, evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.....	21
Figura 6 – Processo de transferência de monocamada para suportes sólidos formando filmes LB.....	22
Figura 7 – Filmes Langmuir-Blodgett do tipo X, Y e Z.....	23
Figura 8 – Organização das principais células do osso.....	24
Figura 9 – Esquema para reorganização fibrilar do colágeno do tipo I após sua liberação para o meio extracelular.....	25
Figura 10 – Complexo enzimático do interior e membrana nas VMs.....	27
Figura 11 – Estrutura cristalina da AnxA5 humana, com representação dos quatro domínios e os íons cálcio (esferas amarelas).....	28
Figura 12 – Esquema de um cristal de quartzo recoberto com filme de ouro.....	32
Figura 13 – Esquema do feixe incidente (I) e feixe refletido (R) na técnica de ATR.....	33
Figura 14 – Esquema de um feixe de raios X sobre um material cristalino.....	34
Figura 15 – Esquema do ângulo de contato (θ_c) formado entre a gota e a superfície sólida e a Equação de Young.....	36
Figura 16 – Estruturas moleculares dos lipídios utilizados nas monocamadas de Langmuir	41
Figura 17 – Esquema para formação de fosfato de cálcio e teste de bioatividade sobre os filmes LB.....	43
Figura 18 – Isotermas π vs A para DPPC em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L ⁻¹ . DPPC puro (—), DPPC + colágeno (—), DPPC + AnxA5 (—) e DPPC + colágeno + AnxA5 (—)	48
Figura 19 – Potencial Zeta em subfase contendo água pura e contendo CaCl_2 para colágeno(A e B) e para AnxA5 (C e D).....	51

Figura 20 – Estabilidade das monocamadas de DPPC na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC puro (—), DPPC + colágeno (—), DPPC + AnxA5 (—) e DPPC + colágeno + AnxA5 (—).....	52
Figura 21 – Isotermas π vs A para DPPS em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPS puro (—), DPPS + colágeno (—), DPPS + AnxA5 (—) e DPPS + colágeno + AnxA5 (—)	53
Figura 22 – Estabilidade das monocamadas de DPPS na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPS puro (—), DPPS + colágeno (—), DPPS + AnxA5 (—) e DPPS + colágeno + AnxA5 (—).....	56
Figura 23 – Isotermas π vs A para DPPC:DPPS(8:2) em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—) e DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—)	57
Figura 24 – Esquema da interação das proteínas com os fosfolipídios nas monocamadas...	58
Figura 25 – Estabilidade das monocamadas de DPPC:DPPS (8:2) na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—) e DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—).....	60
Figura 26 – Espectros de FTIR-ATR do controle (—) e das superfícies de Ti modificadas após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF (37°C). DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—), DPPC:DPPS(8:2)+colágeno+AnxA5(—) e amostra de osso humano (—)	63
Figura 27 – Difractogramas de Raios-X para as superfícies de Ti modificadas com filmes LB de lipídios e proteínas, e após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF (37°C).....	65
Figura 28 – Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com filmes LB de lipídios, na ausência e presença de proteínas, expostos a ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato, após SBF. (A) Controle (Ti), (B) DPPC:DPPS (8:2), (C) DPPC:DPPS (8:2) + colágeno, (D) DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5, (E) DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5.....	67

Índice de tabelas

Tabela 1 – Valores típicos de C_s^{-1} para diferentes fases da monocamada.....	22
Tabela 2 – Principais constituintes das VMs.....	26
Tabela 3 – Vantagens, desvantagens e aplicações dos biomateriais.....	30
Tabela 4 – Reagentes utilizados para preparo da solução de SBF.....	44
Tabela 5 – Área molecular mínima e módulos compressionais em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.....	49
Tabela 6 – Área molecular mínima e módulos compressionais em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.	54
Tabela 7 – Área molecular mínima e módulos compressionais em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.....	59
Tabela 8 – Valores obtidos por QCM, massa teórica calculada a partir das isotermas e massa estimada de proteína a partir da transferência de uma monocamada ao suporte sólido.	62
Tabela 9 – Valores de ELS, γ^p , γ^d e θ_c com a água para o Ti puro e para as superfícies de Ti modificadas com os filmes LB de lipídios e proteínas após exposição à solução de SBF.	69

Símbolos, siglas e abreviaturas

AnxA5	Anexina V
ATR	Reflectância Total Atenuada
COD	Crystallography Open Database
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilcolina
DPPS	Dipalmitoil Fosfatidilserina
ELS	Energia Livre de Superfície
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HAp	Hidroxiapatita
LB	Langmuir-Blodgett
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Pi	Fosfato inorgânico
PPi	Pirofosfato inorgânico
QCM	Quartz crystal microbalance
SBF	Simulated body fluid
Ti	Titânio
TNAP	Fosfatase alcalina tecido não-específica
VM	Vesículas da matriz
γ	Tensão Superficial
π	Pressão de Superfície

Introdução

1 Introdução

1.1 Membrana celular

A membrana celular é extremamente importante para os processos biológicos, atuando como barreira seletiva, facilitando a interação entre as células, propagando energia, entre outras funções¹. Dentre seus principais constituintes estão os lipídios, moléculas de média ou baixa massa molar com longas cadeias hidrocarbônicas, divididos em diferentes classes². Os lipídios pertencem ao grupo de moléculas anfipáticas que contêm em sua estrutura mais geral duas cadeias de hidrocarbonetos e um grupo cabeça-polar que inclui também um grupo fosfato. Eles se organizam em bicamadas de modo que a cadeia alquílica de uma molécula fique em contato somente com a cadeia alquílica de outra molécula. Dessa maneira, as regiões polares se dispõem voltadas para a água. Entre os tipos de lipídios que constituem as membranas biológicas, os fosfolipídios, principalmente as fosfatidilcolinas, são encontrados em maior abundância nas membranas celulares dos mamíferos³.

Ainda entre os componentes majoritários das membranas celulares estão as proteínas, que podem ser classificadas de acordo com a forma que estão inseridas na bicamada lipídica: proteínas integrais ou transmembrana, que possuem domínios hidrofóbicos e que se inserem de maneira estável na porção apolar da bicamada, atravessando as membranas e possuindo porções em ambos os lados da mesma. Proteínas periféricas, que são aquelas de baixo caráter hidrofóbico e por isso se localizam nas superfícies da bicamada fosfolipídica⁴.

Algumas proteínas de células eucarióticas podem conter um ou mais lipídios ligados covalentemente, os quais provem uma âncora hidrofóbica que se insere na bicamada lipídica e mantem a proteína na superfície da membrana. Esses lipídios podem ser de vários tipos, incluindo os derivados glicosilados do fosfatidilinositol (GPI). Proteínas GPI-ancoradas apresentam diversas funções, como a de hidrólise enzimática, sinalização transmembrana e interações de adesão celular⁵.

A Figura 1 ilustra a membrana celular contendo a bicamada lipídica e as proteínas.

Figura 1 – Modelo de mosaico fluido de uma membrana biológica (Adaptado de Paulick)⁶.

O estudo das propriedades das membranas celulares, assim como sua interação com íons e moléculas, como as proteínas, é fundamental para o entendimento dos sistemas biológicos complexos. Devido à complexidade deste sistema, modelos de membranas, consistindo de apenas poucos componentes de interesse, são usados para simular e entender propriedades físico-químicas e processos específicos. Dentre as várias opções de modelo, podemos citar as monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett, que serão entendidos em detalhes nas próximas seções.

1.2 Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett

As monocamadas de Langmuir são filmes de espessura monomolecular que se formam na interface água-ar por meio do espalhamento de pequenas quantidades de moléculas anfifílicas insolúveis⁷. Neste sistema a parte polar (hidrofílica) da molécula direciona-se para a subfase aquosa, enquanto que a parte apolar (hidrofóbica) direciona-se para o ar, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Esquema de uma molécula anfifílica.

Tais monocamadas podem ser formadas e estudadas por meio de uma cuba de Langmuir (Figura 3), feita de um material inerte⁸ como o Teflon[®]. Nessa cuba, alguns microlitros de uma solução, geralmente clorofórmica, contendo a molécula anfifílica de interesse, são espalhados na superfície da subfase, que pode ser água pura ou uma solução aquosa de interesse.

Figura 3 – Esquema de uma cuba de Langmuir.

Diversas propriedades das monocamadas, como tensão e pressão superficial, podem ser estudadas por esse sistema. A tensão superficial (γ) ocorre devido à diferença

entre as energias das espécies na superfície e no interior do material⁹. Em um líquido, por exemplo, as moléculas que estão no seu interior sofrem forças iguais, já que estão cercadas por outras moléculas. Já as moléculas que se encontram na superfície têm suas forças de atração com uma resultante no sentido do interior do líquido, como mostra a Figura 4. Esse desequilíbrio de forças faz com que as moléculas da superfície apresentem maior energia livre em relação às moléculas do seio da fase.

A área superficial tende a ser minimizada de maneira a reduzir a energia livre total do sistema. Dessa maneira, a γ relaciona-se como uma resistência ao aumento da área de superfície.

Figura 4 – Esquema das forças que agem nas moléculas da superfície e no interior do líquido.

A pressão superficial (π) é definida como a diferença entre a tensão superficial da subfase pura (γ_0) e a tensão superficial da subfase na presença do tensoativo (γ) (equação 1).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

Por meio de barreiras móveis acopladas à cuba de Langmuir, as quais comprimem a monocamada formada, e um medidor de tensão superficial baseado no método da placa de Wilhelmy¹⁰ pode-se acompanhar a variação de π em função da área superficial. À medida que se aumenta a compressão da monocamada, diminuindo a área ocupada por molécula (A) na interface, a π aumenta, forçando o ordenamento das moléculas, e consequentemente o empacotamento, que é característico para cada diferente molécula.

Essa diferença no empacotamento das moléculas de um tensoativo com o aumento da π , a uma temperatura constante, resulta em uma curva denominada de isoterma superficial ou, simplesmente, curva π -A.

As monocamadas de Langmuir podem ser caracterizadas por três estados distintos os quais são descritos em analogia aos estados físicos da matéria (Figura 5): a fase gasosa (G), de maior distância intermolecular, na qual as moléculas não interagem entre si; a fase líquido-expandido (LE), mais ordenada, em que as moléculas já apresentam alguma interação, e a fase condensada (LC), com as moléculas dispostas em um arranjo altamente ordenado, formando um filme de espessura monomolecular. Estados sólidos podem ser observados dependendo da estrutura do tensoativo. Podem existir regiões nas quais haja coexistência entre as fases, caracterizadas por valores constantes de π . Além disso, se a compressão do filme for além do último estado, as moléculas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras provocando o colapso da monocamada, caracterizado por queda de π em função da diminuição de área¹¹. Estes diferentes estágios de compactação podem ser caracterizados por variações na compressibilidade das isotermas, que pode ser estudada quantitativamente pela equação 2, por meio da primeira derivada da curvas π -A.

Figura 5 – Isotherma π vs A , evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T \quad (2)$$

Porém, o parâmetro mais utilizado no estudo de monocamadas é o recíproco da compressibilidade, C_s^{-1} , que é chamado de módulo compressional, cuja dimensão é mN m^{-1} . Quando π é constante, como no caso do estado gasoso e nas regiões de coexistência de fases, C_s^{-1} tende a ser igual a zero. Este valor aumenta com a quantidade de tensoativo presente no filme ou com o aumento do ordenamento da monocamada.

O parâmetro C_s^{-1} é uma medida da elasticidade compressional e depende do estado de condensação da monocamada, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Valores típicos de C_s^{-1} para diferentes fases da monocamada¹².

Monocamada	C_s^{-1} (mN m ⁻¹)
Sem surfactante	0
Líquido-expandida	12,5 a 50
Líquido-condensada	100 a 250
Sólida	1000 a 2000

As monocamadas no estado condensado podem ser transferidas para suportes sólidos por imersão ou emersão vertical, formando os chamados filmes de Langmuir-Blodgett (LB)¹³. Esse processo proporciona a deposição de uma camada em cada lado do suporte, como mostrado na Figura 6. Filmes com diferentes números de camadas podem ser obtidos por meio da repetição deste processo.

Figura 6 – Processo de transferência de monocamada para suportes sólidos formando filmes LB (adaptado da referência 14).

A transferência da monocamada pode ser realizada por três maneiras diferentes, dando origem a filmes do tipo X, Y ou Z (Figura 7). Os filmes do tipo Y são mais comuns por possuírem maior estabilidade em relação aos demais, já que apresentam grupos de mesma afinidade em contato: interações do tipo cabeça-cabeça e cauda-cauda.

Figura 7 – Filmes Langmuir-Blodgett do tipo X, Y e Z.

As monocamadas de Langmuir e os filmes LB são importantes modelos de membrana celular. Apesar das monocamadas de Langmuir mimetizarem apenas metade dela e dos filmes LB não possuírem raio de curvatura característico, esses sistemas possuem algumas vantagens como: i) permitir o estudo de parâmetros físico-químicos; ii) permitir o controle rigoroso da composição das membranas; iii) controle do estado de compactação; iv) controle da temperatura de transferência, e v) controle da polaridade da superfície¹⁵.

Esses filmes são atualmente muito utilizados para a incorporação de macromoléculas e criação de superfícies bioativas¹⁶, além de possibilitar a investigação de fenômenos que ocorrem em membranas celulares, como os mecanismos de funcionamento de proteínas¹⁷ e sua interação com os lipídios.

1.3 Interação lipídio-proteína

A interação entre lipídios e proteínas é um exemplo de processo que ocorre em membranas biológicas e que pode ser estudada utilizando-se monocamadas de Langmuir e filmes LB¹⁸. Vários tipos de forças¹⁹ estão envolvidas nessa interação, como a de ligação covalente, interação eletrostática e interação hidrofóbica.

Inúmeros processos naturais biologicamente importantes ocorrem devido à interação entre estas moléculas, como a formação do tecido ósseo.

1.4 Tecido ósseo

O osso exerce funções importantes no corpo como, locomoção, suporte e proteção aos órgãos e armazenamento de cálcio e fosfato. É um tecido multifuncional, metabolicamente ativo que sofre processo contínuo de renovação e é constituído por uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação celular²⁰. Entre essas células estão os osteoblastos²¹, responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea e produção da enzima fosfatase alcalina, importante no processo de mineralização; os osteócitos²², que são as células mais abundantes no osso e estão envolvidos na manutenção da matriz óssea; e osteoclastos²³, células gigantes responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo.

Figura 8 – Organização das principais células do osso (Adaptado da referência 24).

Uma matriz orgânica e uma fase mineral formam o osso. A primeira é formada principalmente por colágeno do tipo I, além de proteínas não-colagenosas, como as proteoglicanas²⁵.

O colágeno, cujo peso molecular é de aproximadamente 300 kDa, é a principal proteína constituinte dos seres vivos, correspondendo à cerca de 25% da proteína total no ser humano²⁶. É encontrado em grande quantidade na pele, tendão, vasos sanguíneos, cartilagem, osso e córnea, apresentando como principal função contribuir com a

integridade estrutural da matriz extracelular, ajudar a fixar as células na matriz²⁷, além de proporcionar resistência e elasticidade às estruturas.

O colágeno é produzido na forma de pró-colágeno, pelos fibroblastos, células musculares lisas e osteoblastos e é formado por três cadeias α polipeptídicas que formam uma tripla hélice, que, associadas 3 a 3, dão origem aos 28 tipos diferentes de colágeno, sendo os do tipo I, II, III, V e X os constituintes principais do osso, cartilagem e tendão.

No tecido ósseo, o colágeno do tipo I é o principal componente²⁸, contendo a sequência repetitiva de aminoácidos $-(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})_n-$ onde X geralmente é a prolina e Y a hidroxiprolina. Essas três cadeias α formam o tropocolágeno, uma estrutura monomérica que se organiza formando as microfibrilas de colágeno, que são liberadas para o meio extracelular e se reorganizam formando as fibras, como mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema para reorganização fibrilar do colágeno do tipo I após sua liberação para o meio extracelular.

Já a fase mineral ou parte inorgânica do osso é constituída por fosfatos de cálcio (apatitas biológicas), principalmente a hidroxiapatita (HAp), de fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e com razão Ca/P igual a 1,67, que pode representar até 70% da massa dos ossos e dentes²⁹. Essa fase atua como reservatório de íons e como material estrutural, determinando grande parte das propriedades mecânicas do osso³⁰. Colágeno e HAp tem sido utilizados como biomateriais para implantes ósseos, já que o colágeno é considerado um modelo de orientação para formação desse mineral³¹, mimetizando assim a biomineralização óssea.

1.5 Biomineralização óssea

A biomineralização óssea é caracterizada pelo acúmulo de mineral constituído principalmente por íons de fosfato e cálcio, formando um sal de fosfato de cálcio, cuja estrutura se transforma em HAp. É um processo complexo e multifatorial, mediado pela liberação de vesículas da matriz (VM), secretadas no local específico do início da biomineralização³².

As VMs são nanoestruturas extracelulares (100-300 nm em diâmetro) secretadas a partir da membrana plasmática de condrócitos, osteoblastos e odontoblastos. Constituem uma bicamada lipídica semelhante à estrutura da membrana plasmática externa da célula parental, possuindo um conteúdo mais alto de colesterol e esfingomiélin, além de fosfolipídios ácidos como a fosfatidilserina³³. A Tabela 2 mostra os principais constituintes das VMs.

Tabela 2 – Principais constituintes das VMs^{32,33}

Proteínas	Lipídios
Fosfatase alcalina (TNAP)	Fosfatidilcolina (± 41,8%)
Fosfo-1	Fosfatidiletanolamina
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Fosfatidilinositol
MMP-2/3/13	Fosfatidilserina (± 9,3%)
Anexinas	

Diferentes teorias são propostas para formação e crescimento de minerais, sendo que a mais aceita associa as VMs à formação dos primeiros cristais de HAp. Essa teoria³⁴ propõe que durante a fase I da biomineralização, os íons Ca²⁺ são atraídos pelas moléculas ligadoras de cálcio que se encontram dentro das VMs, principalmente os fosfolipídios ácidos, como a fosfoerina e proteínas como a anexina V (AnxA5). Na fase II (propagação) há liberação dos cristais de HAp no fluido extracelular que são propagados entre as fibrilas de colágeno. Essa fase é controlada pelo pH do fluido extracelular, pela concentração de íons Ca²⁺ e fosfato inorgânico (Pi) e pela presença de moléculas

reguladoras, como colágeno dos tipos I e II. Assim, as VMs apresentam a finalidade de nucleação dos íons que formarão os cristais de HAp, proteção dos primeiros cristais amorfos formados e direcionamento do local específico do início da mineralização.

De acordo com Bottini *et al*³⁵ as VMs contêm um complexo enzimático tanto no seu interior como na sua membrana, como mostrado na Figura 10. Esse complexo atua principalmente na saturação local de íons Ca^{2+} e P_i durante o crescimento dos minerais, além de controlar a concentração de inibidores do processo, como o pirofosfato inorgânico (PPi)³⁶.

Figura 10 – Complexo enzimático do interior e membrana nas VMs (adaptada da referência 37).

Apesar da biomineralização óssea ser bastante estudada, ainda não se conhecem todas as moléculas envolvidas nesse processo. Dentre as principais biomoléculas que merecem mais atenção estão as proteínas AnxA5, presentes nas VMs.

1.5.1 Anexina

As anexinas pertencem a uma família de proteínas caracterizadas pela capacidade de se ligarem a fosfolipídios carregados negativamente e de forma reversível com membranas de maneira dependente de cálcio³⁸. Já foram isolados 20 diferentes tipos dessa proteína, sendo que a principal diferença entre elas ocorre devido à região amino-terminal, que varia em comprimento e sequência primária, levando assim às diferentes funções celulares³⁹.

Estudos^{40,41,42} mostram que as anexinas AnxA2, AnxA5 e AnxA6 são as mais abundantes nas VMs. A AnxA5, juntamente com fosfolipídios, principalmente a fosfatidilserina (PS)^{43,44}, está associada com a fase inicial de formação do cristal de HAp, afetando o crescimento, a estrutura e a qualidade do mesmo.

A AnxA5, proteína de aproximadamente 35 kDa, foi a primeira anexina a ser caracterizada estruturalmente⁴⁵, revelando quatro domínios homólogos constituídos por cerca de 70 aminoácidos, formando domínios compactos de 5 hélices, nos quais é encontrada uma sequência de 17 resíduos de aminoácidos.

Figura 11 – Estrutura cristalina da AnxA5 humana, com representação dos quatro domínios e os íons cálcio (esferas amarelas). Extraída da referência 45.

A molécula da AnxA5 apresenta-se ligeiramente curvada, formada por um lado convexo, onde estão localizados os íons cálcio, e um lado côncavo, onde se encontram os

domínios N- e C- terminal. Estes domínios definem um poro hidrofílico no centro da proteína, apresentando atividade de canal de Ca^{2+} na membrana das VMs⁴¹.

A isoforma AnxA5 também pode ser caracterizada como proteína ligante ao colágeno, sendo chamada de ancorina CII⁴⁶. Von der Mark *et al*⁴⁷ já comprovaram essa ligação usando um recombinante da proteína com colágeno nativo dos tipos I, II e X, mostrando que a AnxA5 desempenha papel importante como canal de cálcio regulado por colágeno na calcificação de cartilagem mediada pelas VMs^{48,49}.

Baseado nas estruturas e funções da AnxA5 e dos lipídios mais abundantes nas VMs, pode-se criar superfícies bioativas que simulem a composição e estrutura do tecido ósseo, aprimorando as características de biomateriais aplicáveis como regeneradores do tecido ósseo.

1.6 Biomateriais

Biomaterial é um termo utilizado para indicar um dispositivo, sintético ou natural, que em contato com o sistema biológico pode ser usado por um período de tempo, completo ou parcialmente e que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo⁵⁰. Os biomateriais estiveram envolvidos em três diferentes gerações⁵¹: a primeira foi marcada por materiais bioinertes, com mínima resposta tóxica do tecido hospedeiro. A segunda geração, pelo desenvolvimento de materiais bioativos que possuíam a habilidade de interagir com o sistema biológico, promovendo uma ligação tecido/material. E por fim, a terceira geração que envolvia materiais que estimulavam uma resposta celular específica em nível molecular.

No estudo dos biomateriais, alguns fatores são essenciais para seu sucesso, como a sua biocompatibilidade⁵², ou seja, a habilidade de não produzir reações adversas quando integrados ao organismo, e sua bioatividade⁵³, relacionada a interação biológica induzida pelo biomaterial na interface entre o material e o tecido ósseo.

Os primeiros fenômenos bioquímicos necessários para o sucesso de um biomaterial ocorrem na interface material / tecido hospedeiro. Assim, a superfície do material é a primeira região que entra em contato com o ambiente biológico, portanto, uma resposta biológica inicial depende de suas características. Com a finalidade de

promover uma resposta biológica melhor, inúmeras modificações nas superfícies dos materiais têm sido propostas⁵⁴, sempre visando aprimorar suas propriedades físico-químicas, acelerando e melhorando o processo de osseointegração, ou seja, a capacidade do material em se ligar ao osso, permitindo assim a incorporação do implante no organismo hospedeiro⁵⁵.

Em relação à composição, os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicos ou macromoléculas naturais. Kawashi *et al*⁵⁶ relata as vantagens e desvantagens de cada tipo de material, além da aplicação de cada um deles. A Tabela 3 resume as vantagens, desvantagens e algumas das aplicações dos vários tipos de biomateriais.

Tabela 3 – Vantagens, desvantagens e aplicações dos biomateriais

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros	Elasticidade, fácil fabricação	Baixa resistência mecânica	Artérias, veias
Metais e ligas	Alta força de tensão e resistência	Alta densidade	Fixação ortopédica, implantes dentários
Cerâmicas e vidros	Boa biocompatibilidade	Baixa força de tensão	Válvulas, tendões
Compósitos	Resistência à corrosão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial

Entre os diversos tipos de materiais estão as ligas metálicas, especialmente as ligas de titânio, amplamente utilizadas em implantes de substituição óssea, devido, principalmente, à sua resistência mecânica.

1.6.1 Titânio

O titânio (Ti) e suas ligas são os materiais mais utilizados para aplicações biomédicas devido a uma combinação de características, como: alta biocompatibilidade,

resistência aos efeitos do fluido corpóreo, grande resistência a tração, flexibilidade e alta resistência à corrosão⁵⁷. Todas essas características são devidas a uma camada fina de óxido de titânio (TiO₂)⁵⁸ formada naturalmente na superfície do material.

A presença desta camada está relacionada com sua alta estabilidade química. Por ser pouco reativo, o titânio puro apresenta uso restrito como implante, dificultando o processo completo de osseointegração. Assim, diferentes estratégias têm sido implementadas para modificações de superfícies deste material a fim de melhorar a interação biomaterial-tecido⁵⁹.

As estratégias de modificação de superfícies de titânio e suas ligas podem ser por métodos físicos, químicos ou mecânicos⁶⁰, além do recobrimento com hidroxiapatita, fosfatos de cálcio e biomoléculas.

Nesse trabalho a técnica escolhida foi a técnica dos filmes LB, como descrita nos itens anteriores. Esses filmes foram usados para posterior formação e crescimento de minerais de fosfato de cálcio, como a HAp.

A motivação desse trabalho está no estudo de sistemas biomiméticos formados pelas principais proteínas osteogênicas, como colágeno e anexina, além de fosfolipídios e minerais, como o fosfato de cálcio, depositados sobre suportes de titânio, criando superfícies bioativas que simulem a composição e estrutura do tecido ósseo.

Esse trabalho visa dar continuidade e complementar estudos já realizados no grupo. Cruz *et al*^{61,62} demonstrou a formação de HAp biomimética em superfícies de Ti recobertas com carbonatos de cálcio. Ruiz *et al*⁶³ utilizou-se de lipídios e incorporou colágeno para formação de matrizes orgânicas biomiméticas, mostrando assim a importância dessas matrizes para crescimento de HAp.

Muitos estudos são encontrados na literatura a respeito do efeito da incorporação do colágeno na formação de matrizes orgânicas biomiméticas depositadas sobre suportes de titânio. Porém, há ainda poucos trabalhos relacionando a interação do colágeno tipo I e da AnxA5, proteínas fundamentais para a formação dos primeiros cristais de hidroxiapatita, levando à biomineralização óssea.

De maneira a se estudar estas interações, foram utilizadas as técnicas de caracterização descritas nos próximos itens.

1.7 Principais técnicas de caracterização dos Filmes LB

1.7.1 Quantificação da massa depositada - Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)

A microbalança a cristal de quartzo (QCM - do inglês *quartz crystal microbalance*) é uma técnica que se baseia nas propriedades piezoelétricas de um cristal de quartzo (Figura 12), que é recoberto por um filme de ouro e que atua como eletrodo através do qual é aplicada uma diferença de potencial.

Figura 12 – Esquema de um cristal de quartzo recoberto com filme de ouro.

Vibrações nesse cristal são provocadas por diferenças de potencial e a frequência de vibração é medida. A massa depositada sobre a superfície pode ser determinada utilizando-se a Equação de Sauerbrey⁶⁴, já que à medida que uma massa adere ao cristal, sua frequência diminui.

$$\Delta F = \frac{2F_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_c \rho_c}} \quad (3)$$

Nessa equação, A é a área piezoeletrônica do cristal, ρ_c e μ_c são a densidade e o módulo de cisalhamento do quartzo, respectivamente, F_0 é a frequência de vibração do cristal limpo e ΔF a mudança de frequência devido a massa depositada.

1.7.2 Espectroscopia de Infravermelho

A técnica espectroscópica de absorção na região do infravermelho permite a identificação de diferentes tipos de ligações químicas das estruturas⁶⁵. As ligações químicas possuem frequências de vibrações específicas, que se relacionam à massa dos átomos, orbitais moleculares e níveis de energia da molécula. Para que um determinado modo vibracional seja ativo no infravermelho é necessário que ocorra variação no momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional.

As análises mais comuns por espectroscopia no infravermelho são as com transformada de Fourier (FTIR)⁶⁶, na qual os equipamentos são capazes de separar variações na frequência da radiação que chega ao detector. Três variedades dessa técnica são utilizadas: medidas de absorção em transmissão (FTIR), reflexão-absorção em ângulo rasante (FT-IRRAS) e reflexão total atenuada (FT-ATR)⁶⁷. As duas últimas são aplicadas, principalmente, em superfícies que não sejam transparentes ao feixe de infravermelho.

As análises de FTIR-ATR têm como princípio a reflexão de um feixe de radiação quando esse passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra). A amostra então absorve radiação, o feixe sofre atenuação e assim é possível identificar as bandas de absorção da amostra, e consequentemente, as ligações químicas presentes em seus compostos, como mostra o esquema da Figura 13.

Figura 13 – Esquema do feixe incidente (I) e feixe refletido (R) na técnica de ATR (Adaptado da referência 68). Na figura à direita tem-se um exemplo de um espectro de ATR-FTIR.

1.7.3 Difração de raios X

A difração de raios X ocorre quando um feixe monocromático com comprimento de onda entre X e Y incide sobre um material cristalino, no qual os átomos estão regularmente espaçados com uma distância interplanar d . Esse feixe incide com um ângulo θ e os feixes refletidos por dois planos subsequentes apresentarão o fenômeno da difração, como mostrado no esquema da Figura 14.

Figura 14 – Esquema difração de um feixe de raios X sobre um material cristalino (adaptado da referência 69).

Se a diferença entre os caminhos óticos dos dois feixes for um número inteiro de comprimento de onda, haverá superposição construtiva, e assim, observa-se um feixe de raios X difratado. Porém, se essa diferença não for um número inteiro, haverá superposição destrutiva, e não se observará nenhum sinal de raios X.

As condições necessárias para que as interferências construtivas aconteçam são estabelecidas pela Lei de Bragg⁷⁰ (equação 4), onde n corresponde a um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios X incidentes, d a distância interplanar e θ o ângulo de difração.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (4)$$

A técnica de difração de raios X permite a caracterização de fases cristalinas. No presente trabalho, essa técnica foi utilizada para confirmar a fase mineral formada sobre as superfícies de Ti modificadas com os filmes LB.

1.7.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O princípio dessa técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar, ponto a ponto, a superfície da amostra, fornecendo assim informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida⁷¹. Os elétrons secundários e os retroespalhados formam os sinais de maior interesse para a formação da imagem. Enquanto os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da amostra, os retroespalhados fornecem as imagens características de variação de composição, permitindo a identificação de diferentes fases e orientações cristalinas.

A MEV é uma das técnicas mais utilizadas para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. Conforme retratado na literatura, tem sido bastante utilizada para avaliar a morfologia de minerais⁷² e células aderidas sobre superfícies dos biomateriais durante o processo de mineralização⁷³.

1.7.5 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

A molhabilidade é definida como a tendência de um líquido em espalhar-se sobre uma superfície sólida refletindo a afinidade entre estes⁷⁴. Quantitativamente, a molhabilidade é estudada em função do ângulo (θ_c) formado na junção de três diferentes fases, sendo um balanço entre as tensões interfaciais da gota de um líquido e um sólido (γ_{SL}), do sólido e gás (γ_{SG}) e entre o líquido e gás (γ_{LG}), que é a tensão superficial do líquido puro. A Figura 15 mostra o balanço das forças horizontais que atuam em equilíbrio, resultando na Equação de Young⁷⁵.

Figura 15 – Esquema do ângulo de contato (θ_c) formado entre a gota e a superfície sólida e a Equação de Young.

Uma superfície completamente molhável é aquela cujo ângulo $\theta = 0^\circ$, formando um infinito filme líquido em sua superfície. Se $0^\circ < \theta < 180^\circ$, dizemos que a superfície é molhável, e é completamente não molhável se $\theta = 180^\circ$. No presente trabalho, medidas de ângulo de contato foram realizadas para avaliar a hidrofilicidade das superfícies antes e após modificações com filmes LB.

A molhabilidade também pode ser relacionada com a energia livre de superfície, (γ_{SG}) no caso de sólidos, ou apenas tensão superficial (γ_{LG}) no caso de líquidos. Essa energia pode ser calculada por meio de θ_c formado entre líquidos de diferentes polaridades e a superfície sólida.

A γ_{SG} pode ser calculada utilizando-se a equação de Owens-Wendt⁷⁶, que divide a energia superficial em componentes que representam diferentes interações entre o sólido e o líquido, no caso, componentes dispersivas (γ^d) e polares (γ^p).

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2 (\gamma_L^d \cdot \gamma_S^d)^{1/2} + 2 (\gamma_L^p \cdot \gamma_S^p)^{1/2} \quad (5)$$

A γ_{SG} e suas componentes tem relação no modo com que as superfícies de Ti interagem com o tecido hospedeiro. Gentleman⁷⁷ relatou que o aumento dos valores de γ^p , ou seja, superfícies com características hidrofílicas, favorece o contato entre as primeiras células ósseas e a superfície do material, promovendo uma adesão celular mais eficiente.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a interação de proteínas osteogênicas como, colágeno e AnxA5, com sistemas modelo de membrana, mais especificamente filmes de Langmuir e Filmes LB, e seus efeitos quando depositadas em suportes de titânio.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a organização das monocamadas de lipídios na presença de colágeno e AnxA5 em subfases contendo água pura e solução aquosa de CaCl_2 ;
2. Transferir as monocamadas formadas para discos de titânio utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett;
3. Caracterizar morfológica e estruturalmente os filmes LB formados;
4. Avaliar a bioatividade das superfícies de titânio utilizando uma solução que simula a concentração de íons e pH do fluido corpóreo humano (SBF).

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada a partir de um sistema Milli-Q® ($\gamma = 72,8 \text{ mN m}^{-1}$ e resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Os reagentes utilizados para preparo das monocamadas de Langmuir e filmes LB foram: 1,2-Dipalmitoil-sn-3-Glicero-Fosfatilcolina (DPPC, Avanti, $734,05 \text{ g mol}^{-1}$, >99%), Dipalmitoil-Fosfatidil-l-Serina (DPPS, Sigma, $758,0 \text{ g mol}^{-1}$, >99%). Metanol grau HPLC-J.T.Baker, 99,90%; clorofórmio grau HPCL-Sigma, 99,0%); cloreto de cálcio (J.T. Baker); fosfato de sódio (VETEC); ácido clorídrico (Synth, 36-38,5%).

Para as soluções aquosas utilizadas na subfase, solução tampão pH 7,5, no SBF e na solução de colágeno, foram utilizados os seguintes sais: Cloreto de cálcio diidratado (Synth, 99,5%, $147,02 \text{ g mol}^{-1}$); Cloreto de sódio (Synth, 99,5%); Bicarbonato de sódio (Vetec, 99,5%); Cloreto de potássio (Vetec, 99,0%); Fosfato de sódio dibásico heptaidratado (Mallinckrodt Chemicals, 99,5%); Cloreto de magnésio hexaidratado (Synth, 99,0%); Sulfato de sódio (Synth); *trishidroximetilaminometano* (Aldrich, 99,9%, $121,14 \text{ g mol}^{-1}$); Colágeno íntegro tipo-I (pele de bezerro, para cultura de células, Sigma-Aldrich); Ácido acético glacial (VETEC, 99,9%) e n-propanol (Synth, 99,5%).

3.2 Preparo da solução de colágeno

Foram dissolvidos 15 mg de colágeno tipo-I em mistura de 14 mL de ácido acético (5 mmol L^{-1}) e 1,0 mL de n-propanol e mantido sob agitação por pelo menos 12 horas, seguindo procedimento já descrito na literatura⁷⁸.

3.3 Obtenção da AnxA5

A enzima AnxA5 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, Laboratório de Sistemas Biomiméticos de Membrana (DQ-FFCLRP). A preparação e purificação da enzima foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Logue e

colaboradores (2009)⁷⁹. O plasmídeo para AnxA5 (pProEx.Htb.annexin V) foi gentilmente cedido pelo professor Seamus J. Martin de Dublin, Irlanda e foi expresso em *E. coli* com cauda de histidina para facilitar a sua purificação. Esta etapa do trabalho foi realizada com colaboração direta do laboratório do Prof. Dr. José Luis Millán pelo Protein Production and Analysis Facility do Sanford Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA – USA.

3.4 Monocamadas de Langmuir

3.4.1 Monocamadas de lipídio puro

As monocamadas de lipídios puros foram confeccionadas em uma cuba de Langmuir (Insight®-Brasil, área superficial de 216 cm² e volume de aproximadamente 130 mL) a 25 ± 2°C. Foram espalhados 30 µL de uma solução clorofórmica (CHCl₃:MeOH 3:1 v/v) de DPPC, DPPS e mistura binária em frações molares de DPPC:DPPS (8:2) na interface líquido-ar. A Figura 16 apresenta as estruturas moleculares dos tensoativos utilizados, que apresentam cadeia lipídica com mesmo tamanho, sem insaturações, diferindo apenas na cabeça polar.

Figura 16 – Estruturas moleculares dos lipídios utilizados nas monocamadas de Langmuir⁷.

A subfase foi constituída por água pura ou solução aquosa de CaCl_2 10 mmol L^{-1} . Após espalhar o lipídio, esperou-se 5 min para a evaporação do solvente, e então a interface foi comprimida mecanicamente por uma barreira móvel a uma taxa de 0,42 mm s^{-1} , registrando assim a isoterma π -A. Os valores dos módulos compressoriais foram calculados utilizando-se a equação 2.

3.4.2 Monocamadas mistas de lipídios, colágeno e AnxA5

As monocamadas mistas também foram obtidas em uma cuba de Langmuir a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em subfase contendo água pura ou solução de CaCl_2 10 mmol L^{-1} . Colágeno (1,8 mg mL^{-1}) e AnxA5 (2,8 mg mL^{-1}) foram injetados na subfase nas quantidades de 100 μL e 10 μL , respectivamente, na presença dos lipídios, de forma a se ter uma proporção de 1:50 (mol:mol) (Proteína:Lipídio). Após 15 min de incubação, a interface foi comprimida mecanicamente a 0,42 mm s^{-1} . Os valores dos módulos compressoriais também puderam ser calculados pela equação 2.

A área mínima ocupada por molécula pode ser calculada por meio das isotermas ajustando-se uma tangente aos pontos correspondentes ao estado líquido-condensado da monocamada.

As monocamadas mistas também foram utilizadas para ensaios de estabilidade, por meio da compressão da mesma até $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, registrando a variação deste parâmetro em função do tempo. A estabilidade da monocamada é um parâmetro importante para a qualidade da deposição dos filmes LB⁸⁰.

3.5 Pré-tratamento dos suportes metálicos para deposição dos filmes LB

Os suportes utilizados foram discos de Ti (grau 2) de 13 mm de diâmetro (REALUM® – Brasil). Antes da deposição dos filmes LB os suportes foram imersos por 15 min em ultrassom, em três diferentes líquidos de limpeza: água contendo detergente, etanol e acetona. Após essa primeira etapa, os discos de Ti foram submersos em solução

KH_2PO_4 / NaOH pH 7,5 contendo o tensoativo não-iônico Span 20 na concentração $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, também em ultrassom, por 5 min. Em seguida os suportes foram enxaguados com água Milli-Q®.

3.6 Formação dos filmes LB e das matrizes orgânicas

As monocamadas formadas por lipídios, colágeno e AnxA5 foram depositadas nos discos de Ti utilizando-se a técnica dos filmes LB em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ (pressão das biomembranas)⁸¹ e velocidade de imersão e emersão constante em $0,038 \text{ mm s}^{-1}$ com o auxílio de um sistema *dip-coater*.

Filmes do tipo Y (Figura 7), contendo uma bicamada de fosfolipídio e proteínas, com final hidrofílico, foram formados e rapidamente imersos em solução de CaCl_2 1 mmol L^{-1} e tampão ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5 e 100 mmol L^{-1}) por 12 h, cada uma, em um total de 4 ciclos, à 37°C , para deposição de fosfatos de cálcio. Após esse período, os discos foram submersos na solução de SBF por 36 h, conforme esquema da Figura 17.

Figura 17 – Esquema para formação de fosfato de cálcio e teste de bioatividade sobre os filmes LB.

3.7 Preparo do SBF

Após os ciclos para formação de fosfatos de cálcio, os discos de Ti foram submersos em solução de SBF (*simulated body fluid*), que consiste em uma solução supersaturada que simula a composição iônica e pH do plasma humano. Em presença de tal solução a superfície de um material pode induzir, assim como observado *in vivo*, a formação de HAp por meio de diferentes mecanismos^{82,83}. Se o material induz a formação de hidroxiapatita este é considerado bioativo.

O preparo da solução de SBF foi realizado seguindo procedimento da literatura⁸⁴.

A Tabela 4 mostra a ordem dos reagentes adicionados a 400 mL de água Milli-Q®, para preparo de 500 mL de solução de SBF. O pH foi ajustado para 7,5 utilizando-se uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ a uma temperatura de 37°C.

Tabela 4 – Reagentes utilizados para preparo da solução de SBF

Ordem	Reagente	Massa utilizada (g)
1º	NaCl	3,274
2º	NaHCO ₃	1,134
3º	KCl	0,186
4º	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,134
5º	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,152
6º	HCl 1 mol L ⁻¹	18 mL
7º	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,184
8º	Na ₂ SO ₄	0,0355
9º	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	3,028

3.8 Caracterização dos Filmes LB

3.8.1 Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)

As massas de lipídio e proteína depositadas a partir dos filmes LB foram determinadas utilizando-se uma QCM. Por meio da frequência de vibração do cristal piezoelétrico, pode-se calcular a massa depositada por meio da equação 3.

O cristal de quartzo utilizado no presente trabalho apresenta $A = 0,656 \text{ cm}^2$, $\rho_c = 2,648 \text{ g.cm}^{-3}$ e $\mu_c = 2,947.10^{11} \text{ g.cm}^{-1}.\text{s}^{-2}$.

Conhecendo a área do cristal e a área mínima ocupada por molécula obtida pelas isotermas, foi possível determinar o número de moléculas de lipídios teoricamente depositada. Nos filmes contendo lipídio + proteína, com a diferença entre os valores obtidos pela QCM e o valor teórico, pode-se calcular a massa estimada de proteínas transferidas para os suportes sólidos.

3.8.2 Espectroscopia de Infravermelho

Os grupos químicos presentes nos filmes depositados sobre Ti foram analisados por FTIR-ATR, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu Prestige (Laboratório de Terras Raras – DQ/FFCLRP).

3.8.3 Difração de raios X

No presente trabalho, a fase mineral formada sobre as superfícies de Ti foi avaliada utilizando-se um difratômetro Bruker-AXS D5005 (DQ/FFCLRP) com ângulo de incidência rasante, tubo selado de Cu (2,2 kW) cuja radiação gerada possui $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ como fonte e filtro monocromador de níquel.

3.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das superfícies foi caracterizada pela técnica da Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV - (Shimadzu, Super Scan – SS550, DQ/FFCLRP). Antes das análises as amostras foram recobertas com um filme de ouro, utilizando-se a evaporadora Bal-Tec SCD-050 Sputter Coater.

3.8.5 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

As medidas de ângulos de contato para as superfícies de Ti modificadas ou não foram realizadas com o equipamento Dataphysics Contact Angle System OCA 20, disponível em nosso laboratório.

Além disso, foi determinada a energia superficial do material por meio de medidas de ângulos de contato com líquidos de diferentes polaridades, como água Milli-Q®, formamida e diiodometano. A $\gamma_{SGtotal}$ foi calculada pelo software do equipamento, que automaticamente extrai a tangente e o ângulo formado entre a gota e a superfície e utiliza a equação de Owens-Wendt para cálculo.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das Monocamadas de Langmuir de DPPC

A Figura 18 mostra as isotermas π -A para o lipídio DPPC puro, na ausência e presença de colágeno, AnxA5 e mistura colágeno + AnxA5. A Figura 18A representa as isotermas obtidas em subfase contendo água pura e a Figura 18B em subfase de CaCl_2 10 mmol L⁻¹.

O uso de uma subfase de CaCl_2 se deve ao fato de ser esse um sal de fonte de cálcio para estudos do comportamento da AnxA5 e também posterior formação de minerais de fosfato de cálcio sobre as superfícies recobertas pelos filmes LB.

Figura 18 – Isotermas π vs A para DPPC em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L⁻¹. DPPC puro (—), DPPC + colágeno (—), DPPC + AnxA5 (—) e DPPC + colágeno + AnxA5 (—).

Analisando os gráficos das isotermas obtidas nas subfases já descritas anteriormente, observa-se em água pura a isoterma típica para DPPC (Figura 18A – linha preta) com região de coexistência de fases LC-LE em $\pi \sim 10 \text{ mN m}^{-1}$, como mostram também algumas isotermas encontradas na literatura^{84,85}.

Ainda analisando as isotermas de DPPC em subfase contendo água pura, observa-se expansão de área mínima ocupada pelas moléculas de colágeno, AnxA5 e colágeno + AnxA5, conforme dados da Tabela 5. Essa expansão ocorre devido à interação das proteínas com o lipídio, ou seja, as moléculas das proteínas migram para a interface. O

primeiro indício dessa interação pode ser observado por meio de experimentos realizados na ausência de lipídios, nos quais a adição das proteínas na mesma concentração na subfase não provocou variação na π indicando que o colágeno e AnxA5 migram para a interface apenas na presença do fosfolípido.

As isotermas de DPPC em subfase contendo AnxA5 (Figura 18A – linha azul) e colágeno + AnxA5 (Figura 18A – linha rosa) são mais expandidas do que aquela obtida apenas em presença de colágeno e apresentaram perfis semelhantes até $\pi \sim 20 \text{ mN m}^{-1}$, indicando que as duas proteínas migraram para a interface, interagindo com o DPPC. Acima dessa pressão, a isoterma da monocamada contendo as duas proteínas (Figura 18A – linha rosa) apresenta um comportamento mais próximo da isoterma do colágeno sozinho (Figura 18A – linha vermelha), ou seja, em $\pi \sim 30 \text{ mN m}^{-1}$, moléculas de AnxA5 deixam a interface.

Utilizando a equação 2, pode-se calcular os valores dos módulos compressoriais. A Tabela 5 apresenta esse parâmetro em relação à pressão de superfície de $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$. Analisando a Tabela 5 para subfase contendo água pura, observa-se que todos os valores de C_s^{-1} são maiores que 100 mN m^{-1} , ou seja, as monocamadas estão no estado LC, o que facilita sua transferência aos filmes LB.

Tabela 5 – Área molecular mínima e módulos compressoriais (C_s^{-1}) em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.

Monocamada	Subfase	Área mínima ($\text{\AA}^2 \text{molécula}^{-1}$)	C_s^{-1} (mN m^{-1})	% de expansão
DPPC	H ₂ O	56 ± 2	119 ± 12	-
DPPC + colágeno	H ₂ O	58 ± 3	179 ± 16	4
DPPC + AnxA5	H ₂ O	66 ± 1	159 ± 11	18
DPPC + colágeno + AnxA5	H ₂ O	62 ± 1	118 ± 12	11
DPPC	CaCl ₂	61 ± 1	143 ± 15	-
DPPC + colágeno	CaCl ₂	68 ± 1	182 ± 10	11
DPPC + AnxA5	CaCl ₂	67 ± 1	166 ± 10	10

DPPC + colágeno + AnxA5	CaCl ₂	71 ± 4	70 ± 19	16
-------------------------	-------------------	--------	---------	----

Em relação à subfase contendo CaCl₂, observa-se na Figura 18B e na Tabela 5, que as isotermas foram deslocadas para maiores valores de área em relação à subfase contendo água pura, ou seja, houve expansão nas áreas mínimas das monocamadas em presença do sal, como já descrito na literatura⁸⁶. Essa expansão, e consequentemente maior área mínima, podem ser explicadas pelo fato de que a subfase salina provoca desbalanceamento de carga no DPPC, que apresenta, em água pura, carga líquida neutra. Como relatado na literatura⁸⁷, os íons Ca²⁺ interagem preferencialmente com o grupo fosfatidil, carregado negativamente, presente na cabeça polar zwitteriônica do lipídio, fazendo com que a interface tenha uma carga líquida positiva. Assim, esse desbalanceamento de cargas aumenta as interações repulsivas entre as cabeças polares, levando à expansão da monocamada.

Nessas condições, na presença do colágeno a monocamada de DPPC foi praticamente inalterada (Figura 18B - linha vermelha). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que o colágeno apresenta carga líquida positiva nas condições de trabalho (Figura 19B). Como os íons Ca²⁺ interagem preferencialmente com os grupos negativamente carregados do DPPC, as interações iônicas entre o lipídio e a proteína são desfavorecidas.

Já na presença de AnxA5 e AnxA5 + colágeno as monocamadas apresentaram expansão, sendo essa maior na presença das duas proteínas juntas. O fato da migração da AnxA5 para a interface pode ser explicado pelas interações eletrostáticas entre a carga líquida positiva da membrana na presença de CaCl₂, como discutido anteriormente, e a carga líquida negativa da AnxA5 no pH de trabalho, como mostra a Figura 19D. Diferente do observado em água pura, a monocamada é mais expandida na presença das duas proteínas juntas (Figura 18B - linha rosa). Ainda, nesta condição, o colágeno permanece na interface mesmo em altos valores de π , evidenciando a importância dos íons Ca²⁺ na interação DPPC-AnxA5/colágeno.

Em relação aos valores de C_s^{-1} , pode-se observar na Tabela 5 que esses foram maiores que 100 mN m⁻¹, indicando que as monocamadas se encontravam no estado líquido-condensado. Comportamento diferente foi observado para a monocamada contendo as duas proteínas e na subfase de CaCl₂, já que o valor de C_s^{-1} foi menor que

100 mN m^{-1} , ou seja, na presença das duas proteínas a monocamada apresentou-se menos condensada e mais compressível. Essa maior fluidez em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ pode ser explicada por uma maior interação lipídio-proteína no sistema contendo as duas proteínas juntas.

Como já relatado na literatura⁸⁸, a presença de proteína pode levar à maior fluidez da monocamada, apresentando menor valor de C_s^{-1} quando comparado ao valor desse parâmetro da monocamada de lipídio puro, indicando que a monocamada se torna menos condensada, favorecendo assim as interações proteína-lipídio.

Figura 19 – Potencial Zeta em subfase contendo água pura e contendo CaCl_2 , para o colágeno (A e B) e para AnxA5 (C e D), respectivamente.

4.1.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir de DPPC

Conforme descrito no item 2.4.2, as monocamadas também foram utilizadas para estudo de estabilidade. Nesse estudo, a monocamada é comprimida até $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, e avalia-se como esse parâmetro varia em função do tempo. Os valores de $\Delta\pi$ foram calculados em π inicial (π_0) de $30 - \pi$ para cada instante de tempo t (π_t) [$\Delta\pi = 30 - \pi_t$].

Valores positivos deste parâmetro indicam uma maior adsorção das proteínas na monocamada.

A Figura 20 mostra a variação da pressão de superfície ao longo do tempo, bem como a influência das proteínas na estabilidade das monocamadas formadas em subfase contendo água pura ou contendo CaCl_2 10 mmol L^{-1} .

Figura 20 – Estabilidade das monocamadas de DPPC na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC puro (—), DPPC + colágeno (—), DPPC + AnxA5 (—) e DPPC + colágeno + AnxA5 (—).

Analisando a Figura 20A observa-se que em subfase contendo água pura as monocamadas se apresentaram estáveis. As variações de $\Delta\pi$ se encontraram dentro do erro da medida, e por isso não são consideradas. Assim, não se observou diferença na estabilidade nas monocamadas do lipídio na ausência e/ou presença das proteínas.

Com a análise da Figura 20B, observa-se que na presença de CaCl_2 houve um aumento de $\Delta\pi$ ao longo do tempo, indicando o favorecimento das interações das proteínas com os lipídios, como também indicado pelas isothermas discutidas no item anterior. Um maior valor de $\Delta\pi$ foi encontrado para as duas proteínas juntas, indicando que a presença do Ca^{2+} favoreceu as interações, promovendo uma maior adsorção das proteínas na monocamada. Após 5 min, como observado na Figura 20B - linha rosa, a monocamada com as duas proteínas já se apresentava estável.

Comportamento semelhante pode ser encontrado nos estudos de Rosengarth *et al*⁸⁹ com anexina I e anexina V em monocamadas de DPPC. Os resultados encontrados

mostraram que valores maiores de $\Delta\pi$ indicavam uma maior interação da proteína com o lipídio.

4.2 Caracterização das Monocamadas de Langmuir de DPPS

Monocamadas de Langmuir também foram formadas por DPPS puro para estudar a influência do grupo carregado negativamente, fosfatidilserina (PS), no comportamento das proteínas, principalmente da AnxA5.

A Figura 21 mostra as isotermas de DPPS, na ausência e presença das proteínas.

Figura 21 – Isotermas π vs A para DPPS em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPS puro (—), DPPS + colágeno (—), DPPS + AnxA5 (—) e DPPS + colágeno + AnxA5 (—).

A Figura 21 mostra as isotermas de DPPS em subfase contendo água pura (Figura 21A) e em subfase contendo CaCl_2 10 mmol L^{-1} (Figura 21B). Com relação às áreas ocupadas por molécula, como observado, o DPPS puro apresenta um comportamento diferente do DPPC puro, já que sua isoterma é altamente condensada devido à presença do grupo PS, que ocupa menor área por molécula comparado ao grupo fosfatidilcolina do DPPC, como relatado nos estudos de Steinkopf⁹⁰.

Em água pura, a isoterma de DPPS sofre expansão em presença das proteínas puras e da mistura, conforme apresentado na Figura 21A e na Tabela 6. Maior expansão é observada na isoterma na presença das duas proteínas juntas (Figura 21A – linha rosa). Assim como para DPPC, aumentando-se π , a isoterma da mistura colágeno/AnxA5 volta

a coincidir com a isoterma em presença de colágeno, indicando que AnxA5 foi removida da interface nestas condições.

As expansões nas monocamadas podem ser explicadas em termos de carga. O DPPS apresenta carga líquida negativa, o que facilita a interação com colágeno (positivamente carregado - Figura 19A). A interação com AnxA5 (negativamente carregada - Figura 19C) deve ser menos favorecida e ocorrer via grupo amina do DPPS, resultando em migração da proteína para subfase em alta compactação.

Os valores de C_s^{-1} , também mostrados na Tabela 6, foram calculados utilizando-se a equação 2. Observa-se que todas as monocamadas se encontram no estado LC, já que seus valores são maiores que 100 mN m^{-1} , exceto a monocamada de lipídio e das duas proteínas juntas, que apresenta um C_s^{-1} característico de uma monocamada entre os estados LC/LE ou seja, a monocamada é mais fluida.

Tabela 6 – Área molecular mínima e módulos compressoriais em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.

Monocamada	Subfase	Área mínima ($\text{\AA}^2 \text{molécula}^{-1}$)	C_s^{-1} (mN m^{-1})	% de expansão
DPPS	H ₂ O	45 ± 1	164 ± 13	-
DPPS + colágeno	H ₂ O	57 ± 2	202 ± 10	24
DPPS + AnxA5	H ₂ O	67 ± 1	144 ± 11	49
DPPS + colágeno + AnxA5	H ₂ O	71 ± 2	76 ± 12	58
DPPS	CaCl ₂	63 ± 1	179 ± 13	-
DPPS + colágeno	CaCl ₂	61 ± 2	194 ± 10	-
DPPS + AnxA5	CaCl ₂	67 ± 2	182 ± 12	6
DPPS + colágeno + AnxA5	CaCl ₂	75 ± 3	88 ± 11	19

Os resultados obtidos em presença de Ca^{2+} evidenciam a importância da interação iônica lipídio/proteína (Figura 21B). Em presença deste íon as modificações nas isotermas devido às proteínas são menos evidentes, como se pode observar na Tabela 6. O Ca^{2+}

deve se ligar aos grupos negativamente carregados do grupo serina, o que inviabiliza a interação lipídio/colágeno (Figura 21B - linha vermelha). A interação com AnxA5 (Figura 21B - linha azul) ocorre via grupo amina, expandindo a monocamada em aproximadamente 6%. Porém, é interessante observar o efeito sinérgico da presença da mistura colágeno/AnxA5 (Figura 21B - linha rosa), levando à uma expansão de aproximadamente 19% na monocamada do lipídio. Nestas condições, as duas proteínas permanecem na interface, mesmo com alta compactação da monocamada, evidenciando a importância da interação entre as mesmas nos sistemas reais. Esse efeito é relatado em outros sistemas modelo⁹¹.

Em relação aos valores de C_s^{-1} das monocamadas em subfase contendo CaCl_2 , observa-se na Tabela 6 que novamente as monocamadas se encontram no estado LC, exceto a monocamada de lipídio e colágeno/AnxA5 juntas. Novamente, como para o DPPC, a monocamada contendo as duas proteínas juntas apresentou um menor valor de C_s^{-1} , se tornando mais fluida, favorecendo a interação das proteínas com DPPS.

Ainda em relação aos valores de C_s^{-1} , observa-se na Tabela 6 que as variações nesse parâmetro tanto na subfase contendo água e contendo CaCl_2 estão dentro do erro e assim não são consideradas. Uma diferença significativa é apenas observada nas monocamadas contendo AnxA5. Esse resultado mostra a importância de PS na interação das membranas das VMS com AnxA5.

4.2.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir de DPPS

As monocamadas de DPPS puro, na ausência e presença das proteínas também foram usadas para ensaios de estabilidade. A Figura 22A mostra a estabilidade em subfase contendo água pura, e a Figura 22B em subfase contendo CaCl_2 10 mmol L^{-1} .

Figura 22 – Estabilidade das monocamadas de DPPS na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPS puro (—), DPPS + colágeno (—), DPPS + AnxA5 (—) e DPPS + colágeno + AnxA5 (—).

Em subfase contendo água pura, observa-se que as monocamadas de lipídio puro (Figura 22A – linha preta) e de lipídio na presença de colágeno (Figura 22A – linha vermelha) foram as mais estáveis ao longo do tempo, apresentando uma menor variação da π inicial. Já as monocamadas com a presença da AnxA5 (Figura 22A – linha azul) e com a presença das duas proteínas juntas (Figura 22A – linha rosa) apresentaram aumento da π inicial. Uma vez que as curvas estão praticamente sobrepostas, pode-se inferir que apenas as moléculas de AnxA5 tendem a migrar para a interface ao longo do tempo, estabilizando após aproximadamente 5 min. Em comparação aos resultados obtidos em presença de DPPC puro (Figura 20) podemos constatar a importância da cabeça polar negativa do DPPS na interação e ligação específica com AnxA5 mesmo em água pura.

Já na subfase contendo CaCl_2 (Figura 22B), as curvas de estabilidades são mais complexas, tornando a comparação entre os sistemas difícil. De maneira geral, a presença de Ca^{2+} permite com que todos os componentes da monocamada migrem mais para a interface, aumentando atividade e π .

4.3 Caracterização das Monocamadas de Langmuir mistas de DPPC e DPPS

As monocamadas também foram formadas por misturas binárias de DPPC e DPPS. Com o objetivo de tornar o modelo mais próximo à realidade com relação à composição da membrana das VMs, utilizou-se a fração molar DPPC:DPPS (8:2). Para estes experimentos também se utilizou como subfase a água pura ou CaCl_2 10 mmol L^{-1} .

A Figura 23 mostra as isotermas do sistema binário DPPC:DPPS (8:2) na presença e ausência das proteínas.

Figura 23 – Isotermas π vs A para DPPC:DPPS(8:2) em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—) e DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—).

A mistura DPPC:DPPS apresentou comportamento distinto daqueles observados para os lipídios puros. Como observado na Figura 23A, que apresenta as monocamadas em subfase contendo água pura, a adição de DPPS às monocamadas de DPPC, ou seja, adição de carga negativa, permite que o colágeno (Figura 23A – linha vermelha) interaja com os lipídios levando à compactação da monocamada. Efeito oposto, de expansão, é observado para AnxA5, negativamente carregada (Figura 23A – linha azul).

O formato da isoterma obtida em presença da mistura proteica (Figura 23A – linha rosa) assemelha-se àquele obtido para colágeno. Esse fato pode ser explicado pela

interação preferencial entre cargas positivas do colágeno com a monocamada e expulsão da AnxA5 da interface no sistema misto.

A expansão e compressão das isotermas podem ser ilustradas pelo esquema mostrado na Figura 24.

Figura 24 – Esquema da interação das proteínas com os fosfolípidios nas monocamadas.

Na presença de Ca^{2+} (Figura 23B), as isotermas da mistura DPPC:DPPS exibem uma pequena mudança para áreas moleculares maiores e com módulos compressoriais também maiores, comparadas às isotermas em subfase de água pura. Esse efeito ocorre devido à ligação preferencial dos íons Ca^{2+} com as moléculas de DPPS negativamente carregadas, formando um complexo maior DPPS- Ca^{2+} ⁹². A Tabela 7 resume os resultados das áreas mínimas e dos módulos compressoriais calculados.

Na subfase contendo CaCl_2 (Figura 23B), assim como em água pura, ocorre redução da área mínima em subfase contendo colágeno, indicando que este efeito é guiado pela presença de DPPS e não pela presença de íons (Figura 23B – linha vermelha). Em presença de Anx5 e da mistura Anx5 + colágeno, em altos valores de área por molécula, as isotermas praticamente coincidem com a isoterma do lipídio puro. Porém, com aumento do empacotamento, ou redução da área ocupada por molécula, as monocamadas apresentaram expansão na presença de AnxA5 (Figura 23B – linha azul) e expansão ainda maior em presença da mistura, indicando adsorção conjunta do colágeno na interface (Figura 23B – linha rosa). Este resultado reforça a importância da presença da AnxA5 para que ocorra interação dos lipídios com colágeno em presença de Ca^{2+} , como ocorre nos sistemas naturais.

Em relação aos valores de C_s^{-1} , observa-se que nos dois tipos de subfases as monocamadas também se encontram no estado LC, já que seus valores foram maiores do que 100 mN m^{-1} .

Uma observação importante pode ser feita em relação aos valores do módulo compressional do sistema misto de lipídios e na presença das duas proteínas juntas. Observou-se que o valor de C_s^{-1} da monocamada mista de DPPC:DPPS na presença das duas proteínas foi maior que o valor de C_s^{-1} da monocamada de DPPC puro e DPPS puro, na presença também das duas proteínas, como discutido nos itens 4.1 e 4.2. Esse maior valor torna a monocamada mais rígida, diferente das monocamadas de lipídios puros, que são facilmente comprimidas. Assim, pode-se dizer que em uma monocamada mista de DPPC:DPPS, as proteínas se ligam aos lipídios, diminuindo sua fluidez. Essa maior rigidez facilita a transferência da monocamada aos filmes LB. Comportamento semelhante foi encontrado nos estudos de Zhang *et al*⁹³ utilizando-se o mesmo sistema misto.

Tabela 7 – Área molecular mínima e módulos compressionais em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ para as monocamadas de Langmuir nas duas subfases.

Monocamada	Subfase	Área mínima ($\text{\AA}^2 \text{molécula}^{-1}$)	C_s^{-1} (mN m^{-1})	% de expansão
DPPC:DPPS (8:2)	H ₂ O	65 ± 2	145 ± 12	-
DPPC:DPPS (8:2) + colágeno	H ₂ O	64 ± 2	163 ± 13	-
DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5	H ₂ O	72 ± 3	118 ± 11	11
DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5	H ₂ O	69 ± 1	123 ± 13	6
DPPC:DPPS (8:2)	CaCl ₂	69 ± 2	262 ± 15	-
DPPC:DPPS (8:2) + colágeno	CaCl ₂	71 ± 1	131 ± 10	-
DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5	CaCl ₂	77 ± 2	187 ± 10	12
DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5	CaCl ₂	86 ± 4	233 ± 19	25

4.3.1 Estabilidade das Monocamadas de Langmuir mistas de DPPC e DPPS

A Figura 25 apresenta as estabilidades das monocamadas mistas contendo DPPC e DPPS na fração molar (8:2). A Figura 25A traz as isotermas em subfase contendo água pura e a Figura 25B em subfase contendo CaCl_2 10 mmol L^{-1} .

Figura 25 – Estabilidade das monocamadas de DPPC:DPPS (8:2) na ausência e presença de proteínas em subfase contendo (A) água pura e (B) CaCl_2 10 mmol L^{-1} . DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—) e DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—).

Analisando a Figura 25, observa-se que as monocamadas foram mais estáveis em subfase contendo água pura (Figura 25A), já que apresentaram uma menor variação da π inicial ao longo do tempo. Já em subfase contendo CaCl_2 , as monocamadas apresentaram aumento acentuado da π inicial. Esse comportamento pode ser explicado pelo desbalanceamento de cargas na interface na presença de Ca^{2+} ou pela interação colágeno/AnxA5 que mantém ambas proteínas na interface, como mostram as isotermas da Figura 23B.

Embora na presença de Ca^{2+} as isotermas apresentaram-se menos estáveis ao longo do tempo, observa-se que a presença das duas proteínas (Figura 25B – linha rosa) fez com que a monocamada dos lipídios (Figura 25B – linha preta) se tornasse mais estável.

4.4 Formação dos Filmes LB

Analisando-se os resultados encontrados e discutidos nos itens anteriores, pode-se escolher o sistema que apresentasse as melhores condições para a formação dos filmes LB e posterior formação das matrizes orgânicas, ou seja, o sistema em que as interações colágeno/AnxA5/lipídios fossem favorecidas, monocamadas estáveis ao longo do tempo e no estado LC para serem mais facilmente transferidas para suportes sólidos e que fosse mais próximo à realidade com relação à composição da membrana das VMs. Assim, o sistema escolhido foi o DPPC:DPPS (8:2) em subfase contendo CaCl_2 10 mmol L⁻¹.

Como relatado no item 3.6, as monocamadas foram formadas por uma mistura binária de DPPC:DPPS (8:2), na ausência e na presença de colágeno e/ou AnxA5.

4.5 Caracterização dos Filmes LB

4.5.1 Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)

As monocamadas foram transferidas para um cristal de quartzo recoberto com ouro a π constante e igual a 30 mN m⁻¹. Conhecendo a área do cristal (0,662 cm²) e a área ocupada por molécula nesta pressão, foi possível determinar a quantidade teórica de moléculas de lipídios depositados por unidade de área. Com este resultado, subtraindo-se da massa total obtida a partir da QCM, foi possível inferir sobre a massa de proteína depositada.

Os valores obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores obtidos para massa de uma bicamada de DPPC:DPPS, em presença de proteína na última camada por QCM, massa teórica calculada a partir das isotermas e massa estimada de proteína a partir da transferência de uma monocamada ao suporte sólido.

Filme	Massa depositada QCM (ng)	Massa teórica* (ng)	Massa estimada de proteína (ng)
Colágeno	599 ± 72	555 ± 61	44 ± 4
AnxA5	767 ± 76	653 ± 71	114 ± 12
Colágeno + AnxA5	1425 ± 156	1255 ± 138	170 ± 18

*calculada a partir das áreas mínimas das isotermas.

Por meio da Tabela 8 pode-se observar que massa maior de proteína (170 ng) é transferida com a mistura colágeno + AnxA5. Ainda, o somatório das massas individuais de colágeno (44 ng) e AnxA5 (114 ng) é próximo ao valor encontrado para a mistura. Os resultados corroboram com os obtidos a partir das isotermas (Figura 23B – linha rosa), ou seja, colágeno e AnxA5 permanecem juntas na interface com os lipídios, possibilitando sua transferência para suportes sólidos.

O comportamento observado novamente é explicado pelas interações eletrostáticas que direcionam as proteínas na ligação com os lipídios da membrana, como já reportado na literatura³¹ e discutido nos itens anteriores.

4.5.2 Avaliação da bioatividade dos filmes LB

Os filmes LB formados por DPPC:DPPS e na ausência e presença de proteínas foram depositados sobre as superfícies do Ti, os quais foram imersos em soluções de CaCl_2 e tampão e posteriormente em solução de SBF, com o intuito de se avaliar a

bioatividade, conforme melhor descrito no item 3.6. A formação mineral sobre as superfícies foi então caracterizada:

a) Espectroscopia de Infravermelho

A identificação dos grupos formados sobre as superfícies de Ti modificadas com os filmes LB de lipídios e proteínas e após a exposição à solução de SBF foi realizada utilizando-se a técnica ATR-FTIR.

A Figura 26 mostra o controle (Ti), as superfícies de Ti modificadas com os filmes LB e amostra de osso humano.

Figura 26 – Espectros de FTIR-ATR do controle (—) e das superfícies de Ti modificadas após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF (37°C). DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—) e amostra de osso humano (—)

Os principais grupos identificados nesse trabalho, assim como na amostra de osso humano foram: banda intensa em $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ associada ao estiramento ν_3 do grupo PO_4^{3-} ^{95,96} e $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ associada ao estiramento P-OH no grupo HPO_4 ; banda em $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ associada ao estiramento ν_3 do grupo CO_3^{2-} ⁹⁷; banda larga em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento do grupo -OH, assim como a banda em 1620 cm^{-1} atribuída à frequência vibracional de modos de deformação de moléculas de água, como apresentado na literatura⁹⁸.

As bandas encontradas nos espectros da Figura 26 evidenciam a formação de HAp nas superfícies de Ti modificadas com filmes LB. No espectro do Ti puro (Figura 26 – linha verde) essas mesmas bandas são encontradas, mas são menos intensas. Nosso grupo já mostrou, em trabalhos anteriores^{61,62,81} a formação de HAp sobre filmes LB depositados sobre Ti em presença e ausência de colágeno. Enquanto em Ti ocorre formação de partículas isoladas, a presença de lipídios proporciona uma matriz apropriada para deposição de filmes contínuos deste mineral. A precipitação pode ser modulada por fatores como: concentração superficial de Ca^{2+} (modificada a partir das áreas mínimas dos lipídios utilizados), tipo de cabeça polar e presença de colágeno. No presente estudo, a deposição de AnxA5 e da mistura AnxA5 + colágeno foi explorada pela primeira vez.

Como as amostras foram mantidas em dessecador para retirada de água, a banda larga em 3400 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo -OH, que aliada ao estiramento do grupo fosfato, evidenciam a formação de HAp.

Na Figura 26, nas superfícies modificadas por filmes LB e também na amostra de osso humano, nota-se a presença de bandas relacionadas ao estiramento do grupo carbonato. Como já relatado na literatura⁹⁹, pode ocorrer no sistema biológico substituições do Tipo-B, em que o grupo PO_4^{3-} é substituído por CO_3^{2-} na estrutura de apatitas. Estudos¹⁰⁰ mostram que a formação de apatitas carbonatadas em implantes pode favorecer a fixação dos biomateriais no tecido ósseo.

As mesmas bandas observadas no espectro da amostra do osso são também encontradas nos espectros das amostras desse trabalho. Assim, pode-se evidenciar a similaridade entre os materiais biomiméticos obtidos e o tecido ósseo natural.

Observa-se ainda que os espectros dos filmes LB de lipídios na ausência e presença das proteínas foram semelhantes. Diferenças foram observadas nos picos de difração e nas imagens de MEV, que serão discutidas nos próximos itens.

b) Difração de raios X

A técnica de DRX foi utilizada para investigar a fase mineral formada sobre as superfícies de titânio. A Figura 27 mostra uma comparação entre os difratogramas obtidos para os filmes LB mineralizados e uma amostra de osso humano em pó (linha laranja).

Observa-se, tanto nos filmes como na amostra de osso, alargamento dos picos, sendo esse provocado pela baixa cristalinidade da HAp. Como discutido no item anterior, a substituição do Tipo B levou à substituição do grupo PO_4^{3-} por CO_3^{2-} , o que alterou a cristalinidade da estrutura da HAp, assim como o tamanho do cristal¹⁰¹.

A presença de lipídios e proteínas levou à precipitação de HAp de baixa cristalinidade, assim como ocorre no processo de biomineralização óssea. Exceção é observada para a amostra contendo a mistura AnxA5 + colágeno. A análise está sendo repetida para confirmar o resultado, pois como foi mostrado por FTIR e será mostrado na próxima seção, esta amostra também é bioativa.

Figura 27 – Difratogramas de raios-X para as superfícies de Ti modificadas com filmes LB de lipídios e proteínas, e após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e

SBF (37°C). DPPC:DPPS (8:2) puro (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno (—), DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5 (—), DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5 (—) e amostra de osso humano (—). Os picos marcados por HAp estão de acordo com o padrão COD 9001233 e os picos marcados por * correspondem ao suporte de Ti (padrão COD 9008517).

Analisando-se a Figura 27 observa-se a formação de HAp em todas as superfícies de Ti modificadas com filmes LB e expostas aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato e SBF. Isso ocorreu devido a supersaturação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , levando a formação do fosfato de cálcio. Porém, como será explicado no próximo item, a presença dos lipídios e proteínas é essencial para formação de filmes homogêneos.

c) Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 28 apresenta as imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com os filmes LB, na presença e ausência das proteínas, assim como o controle (Ti). Como pode ser observado, a exposição dessas superfícies em ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato e em SBF levou à formação de HAp, semelhante à encontrada no osso humano, comprovada pela análise estrutural dos filmes LB, como descrita nos itens anteriores. Além disso, a Figura 28 se assemelha aos trabalhos encontrados na literatura, como Xia *et al*¹⁰² no estudo de formação de apatitas sobre discos de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ contendo colágeno, e trabalhos anteriores do grupo⁶², com formação de HAp em estruturas tipo-agulha. Essa morfologia é característica de HAp biológica.

Figura 28 – Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com filmes LB de lipídios, na ausência e presença de proteínas, expostos a ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato, após SBF. (A) Controle (Ti), (B) DPPC:DPPS (8:2), (C) DPPC:DPPS (8:2) + colágeno, (D) DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5, (E) DPPC:DPPS (8:2) + colágeno + AnxA5.

Como já descrito nos itens anteriores, houve a formação de HAp até mesmo no controle (Ti). Porém, como pode ser observado na Figura 28, há diferenças no formato e na distribuição das nanopartículas.

No controle (Figura 28A) observa-se a formação de partículas isoladas de HAp, enquanto que nas superfícies modificadas com filmes LB (Figura 28 B, C, D e E), observa-se agregados de nanopartículas com distribuição homogênea de tamanho. Esses resultados reforçam a ideia da importância da presença de lipídios e proteínas, principalmente no controle da nucleação, mostrando assim que as partículas se agregam para formar filmes homogêneos na presença de uma matriz orgânica, como apresentado por De Souza *et al*⁸¹.

Os resultados aqui encontrados reforçam ainda as vantagens do uso dos filmes LB quando comparados a outras técnicas para modificação de superfícies, já que foi possível a formação de partículas manométricas e organizadas, características essenciais de materiais para uso biomédico¹⁰³.

4.5.3 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície

Os valores da energia livre de superfície (ELS), das componentes polares (γ^p) e dispersivas (γ^d), assim como os valores dos ângulos de contato (θ_c) usando água Milli-Q[®] estão representados na Tabela 9. Esses resultados referem-se ao Ti puro e às superfícies de Ti modificadas com os filmes LB de lipídios e proteínas, após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato e à solução de SBF.

Tabela 9 – Valores de ELS, γ^p , γ^d e θ_c com a água para o Ti puro e para as superfícies de Ti modificadas com os filmes LB de lipídios e proteínas após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato e à solução de SBF.

	ELS (mJ m^{-2})	γ^p (mJ m^{-2})	γ^d (mJ m^{-2})	θ_c (°)
Ti puro	$50,03 \pm 0,42$	$21,41 \pm 1,32$	$28,63 \pm 1,53$	$56,80 \pm 0,20$
DPPC:DPPS (8:2)	$71,94 \pm 0,63$	$42,12 \pm 0,90$	$28,16 \pm 1,61$	$8,00 \pm 0,33$
DPPC:DPPS (8:2) + Colágeno	$71,83 \pm 1,00$	$42,98 \pm 0,53$	$28,85 \pm 1,30$	$5,00 \pm 0,54$
DPPC:DPPS (8:2) + AnxA5	$72,69 \pm 0,35$	$43,31 \pm 0,66$	$28,63 \pm 1,32$	$4,70 \pm 0,56$
DPPC:DPPS (8:2) + Colágeno + AnxA5	$73,02 \pm 0,25$	$42,86 \pm 0,50$	$29,16 \pm 1,29$	$3,00 \pm 0,50$

Como pode ser observado na Tabela 9, os valores da ELS das superfícies de Ti modificadas foram maiores que a do Ti puro, cujo valor se encontra próximo ao da literatura¹⁰⁴. O aumento nesse parâmetro pode ser explicado pelo crescimento de HAP nas superfícies modificadas pelos filmes LB após exposição aos ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato e à solução de SBF.

A presença da fase mineral levou a diminuição dos ângulos de contato com a água e aumento nos valores de γ^p , tornando as superfícies mais hidrofílicas. Como já discutido em diversos trabalhos da literatura^{72,104}, o aumento na hidrofiliidade favorece a ligação da superfície com as proteínas, promovendo uma adesão celular mais eficiente¹⁰⁵.

Analisando-se os parâmetros para as superfícies de Ti modificadas, observa-se que os valores de ELS, γ^p e γ^d são próximos quando os desvios são considerados, com maior diferença apenas nos valores dos ângulos de contato, os quais são menores na presença das proteínas, sendo mais hidrofílica a superfície com os lipídios e as duas proteínas juntas.

Conclusões

No presente estudo, foi possível investigar as interações de proteínas osteogênicas importantes, como colágeno e AnxA5, com monocamadas de lipídios, utilizando o método mimético das monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett.

As monocamadas foram formadas pelos principais lipídios das membranas celulares. As interações proteína/proteína e proteína/lipídio foram avaliadas utilizando-se as isotermas. Os resultados encontrados mostraram a migração das proteínas para a interface. As interações foram dependentes das cargas das proteínas nas condições de trabalho e dos lipídios nas monocamadas.

Analisando-se os resultados encontrados, pode-se escolher o sistema binário DPPC:DPPS (8:2) e o uso da subfase de CaCl_2 para formação dos filmes LB e posterior formação das matrizes orgânicas, tornando o modelo mais próximo à realidade com relação à composição da membrana das VMs.

Foi possível avaliar que a mistura binária de lipídios apresentou comportamento distinto daquele observado para os lipídios puros, mas em todos eles, principalmente na presença de íons Ca^{2+} , foi evidente a importância da AnxA5 para que ocorresse a interação dos lipídios com colágeno.

Na presença de íons Ca^{2+} as isotermas apresentaram-se menos estáveis ao longo do tempo, porém a presença das duas proteínas juntas fez com que a monocamada dos lipídios se tornasse mais estável.

Em relação aos valores de Cs^{-1} , foi possível concluir que as monocamadas se encontravam no estado líquido-condensado, facilitando sua transferência aos filmes LB. O mesmo resultado pode ser comprovado pelo uso da QCM, já que se observou um aumento da massa depositada na presença das duas proteínas juntas. Os resultados corroboram com obtidos nas isotermas: colágeno e AnxA5 permanecem juntas na interface com os lipídios possibilitando sua transferência para suportes sólidos.

Os filmes LB formados foram depositados sobre as superfícies de Ti, os quais foram imersos em soluções de CaCl_2 e tampão fosfato, e posteriormente em solução de SBF, com a finalidade de ser avaliar a bioatividade. Utilizando-se as técnicas adequadas, pode-se caracterizar a fase mineral formada.

Correlacionando-se os resultados encontrados nas análises por FTIR, MEV e DRX, pode-se observar a formação de hidroxiapatita nas superfícies de Ti modificadas com os filmes LB, comprovando-se assim sua bioatividade. Além disso, os resultados

encontrados reforçam a importância da presença de lipídios e proteínas, principalmente no controle da nucleação.

Resultados de molhabilidade e energia livre de superfície mostraram que a presença da fase mineral nas superfícies de Ti modificadas tornou-as mais hidrofílicas, o que pode facilitar adesão celular.

Portanto, a realização desse trabalho possibilitou o estudo das interações de proteínas osteogênicas com lipídios, utilizando-se as monocamadas de Langmuir e os filmes Langmuir-Blodgett como modelos de membrana celular. Além disso, foi possível a criação de superfícies bioativas que simularam a composição e estrutura do tecido ósseo, as quais poderão ser utilizadas para aprimorar características dos biomateriais.

Referências

1. Liljeblad, J. F. D. *Biomimetic Membranes : Molecular Structure and Stability Studies by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy*. Technology (2010).
2. Pavinatto, F. J. Interação entre quitosana e modelos de membrana celular : filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Tese doutorado apresentada à Univ. São Paulo* 163 (2010).
3. Vance, J. E. & Vance, D. E. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells 1 , 2. **128**, 113–128 (2004).
4. Dee, K. C., Puleo, D. A., Bizios, R. An introduction to tissue-biomaterial interactions. Wiley-Liss (2003).
5. Bolean, M. Fosfatase Alcalina Reconstituída em ‘ Lipid Rafts ’. *Dissertação mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. FFCLRP/USP* (2010).
6. Paulick, M. G. & Bertozzi, C. R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* **47**, 6991–7000 (2008).
7. Guimarães, J. A. Estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett visando o desenvolvimento de biossensor de colesterol. *Dissertação mestrado apresentada à Univ. Federal do Rio de Janeiro* (2009).
8. Albrecht, O. The construction of a microprocessor-controlled film balance for precision measurement of isotherms and isobars. *Thin Solid Films* **99**, 227-234 (1983).
9. Barnes, G. T. & Gentle, I. R. Interfacial science: an introduction. Oxford 10-20 (2011).
10. Kawaguchi, M. Thermodynamic, structural and rheological properties of polymer films at the air-water interface. *Prog. Polym. Sci.*, **18**, 341–376 (1993).
11. Caseli, L. Adsorção e atividade enzimática da fosfatase alcalina de placa óssea de camundongos em monocamadas líquidas e filmes Langmuir-Blodgett de fosfolipídios. *Dissertação mestrado apresentada à Univ. São Paulo* (2001).
12. Davies, J. T., Rideal, E. K. Interfacial Phenomena. New York, Academic Press (1963).
13. Blodgett, K. B., Langmuir, I. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.*, **51**, 964–983 (1937).
14. Ramos, A. P. Modificação de superfícies metálicas por meio da deposição de filmes finos orgânicos LB/LbL e filmes híbridos contendo CaCO₃. *Tese doutorado apresentada à Univ. São Paulo* (2009).
15. Hormel, T. Lipid monolayers : why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 438–443 (1997).
16. Schwartz, D. K., Langmuir-Blodgett film structure. *Surface Science Reports*, **27**, 241-334 (1997).

17. Ciancaglini, P., *et al.* Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Rev.*, **4**, 67–81 (2012).
18. Stefaniu, C., Brezesinski, G. & Möhwald, H. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **208**, 197–213 (2014).
19. Chapman, D., Physical Studies of Lipid-lipid and Lipid-protein Interactions. *Lipids*, **4**, 251–260.
20. Glimcher, M. J. Bone : Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular , Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation. Review in Mineralogy & Geochemistry., **64**, 223–282 (2006).
21. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte : Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).
22. Tate, M. L. K., Adamson, J. R., Tami, A. E. & Bauer, T. W. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry.* **36**, 1–8 (2004).
23. Teitelbaum, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science.* **289**, 1504–1508 (2000).
24. Pande, G., Sravanthi, R., Kapoor, R. Bioinspired and biomimetic functional hybrids as tools for regeneration of orthopedic interfaces. *Advances in Biomimetics.* 373–396 (2011).
25. Velleman, S. G. The Role of the Extracellular Matrix in Skeletal Development. *Poultry Science.* **79**, 985–989 (2000).
26. Goissis, A. P. A. Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura:atividade biológica. *Dissertação mestrado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos* (2007).
27. Silva, T. F., Penna, A. L. B. Colágeno : Características químicas e propriedades funcionais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **71**, 530–539 (2012).
28. Jones, C. A. R., Liang, L., Lin, D., Jiao, Y. & Sun, B. The spatial-temporal characteristics of type I collagen-based extracellular matrix. *Soft Matter* **10**, 8855–63 (2014).
29. Costa, A. C. F. M., Lima, M. G., Lima, L. H. M. A., Cordeiro, V. V & Viana, K. M. S. Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* **3**, 29–38 (2009).
30. Glimcher, M. J. The Nature of the Mineral Phase in Bone : Biological and Clinical Implications. *Metabolic Bone Disease* (1998).
31. Katz, E. P. & Li, H. Structure and Function of Bone Collagen Fibrils. 1–15 (1973).
32. Wuthier, R. E. Matrix Vesicles : structure , composition , formation and function in calcification. *Frontiers in Bioscience.* **16**, 2812–2902 (2011).
33. Golub, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et Biophysica Acta BBA - Gen. Subj.* **1790**, 1592–1598 (2009).

-
34. Anderson, H. C., Garimella, R., Tague, S. E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Frontiers in Bioscience*. **10**, 822-837 (2005).
 35. Bottini, M., Mebarek, S., Anderson, K. L., Strzelecka-Kiliszek, A., Bozycki, L., Simão, A. M. S., Bolean, M., Ciancaglini, P., Pikula, J. B., Pikula, S., Magne, D., Volkmann, N., Hanein, D., Millán, J. L., Buchet, R., Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **1862** (3), 532-546 (2018).
 36. Anderson, H. C. Matrix Vesicles and Calcification. *Current Rheumatology Reports*. **5**, 222-226 (2003).
 37. Simão, A. M. S., Yadav, M. C., Ciancaglini, P., Millán, J. L. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **43**(3) 234-241 (2010).
 38. Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F. & Turnay, J. Annexin-Phospholipid Interactions . *Functional Implications. Int J Mol Sci.* **14**, 2652-2683 (2013).
 39. Bolean, M., Simão, A. M. S., Barioni, M. B. & Favarin, B. Z. Biophysical aspects of biomineralization. (2017).
 40. Balcerzak, M., Hamade, E., Zhang, L., Pikula, S., Azzar, G., Radisson, J., Bendorowicz-Pikula, J., Buchet, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochimica Polonica*. **50**, 1019-1038 (2003).
 41. Kirsch, T., Nah, H-D., Demuth, D. R., Harrison, G., Golub, E. E., Adams, S. L., Pacifici, M. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition : implications for cartilage mineralization. *Biochemistry*. **36**, 3359–3367 (1997).
 42. Wuthier, R. E., Lipscomb, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front. Biosci.* **17**, 2812-2902 (2011).
 43. Genge, B. R., Wu, L. N. Y. & Wuthier, R. E. Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization : Effect of annexin A5 , phosphatidylserine , and type II collagen. **367**, 159–166 (2007).
 44. Bolean, M. Reconstituição da Anexina V em sistemas de lipossomos : associação com a Fosfatase Alcalina e correlação com estudos de biomineralização. Tese Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. FFCLRP/USP (2014).
 45. Huber, R., Römisch, J. & Paques, E. P. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* **9**, 3867–3874 (1990).
 46. Gerke, V. & Moss, S. E. Annexins : From structure to function. *Physiol Rev.* **82**, 331–371 (2002).

-
47. von der Mark, K., Mollenhauer, J. Annexin V interactions with collagen. *CMLS Cell. Mol. Life sci.* **53**, 539–545 (1997).
 48. Berendes, R., Voges, D., Demange, P., Huber, R., Burger, A., Structure-functions analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science*. **262**, 427-430 (1993).
 49. Vogl, T., Jatzke, C., Hinz, H. J., Benz, J., Huber, R. Thermodynamic stability of annexin V E17G: equilibrium parameters from an irreversible unfolding reaction. *Biochemistry*. **36**(7), 1657-1668 (1997).
 50. Kim, H. J. & Kirsch, T. Collagen / Annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**, 10310–10317 (2008).
 51. Gemini-Piperni, S., Takamori, E. R., Sartoretto, S. C., Paiva, K. B. S, Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Zambuzzi, W. F. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 88–98 (2014).
 52. Hench, L., Polak, J. Third generation biomedical materials. *Science*. **295**, 1014-1017 (2002).
 53. Williams, D. F. On the nature of biocompatibility. *Biomaterials*. **30**, 2941-2953 (2008).
 54. Kurella, A., Dahotre, N. B. Surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. *J. Biomater. Appl.* **20**, 5-50 (2005).
 55. Paterlini, T. T., Nogueira, L. F. B., Tovani, C. B. & Cruz, M. A. E. The role played by modified bioinspired surfaces in interfacial properties of biomaterials. *Biophys Rev.* **9**, 683–698 (2017).
 56. Kawachi, E. Y., Bertran, C.A., dos Reis, R.R., Alves, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim. Nova*. **23**, 518–522 (2000).
 57. Kulkarni, M., Mazare, A., Gongadze, E., Perutkova, S., Kralj-Iglic, V., Miloserv, I., Schmuki, P., Ialic, A., Mozetic, M. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*. **26**, 1-18 (2015).
 58. Santiago-Medina, P., Sundaram, P. A., Difffoot-Carlo, N. Titanium Oxide : A bioactive factor in osteoblast differentiation. *International Journal of Dentistry*. **2015**, 1-9 (2015).
 59. Liu, X., Chu, P. K., Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Reports*. **47**, 49–121 (2004).
 60. Li, Y., Yang, C., Zhao, H., Qu, S., Li, X., Li, Y. New developments of Ti-based alloys for biomedical applications. *Materials*. **7**, 1709–1800 (2014).
 61. Cruz, M. A. E., Ruiz, G. C. M., Faria, A. N., Zancanela, D. C., Pereira, L. S., Ciancaglini, P., Ramos, A. P. Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **370**,

- 459–468 (2016).
62. Ruiz, G. C. M., Cruz, M. A. E. C., Faria, A. N., Zancanela, D. C., Ciancaglini, P., Ramos, A. P. Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. *Mater. Sci. Eng. C*. **77**, 102-110 (2017).
 63. Liu, H., Webster, T. J. Nanomedicine for implants : A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*. **28**, 354–369 (2007).
 64. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung. *Zeitschrift Fur Phys*. **155**, 206-222 (1959).
 65. Aulock, F. W., Kennedy, B. M., Schipper, C. I., Castro, J. M., Martin, D. E., Oze, C., Watkins, J. M., Wallace, P. J., Puskar, L., Bégue, F., Nichols, A. R. L., Tuffen, H. Advances in Fourier transform infrared spectroscopy of natural glasses : From sample preparation to data analysis. *Lithos*. **206–207**, 52–64 (2014).
 66. Ferreira, M., Caetano, W., Itri, R., Tabak, M., Oliveira, O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Quim. Nova*. **28**, 502–510 (2005).
 67. Hind, A. R., Bhargava, S. K., McKinnon, A. At the solid/liquid interface : FTIR/ATR - the tool of choice. *Advances in Colloid and Interface Science*. **93**, 91-114 (2001).
 68. Cullity, B. D., Elements of X-Ray diffraction – Cap. 3-5. Addison-Wesley Publishing Company Inc. 1956.
 69. Warren, B. E. X-Ray diffraction. Dover Publications, Inc. 1969.
 70. Dedavid, B. A., Gomes, C. I., Machado, G. Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparação de amostras. EDIPUCRS. (2007).
 71. Chou, Y., Huang, W., Dunn, J. C. Y., Miller, T. A., Wu, B. M. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability , proliferation , and gene expression. *Biomaterials*. **26**, 285–295 (2005).
 72. Van den Dolder, J., Jansen, J. A. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p -nitrophenylchloroformate to titanium. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **83**, 712-719 (2007).
 73. Sawase, T., Jimbo, R., Baba, K., Shibata, Y., Ikeda, T., Atsuta, M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin. Oral Impl. Res.* **19**, 491–496 (2008).
 74. Luz, A. P., Ribeiro, S., Pandolfelli, V.C. Artigo de revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica*. **54**, 174-183 (2008).
 75. Owens, D. K., Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J.*

- Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741–1747 (1969).
76. Usha, R., Dhathathreyan, A., Mandal, A. B., Ramasami, T. Behavior of collagen films in presence of structure modifiers at solid – liquid interface. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **42**, 3859–3865 (2004).
77. Gentleman, M. M., Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast – biomaterial interactions. *International Materials Reviews.* **59**(8), 417-429 (2017).
78. Logue, S. E., Elgendy, M. & Martin, S. J. Expression , purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat, Protoc.* **4**, 1383–1395 (2009).
79. Toimil, P., Prieto, G., Minones, J., Sarmiento, F. A comparative study of F-DPPC / DPPC mixed monolayers . Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13323–13332 (2010).
80. Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1286**, 183-223 (1996).
81. de Souza, I. D., Cruz, M. A. E., de Faria, A. N., Zancanela, D. C., Simão, A. M. S., Ciancaglini, P., Ramos, A. P. Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate-LB film as template. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **118**, 31–40 (2014).
82. Andrade, Â. L., Domingues, R. Z. Cerâmicas bioativas – estado da arte. *Quim. Nova.* **29** (1) 100–104 (2006).
83. Kokubo, T., Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* **27**, 2907–2915 (2006).
84. Okamura, E., Umemura, T., Takenaka, T. Molecular orientation in thin Langmuir-Blodgett films of dipalmitoylphosphatidylcholine as studied by FTIR transmission and reflection-absorption spectroscopy. *Can. J. Chem.* **69**, 7–10 (1991).
85. Sovago, M., Wurpel, G. W. H., Smits, M., Muller, M., Bonn, M. Calcium-induced phospholipid ordering depends on surface pressure. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11079–11084 (2007).
86. Casillas-ituarte, N. N., Chen, X., Castada, H., Allen, H. C. Na⁺ and Ca²⁺ Effect on the hydration and orientation of the phosphate group of DPPC at air - water and air - hydrated silica interfaces. *J. Phys. Chem. B.* **114**, 9485–9495 (2010).
87. Kim, H. J., Kirsch, T. Collagen / Annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *J. of Biol. Chem.* **283**, 10310–10317 (2008).
88. Gew, L. T., Misran, M. Albumin-fatty acid interactions at monolayer interface. *Nanoscale Research Letters.* **9**(218), 2-6 (2014).
89. Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H. J., Hinz, H. J., Gerke, V., Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Letters.* **438**, 279-284 (1998).
90. Steinkopf, S., Hanekam, L., Schaathum, M., Budnjo, A., Haug, B. E., Nerdal, W.

- Interaction of local anaesthetic articaine enantiomers with brain lipids : A Langmuir monolayer study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **47**, 394–401 (2012).
91. Pandit, S. A., Bostick, D., Berkowitz, M. L. Mixed bilayer containing dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylserine : lipid complexation , ion binding , and electrostatics. *Biophys. J.* **85**, 3120–3131 (2003).
 92. Ross, M., Steinem, C., Galla, H. J., Janshoff, A. Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC / DPPS Langmuir - Blodgett Layers. *Langmuir*. **17**, 2437–2445 (2001).
 93. Zhang, L., Hao, C., Feng, Y., Gao, F., Lu, X., Li, J., Sun, R. Analysis of the induction of the myelin basic protein binding to the plasma membrane phospholipid monolayer. *Chin. Phys. B.* **25**(9), 142-150 (2016).
 94. Antonakos, A., Liarokapis, E., Leventouri, T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterial*. **28**, 3043–3054 (2007).
 95. Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C. A. Van., Groot, K., Layrolle, P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *J. Am. Ceram. Soc.* **85** (3), 517–522 (2002).
 96. Andersen, F. A., Brecevic, Lj., Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate. *Acta. Chem. Scand.* **45**, 1018-1024 (1991).
 97. Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., With, G., Sommerdijk, N. A. J. M. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat. Mater.* **9**(12), 1004-1009 (2010).
 98. Hua Cheng, Z., Yasukawa, A., Kandori, K., Ishikawa, T., FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 1501-1505 (1998).
 99. Ohtsu, N., Nakamura, Y., Semboshi, S. Thin hydroxyapatite coating on titanium fabricated by chemical coating process using calcium phosphate slurry. *Surf. Coat. Technol.* **206**, 2616–2621 (2012).
 100. Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X., Zhang, X. D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials*. **24**, 4663–4670 (2003).
 101. Hench, L. L., Wilson, J. *An introduction to bioceramics*. **396** (1993).
 102. Xia, Z., Yu, X., Wei, M. Biomimetic collagen / apatite coating formation on Ti6Al4V substrates. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **100**, 871–881 (2012).
 103. Zhao, L., Mei, S., Chu, P. K., Zhang, Y. & Wu, Z. The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions. *Biomaterials*. **31**, 5072–5082 (2010).
 104. Sandrino, B. Estudos de Filmes de Lagmuir e LB de complexo fosfínico de rutênio visando potenciais aplicações biológicas. *Tese Doutorado apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa* (2014).

105. Masaki, C., Schneider, G. B., Zaharias, R., Seabold, D. & Stanford, C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin. Oral Implants Res.* **16**, 650–656 (2005).