UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

THIERS MASSAMI UEHARA

**Estudo da interação de nanomateriais com
modelos de membranas celulares e com
células-tronco neurais**

**São Carlos
2014**

THIERS MASSMI UEHARA

**Estudo da interação de nanomateriais com
modelos de membranas celulares e com
células-tronco neurais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida
original na unidade

**São Carlos
2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

U22e Uehara, Thiers Massami
Estudo da interação entre nanomateriais com modelos
de membrana celulares e células troncos neurais /
Thiers Massami Uehara; orientador Valtencir Zucolotto;
coorientador Paulo Barbeitas Miranda. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. Modelos de membranas celulares. 2.
Nanomateriais. 3. Filmes Ultrafinos. 4. Espectroscopia
SPG. 5. Células-tronco neurais. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Licenciado **THIERS MASSAMI UEHARA**.

Título da tese: "Estudo da interação de nanomateriais com modelos de membranas celulares e com células-tronco neurais".

Data da defesa: 19/09/2014.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Vallencir Zucolotto (Orientador)**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovado

Prof. Dr. **Francisco Eduardo Gontijo Guimarães**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovado

Dr. **Daniel Souza Corrêa**
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

APROVADO

Prof. Dr. **Flavio Leandro de Souza**
(Universidade Federal do ABC/UFABC)

APROVADO

Prof. Dr. **Lino Misoguti**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

***Dedico esta tese aos meus pais, pela
educação, apoio e aprendizado que
adquiri em toda a minha vida.***

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, por trilhar os melhores caminhos em minha vida, de tal forma que foi possível me mostrar o fantástico mundo em que vivemos, apesar de presenciarmos uma realidade com tantas adversidades.

Aos meus avós, pais e irmãs, que sempre incentivaram os meus estudos, durante a minha Graduação, Mestrado e Doutorado.

Aos meus amigos que foram ex-alunos do Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos: Junior, Ângelo, Luciano e Lucineia. Em especial ao Shikão, que sempre esteve presente nos momentos de dificuldade para poder discutir assuntos acadêmicos e da vida pessoal.

Aos funcionários do Grupo de Polímeros Ademir, Bertho, Níbio, Simone; e à simpatia do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior.

Aos meus amigos do Instituto de Física de São Carlos: Adriano, Ivan, Xuxa, Felipe e Thathy.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela sua imensa contribuição e companheirismo durante o desenvolvimento do meu doutorado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Barbeitas Miranda, pelos vários momentos em que me ajudou desde o período da minha iniciação científica e no mestrado, presente nos momentos para esclarecer dúvidas sobre assuntos científicos.

Ao meu supervisor Prof. Dr. Ki-Bum Lee, pela oportunidade oferecida durante a realização do meu estágio de Doutorado por um ano na Rutgers – *The State University of New Jersey*, nos Estados Unidos, juntamente com seus alunos Shreyas, Dean e Nicholas – foi possível aprender e colaborar para a comunidade científica internacional.

Ao *Robert Wood Johnson University Hospital (New Brunswick, New Jersey - USA)*, fornecendo todo o suporte e infraestrutura.

Aos meus amigos do período em que vivi nos Estados Unidos: Rafael, Fran, Maureen, Samir, Prof. Vitor, Yxiao, Letao e Fehmeed.

Aos amigos do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicidade: Camilo, Ieda, Juliana, Valéria, Henrique.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro durante o meu doutorado no Brasil e meu estágio nos Estados Unidos.

“Todos os acontecimentos são ótimas oportunidades para a Evolução”

Masaharu Taniguchi, Seicho-No-Ie

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

RESUMO

UEHARA, T. M. **Estudo da interação de nanomateriais com modelos de membranas celulares e com células-tronco neurais.** 2014. 120 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia promoveu uma nova fronteira no estudo da matéria, permitindo que materiais já conhecidos tivessem suas propriedades redescobertas ao serem manipulados em nível molecular. Vários materiais vêm apresentando relevância na nanociência e nanotecnologia, como os nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas (NPs) e óxido de grafeno, uma vez que os CNTs e óxido de grafeno são dotados de propriedades mecânicas, térmicas e elétricas que os tornam apropriados para o desenvolvimento e a aplicação em dispositivos, especialmente na área biotecnológica e de sensores. Diversas áreas se beneficiam com o uso da tecnologia em nanopartículas (NPs), por exemplo: alimentícia, médica, agronegócio, cosmética, etc. Uma possível perspectiva na utilização desses nanomateriais em sistemas biológicos torna muito interessante investigar como tais materiais interagem em nível molecular com modelos de membranas celulares e com células. Esta tese tem como objetivos: i) investigar detalhadamente a interação entre nanopartículas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$; $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$; PDAC ; Dextran) e nanotubos de carbono com modelos de membranas celulares; e ii) desenvolver nanofibras poliméricas pela técnica de *electrospinning* para ser utilizada com óxido de grafeno como modelos mimetizados (*scaffolds*) para a diferenciação de células-tronco neurais. Os filmes ultrafinos foram fabricados utilizando as técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Esses nanomateriais foram avaliados através da técnica de Espectroscopia vibracional por Geração de Soma de Frequências. A espectroscopia SFG é sensível a interfaces. Nanofibras de Poli(ϵ -Caprolactone) foram fabricadas pela técnica de *electrospinning*. *Scaffolds* com óxido de grafeno/Nanofibras de Poli(ϵ -Caprolactone) foram desenvolvidos como suportes sólidos para a diferenciação de células-tronco neurais de rato. Óxido de grafeno em diferentes concentrações foi incorporado nas nanofibras poliméricas. Os modelos deste sistema foram investigados por imagens de Microscopia Eletrônica de

Varredura. Os resultados mostraram que a carga eletrostática de cada fosfolípido utilizado pode influenciar nas interações com os nanomateriais (nanopartículas ou nanotubos de carbono), podendo resultar em uma desestruturação no modelo de membrana celular. *Scaffolds* contendo nanofibras de Poli(ϵ -Caprolactone) com óxido de grafeno representaram um eficiente modelo mimetizado para a interação/diferenciação de células-tronco neurais de rato conforme revelado por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. Estas imagens mostraram que o sistema de nanofibras de Poli(ϵ -Caprolactone) com 1,0 mg/mL de óxido de grafeno foram ideais para a diferenciação de oligodendrócitos em células-tronco neurais de rato.

Palavras-chave: Modelos de membrana celular. Nanomateriais. Filmes ultrafinos. Espectroscopia SFG. Nanofibras. Células-tronco neurais.

ABSTRACT

UEHARA, T. M. **Interaction of nanomaterials with cell membrane models and with neural stem cells**. 2014. 120 f. Thesis (Ph.D) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The development of nanoscience and nanotechnology promoted a new frontier on the study of matter, allowing conventional materials to exhibit novel or improved properties. Several materials show relevance in nanoscience and nanotechnology, such as carbon nanotubes (CNTs), nanoparticles (NPs) and graphene oxide. CNTs and graphene oxide, for example, exhibit unique mechanical, thermal and electrical properties, which make them appropriate to the development and application in devices, especially in biotechnology and sensors areas. Many areas are benefited from the use of nanoparticles (NPs), such as food, medical, agrobusiness, cosmetic etc. The perspective regarding the use of nanomaterials in biological systems requires the understanding on how these materials interact at the molecular level with cell membrane models and with cells. The objectives of this thesis are: i) to investigate the interaction between nanoparticles (Fe_3O_4 /Dextran; Fe_3O_4 /PDAC; PDAC; Dextran) and carbon nanotubes with cell membrane models; and ii) to develop polymeric nanofibers via electrospinning technique, to be used with graphene oxide as mimic models (scaffolds) in the differentiation of neural stem cells. The cell membrane models were manufactured using Langmuir and Langmuir-Blodgett techniques. These nanomaterials were evaluated through Sum Frequency Vibrational Spectroscopy (SFG). Poly(ϵ -Caprolactone) nanofibers were manufactured by electrospinning technique. Scaffolds with graphene oxide/Poly(ϵ -Caprolactone) were developed as solid supports for differentiation of rats neural stem cells. This biosystem was investigated via Scanning Electron Microscopy and biochemical essays. The results showed that the charge of each phospholipid influenced the interactions with the nanomaterials (nanoparticles or carbon nanotubes), in some cases, resulting in a disruption of the cell membrane model. Scaffolds with Poly(ϵ -Caprolactone) nanofibers obtained via electrospinning with

graphene oxide represented an efficient mimic model for interaction/differentiation of neural stem cells as shown via Scanning Electron Microscopy. The images revealed that the PCL nanofibers system with 1.0 mg/mL of graphene oxide were ideal to the differentiation of oligodendrocytes in neural stem cells.

Keywords: Cell membrane models. Nanomaterials. Ultrathin films. SFG Spectroscopy. Nanofibers. Neural stem cells.

LISTA DE SIGLAS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
BAM	<i>Brewster Angle Microscopy</i>
CNTs	<i>Carbon Nanotubes</i>
DFG	<i>Difference Frequency Generation</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
DPPG	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
E	Campo elétrico
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
FDA	<i>Foods and Drugs Association</i>
FE-SEM	<i>Field Emission Scanning Electron</i>
GO	<i>Graphene Oxide</i>
HGU	<i>Harmonic Generation Unit</i>
IR	<i>Infrared</i>
LB	Langmuir-Blodgett
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
MLV	Vesícula Multilamelar
MWCNTs	<i>Multiwall Carbon Nanotubes</i>
NPs	Nanopartículas
OE	Ondas Eletromagnéticas
OPA	<i>Optical Parametric Amplifier</i>
OPO	<i>Optical Parametric Oscillator</i>
PCL	Poli (ϵ -Caprolactone)
PDAC	Cloreto de Polidialidimetiamonium
SF	Soma de Frequências
SFG	<i>Sum Frequency Generation</i>
SHG	<i>Second Harmonic Generation</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SWCNTs	<i>Single Wall Carbon Nanotubes</i>
TR	<i>Transfer Rate</i>
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos nanotubos.....	28
Figura 2 - Possíveis formatos dos nanotubos de carbono.....	28
Figura 3 - Ilustração da estrutura de óxido de grafeno.....	30
Figura 4 - Representação da composição das células-tronco neurais.....	32
Figura 5 - Incidência e reflexão dos feixes visível, infravermelho e SFG no plano de propagação x, z	38
Figura 6 - Diferentes polarizações nos campos elétricos.....	38
Figura 7 - Luz com polarizações s e p na interface.....	39
Figura 8 - Feixe de luz incidido, transmitido e refletido.....	40
Figura 9 - Geometria dos feixes visível, infravermelho e SFG na interface n_1 e n_2	42
Figura 10 - Esquema geral da Cuba de Langmuir.....	44
Figura 11 - Modelo de isoterma ideal.....	45
Figura 12 - Processo de formação do filme de Langmuir-Blodgett.....	47
Figura 13 - Modelo de Mosaico Fluido da membrana celular.....	52
Figura 14 - Estruturas químicas.....	53
Figura 15 - Esquema simplificado de um espectrômetro SFG típico.....	56
Figura 16 - Modos vibracionais do metil e metileno.....	58
Figura 17 - Distribuição do tamanho das nanopartículas por DLS.....	61
Figura 18 - Imagens por BAM.....	62
Figura 19 - Isotermas de DPPG contendo diferentes subfases.....	63
Figura 20 - Isotermas de DPPC contendo diferentes subfases.....	64
Figura 21 - Possíveis interações entre os fosfolipídios com as nanopartículas.....	65
Figura 22 - Espectros SFG em subfase aquosa.....	67
Figura 23 - Espectros SFG de DPPG com diferentes nanopartículas na subfase.....	67
Figura 24 - Espectros SFG de DPPC com diferentes nanopartículas na subfase.....	69
Figura 25 - Interação entre DPPC com suas respectivas nanopartículas.....	69
Figura 26 - Isotermas com CNTs nas subfases.....	71
Figura 27 - Espectros SFG de monocamadas de DPPG e DPPC em subfases contendo SWCNT-COOH.....	72
Figura 28 - Espectros SFG de filmes LB com DPPG e DPPC.....	73

Figura 29 - Espectros dos filmes de LB com DPPG/SWCNTs-COOH e DPPC/SWCNTs-COOH.....	74
Figura 30 - Imagens de filmes LB por AFM.....	75
Figura 31 - Formação dos filmes LB contendo fosfolipídios, moléculas de CNTs desorganizados sobre o substrato de vidro.....	76
Figura 32 - Fabricação de nanofibras de polímeros por <i>electrospinning</i>	80
Figura 33 - Formação de nanofibras poliméricas ilustrando a formação do cone de Taylor.	81
Figura 34 - Estrutura química do Poli(ϵ -Caprolactone)	82
Figura 35 - Sequência da fabricação de nanofibras de PCL em substrato de vidro.....	83
Figura 36 - Imagens por microscopia do ângulo de contato da superfície de nanofibras de PCL.....	84
Figura 37 - Processo de formação de <i>scaffolds</i> : células-tronco neurais/GO/nanofibras.....	84
Figura 38 - Imagens de MEV das nanofibras de PCL com diferentes taxas de deposição..	85
Figura 39 - Imagens de MEV de <i>scaffolds</i> de nanofibras de PCL sob tensão de 10 kV.....	86
Figura 40 - Imagens de MEV de <i>scaffolds</i> de nanofibras de PCL sob tensão de 20 kV.....	87
Figura 41 - Média dos diâmetros das nanofibras em função dos modelos internos das agulhas em diferentes tensões elétricas.....	88
Figura 42 - Imagens de GO/nanofibras de PCL em diferentes concentrações.....	89
Figura 43 - Espectro Raman em <i>scaffolds</i> com GO/nanofibras de PCL em diferentes concentrações.....	90
Figura 44 - Imagens de SEM em <i>scaffolds</i> com células-tronco neurais de rato e nanofibras de PCL	91
Figura 45 - Imagens de SEM em <i>scaffold</i> contendo células-tronco neurais/GO/nanofibras de PCL.....	92
Figura 46 - Análise comparativa de qPCR de células-tronco neurais em diferentes <i>scaffolds</i>	111
Figura 47 - Imagens da diferenciação de oligodendrócitos em GO/nanofibras de PCL por microscopia de fluorescência PCL.....	112
Figura 48 - Expressão da sinalização da integrina sobre proteínas em <i>scaffolds</i>	113
Figura 49 - Imagens por microscopia de fluorescência de células-tronco neurais após 6 dias de cultura celular sobre diferentes <i>scaffolds</i>	115

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	TÓPICOS DE INTERESSE.....	25
2.1	Nanopartículas.....	25
2.2	Nanotubos de carbono.....	27
2.3	Óxido de grafeno.....	30
2.4	Células-tronco.....	31
2.5	Óptica não-linear e a geração de soma de frequências.....	33
2.5.1	Efeitos da óptica não-linear e a geração de soma de frequências.....	34
2.5.2	Interação do laser com a superfície.....	37
2.5.3	Equação de soma de frequências.....	41
2.6	Filmes de Langmuir.....	43
2.7	Filmes de Langmuir-Blodgett.....	46
3	OBJETIVOS.....	49
4	INTERAÇÃO ENTRE NANOMATERIAIS E MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES.....	51
4.1	Aspectos gerais da membrana celular.....	51
4.2	Experimental.....	53
4.2.1	Preparação dos filmes de Langmuir de DPPG e DPPC	54
4.2.2	Preparação dos filmes de Langmuir e Lanmguir-Blodgett de DPPG e DPPC em subfase com diferentes nanomateriais.....	54
4.2.3	Espectrômetro SFG.....	55
4.2.4	Espectroscopia SFG de filmes de Langmuir de DPPG e DPPC com os nanomateriais.....	57
4.2.5	Espectroscopia SFG de filmes de Langmuir-Blodgett de DPPG e DPPC com SWCNT-COOH.....	59
4.3	Resultados e discussão sobre a interação de modelos de membranas celulares com nanomateriais.....	60
4.3.1	Estudo da interação entre DPPG e DPPC com nanopartículas e estabilizantes	62
4.3.2	Estudo da interação entre DPPG e DPPC com CNTs.....	70

4.4	Conclusões sobre o estudo das interações entre modelos de membranas celulares com nanomateriais.....	76
5	PLATAFORMAS PARA CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO NEURAI.....	79
5.1	Nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i>	79
5.2	Experimental.....	82
5.3	Resultados e discussão sobre a fabricação de <i>scaffolds</i> de nanofibras com óxido de grafeno.....	85
5.4	Conclusões do estudo de células-tronco sobre <i>scaffolds</i>	93
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	95
7	Trabalhos Futuros.....	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE A.....	109
	APÊNDICE B.....	119

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia, promoveu-se uma nova fronteira no estudo da matéria, permitindo que materiais já conhecidos tivessem suas propriedades redescobertas e investigadas detalhadamente ao serem manipulados em nível molecular. Desta forma, os nanomateriais, cujas dimensões são da ordem de nanômetros, vêm apresentando grande relevância, incluindo as nanopartículas, nanotubos de carbono (CNTs – *Carbon Nanotubes*) e óxido de grafeno. Particularmente, CNTs são dotados de propriedades superiores, tornando-os especificamente apropriados para o desenvolvimento e a aplicação em dispositivos, principalmente na área biotecnológica e de sensores. Diversas áreas se beneficiam com a utilização da nanotecnologia, por exemplo: alimentícia, médica, agronegócio, cosmética, etc. Uma importante possibilidade de utilizar estes nanomateriais é na manufatura de novos materiais inteligentes (*smart materials*) para aplicações biotecnológicas. Com o elevado potencial de utilização de nanomateriais em sistemas biológicos, torna-se muito interessante investigar como tais materiais interagem em nível molecular com modelos de membranas celulares, plataformas com células, ou com sistemas vivos, visando à sua utilização em Nanomedicina.

Superfícies e interfaces de filmes finos e ultrafinos são fundamentais para o entendimento de suas propriedades diferenciadas. Estruturalmente, os filmes finos possuem espessura muito menor comparativamente às suas dimensões laterais. Entre as inúmeras técnicas conhecidas e desenvolvidas para fabricar filmes finos, nesta tese foram utilizadas as técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) para fabricar filmes ultrafinos de fosfolipídios com a presença de nanopartículas e CNTs, que posteriormente foram caracterizadas por Espectroscopia por Geração de Soma de Frequências (SFG). A espectroscopia SFG é intrinsecamente sensível a interfaces. Além da informação espectral, que normalmente está relacionada com a estrutura da superfície, a técnica permite obter informações sobre a orientação de moléculas na interface.

Nesta tese investigamos o estudo da interação entre nanopartículas ou nanotubos de carbono com diferentes modelos de membranas celulares. Análises

realizadas a partir de monocamadas de Langmuir e espectroscopia SFG foram fundamentais para interpretar e entender as possíveis interações envolvendo os modelos de membranas celulares. Esta tese ainda apresenta os resultados provenientes de um estágio realizado por um ano na *Rutgers – The State University of New Jersey*, Estados Unidos. Nesse estágio foi possível desenvolver em colaboração *scaffolds* (plataformas) contendo nanofibras poliméricas e óxido de grafeno (GO – *Graphene Oxide*) com células-tronco neurais de rato. O objetivo desse sistema mimetizado é entender o comportamento das células-tronco neurais de rato sobre óxido de grafeno e as nanofibras poliméricas.

2 TÓPICOS DE INTERESSE

2.1 Nanopartículas

A atual definição para nanomateriais, proposta pela Comissão Europeia, engloba a normalização e padronização do termo e visa, alertar para os riscos potenciais para a saúde, a segurança e os ambientes relacionados, desta forma¹:

“Nanomaterial refere-se a um material natural, incidental ou fabricado, que contém nanopartículas num estado agregado, ou na forma de um agregado, e em cuja distribuição em número-tamanho, 50 % ou mais das partículas possuem uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm”.

Ao possuir a mesma composição dos materiais em *bulk* e apresentar dimensões (extremamente) reduzidas, esses nanomateriais apresentam como diferencial a razão superfície/volume com elevadas ordens de grandeza, portanto, há uma amplificação ou alteração dos efeitos que acontecem na superfície, comparados às estruturas em maior escala. Desta forma, possuem importantes características como condutividade, reatividade e sensibilidade óptica, particularmente em dimensão nanométrica^{2,3}.

A estrutura (tamanho, formato e uniformidade) das nanopartículas pode influenciar suas propriedades físicas e químicas. Os principais sistemas inorgânicos nanoestruturados são compostos por nanopartículas metálicas e de óxidos⁴. Com a elevada quantidade de nanopartículas que vêm sendo sintetizadas e descartadas no meio ambiente, torna-se de grande interesse investigarmos como esses nanomateriais interagem com modelos de membranas, visando a possíveis estudos sobre nanotoxicidade.

Com a conjugação a moléculas biológicas, por exemplo, proteínas e DNA, os nanomateriais, particularmente, as nanopartículas, são destacadas na medicina, em uma recente e promissora área da saúde, denominada nanomedicina. As nanopartículas de ouro (AuNPs) e de óxido de ferro superparamagnéticas (Fe₃O₄), em particular, possuem ótima estabilidade, facilidade de síntese e funcionalização química, conseqüentemente, muito estudadas e utilizadas em nanomedicina. Vale a

pena destacar que as AuNps e óxido de ferro (Fe_3O_4) magnetizadas estão entre as mais promissoras no diagnóstico/tratamento do câncer. A utilização de AuNPs foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*)⁵ para aplicações terapêuticas. A utilização destas nanopartículas está ocorrendo para fins diagnósticos, na detecção de imagens de tumores por tomografia^{6,7}.

AuNPs possuem excepcionais propriedades ópticas. Quando são submetidas a luz, há a possibilidade do acoplamento de forma ressonante com os elétrons livres do metal, e seus elétrons condutores produzem coletivamente uma oscilação, ou “plasma de superfície”, e estão em função da dimensão/forma da nanopartícula, da constante dielétrica do meio, e da distância entre as nanopartículas^{8,9}. Além da utilização destas nanopartículas para o diagnóstico e terapia do câncer, AuNps, quando conjugadas com DNA, são usadas em dispositivos como marcadores ativos na detecção de mutações e polimorfismos, caracterizando avançados diagnósticos moleculares para diversas patologias com carga genética¹⁰.

Na área oncológica, os nanobioconjugados possuem muitas aplicações em processos e sistemas biotecnológicos para a otimização em busca de novos biomarcadores, diagnóstico molecular e aperfeiçoar a disponibilidade de medicamentos¹¹. A investigação dos mecanismos da interação de nanopartículas com biomoléculas se tornou fundamental para o desenvolvimento de novos nanobiocompostos que possam ser aplicados em várias patologias, por exemplo: câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares, hipertensão arterial, entre outras^{10,12-14}. Estas doenças atingem elevada parcela da população mundial e brasileira, consequentemente, havendo elevado desperdício financeiro no setor da saúde pública. Com a utilização dos nanomateriais na medicina, é possível desenvolver sua base preventiva, resultando em uma maior expectativa de vida, evitando elevados gastos financeiros no sistema de saúde¹⁵.

2.2 Nanotubos de carbono

Em 1991, Iijima *et al.* descobriram e estudaram os CNTs¹⁶, que desde então têm sido muito investigado de forma interdisciplinar, nas áreas de Física, Química e Engenharia de Materiais. Esse grande interesse se deve às suas interessantes e importantes propriedades estruturais, mecânicas e elétricas, como elevada estabilidade química e térmica, uma alta elasticidade e condutividade^{16,17}. Em sua composição, estão presentes apenas átomos de carbonos, com uma estrutura cilíndrica cujas extremidades são completadas com formatos esféricos ou não. Seus arranjos podem ser comparados a uma folha de grafite que é enrolada em forma de tubo¹⁸, tornando a razão entre seu comprimento e seu diâmetro próxima à de uma estrutura unidimensional. As suas estruturas mais importantes e conhecidas são os nanotubos de carbono de parede simples (*single-walled carbon nanotube* – SWCNTs) e os nanotubos de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes* – MWCNTs). Os SWCNTs possuem a estrutura de um cilindro simples, enquanto os MWCNTs são composto de diversos SWCNTs concêntricos. O comprimento e o diâmetro das estruturas dos MWCNTs são muito diferentes em relação aos de SWCNTs, o que resulta em diferenças em suas propriedades¹⁸. As propriedades dos nanotubos ocorrem em função de como a “folha de grafite é enrolada”, diâmetro, comprimento do tubo e de sua morfologia nanoestruturada¹⁹.

A estrutura dos SWCNTs é representada em termos da quiralidade do tubo e definida por um vetor quiral, $\vec{C}_h$, pela relação¹⁸⁻²⁰.

$$\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$$

n e m são representados por números inteiros; $\vec{a}_1$ e $\vec{a}_2$ são os vetores de células unitárias de uma matriz bidimensional formado pela folha de grafite, em que a direção do eixo do nanotubo é perpendicular a esse vetor quiral. Nanotubos são definidos pelo par (n,m) relacionado ao vetor quiral. Com os valores deste par, é possível ter três tipos de estruturas de CNTs: *armchair*, *zig-zag* e *quiral* – essas estruturas estão representadas na tabela 1.

Tabela 1 – Três diferentes tipos de estruturas de CNTs obtidas pelo par (n,m)

Estrutura	(n,m)	Ângulo quiral
<i>Armchair</i>	$n = m$	$\Theta = 0^\circ$
<i>Zig-zag</i>	$m = 0$	$\Theta = 30^\circ$
<i>Quiral</i>	$m \neq n$	$0^\circ \geq \Theta \geq 30^\circ$

As diferenças estruturais entre os nanotubos *armchair*, *zig-zag* e quiral estão ilustradas na figura 1.

Figura 1 – Estruturas dos nanotubos: (a) *armchair*, (b) *zig-zag*, (c) *quiral*.

O valor do par (n, m) estabelece a quiralidade do nanotubo, interferindo nas propriedades ópticas, mecânicas e eletrônicas. Dependendo da quiralidade do nanotubo, este nanomaterial pode ser semicondutor ou metálico¹⁷. Quando $|n - m| = 3q$, os nanotubos são metálicos; quando $|n - m| = 3q \pm 1$, são semicondutores, onde q é um número inteiro.

Os MWCNTs são descritos por diferentes modelos que estão de acordo com experimentos com imagens de microscopia eletrônica¹⁸. Podem apresentar formatos *coaxial cylindrically curved*, *coaxial polygonized* ou *scrolls graphene sheets*¹⁸, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 – Possíveis formatos dos nanotubos de carbono: (a) *coaxial cylindrically curved*, (b) *coaxial polygonized* ou (c) *scrolls graphene sheets*.

A utilização desses nanomateriais em produtos e dispositivos tecnológicos necessita de uma manipulação em nível molecular; desta forma, muitos grupos de pesquisa ainda estão investigando suas possíveis interações com outras moléculas. Uma eficiente metodologia para a manipulação dos nanotubos consiste na utilização em filmes ultrafinos. Jia e colaboradores demonstraram ser possível alinhar nanotubos de carbono do tipo *single-walled* em uma superfície utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett²¹, através de interações hidrofílicas e hidrofóbicas sobre um substrato sólido. Para ocorrer a formação de filmes Langmuir-Blodgett, é necessário que os nanotubos sejam funcionalizados quimicamente (em sua estrutura), o que foi obtido utilizando a octadecilamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$) após a sua purificação.

A modificação química e solubilização de CNTs representa uma nova área de pesquisa interdisciplinar (Engenharia de Materiais, Física e Química) envolvendo esses nanomateriais²², após as novas características obtidas da funcionalização. Há vários estudos na literatura envolvendo técnicas de funcionalização dos SWCNTs e MWCNTs²³⁻²⁵. Uma possível metodologia em funcionalizar CNTs consiste em ligações de ácidos carboxílicos via reações de amidação e esterificação do nanotubo, com possibilidade de fabricar nanocompósitos poliméricos, em investigações de interação molecular nanotubo-molécula e conjugação com espécies biológicas²².

O interesse em utilizar CNTs em sensores advém das altas reatividades e área efetiva que essas nanoestruturas possuem. CNTs têm sido utilizados em sensores químicos baseados nas mudanças de condutância elétrica obtida pela adsorção de espécies químicas, sensores de gás e biossensores. Neste caso, os nanotubos são funcionalizados com enzimas que atuam como transdutores e sensores eletroquímicos por meio de eletrodos modificados^{23,24}. Esses filmes têm sido aplicados em muitas áreas, principalmente em nanoeletrônica²⁶, *drug delivery*^{27,28} e sensores²⁹. Outras importantes vantagens são as seguintes:

- i) possibilidade de combinar materiais em nanoestruturas para unidades de sensores específicas;
- ii) controle preciso da arquitetura molecular, permitindo explorar o contato íntimo entre os componentes da unidade de sensor;
- iii) utiliza-se uma pequena quantidade de material para a produção dos filmes.

2.3 Óxido de grafeno

O grafeno foi descoberto em 2004³⁰; desde então, esse nanomaterial vem apresentando um grande impacto nas áreas de nanociência e nanotecnologia. O elevado interesse deste nanomaterial se deve às suas interessantes propriedades estruturais, elevada resistência mecânica³¹, flexibilidade, excelente condutividade elétrica (capacidade em transportar elétrons) e térmica³². Apresenta a espessura de um átomo em uma folha planar (figura 3), compreendendo ligações sp^2 em sua estrutura, com elevado grau de regularidade. Além disso, possui uma elevada área de superfície específica (aproximadamente 2630 m²/g por monocamada de grafeno)³³.

Figura 3 – Ilustração da estrutura de óxido de grafeno.

Estas propriedades físico-químicas sugerem que o grafeno possui um ótimo potencial para fornecer novas abordagens e aperfeiçoamentos na área de eletroquímica. Por exemplo, a elevada área superficial e a transferência de elétrons entre grafeno e uma espécie redox pode representar uma oportunidade para estratégias de sensoriamento baseado em transferência de elétrons diretos.

O óxido de grafeno (GO), em particular, consiste de uma camada simples de grafite, geralmente é produzido pelo tratamento químico da oxidação, com subsequente dispersão e esfoliação em água ou solventes orgânicos adequados³⁴. Em sua estrutura, há vários grupos funcionalizados com oxigênio. No entanto, a precisão da estrutura atômica do GO é ainda incerta e necessita ser elucidada. Esta incerteza é originada pela natureza e distribuição dos grupos funcionais contendo

oxigênio³⁵, ou seja, a composição não estequiométrica dos átomos, e a ausência de técnicas analíticas para caracterizar a estrutura do óxido de grafeno. Estruturalmente, o GO não apresenta uma composição homogênea e a estequiometria varia em função da síntese e reação química utilizada, porém a estequiometria ideal ainda não foi descoberta. Devido a esses fatores, o GO pode apresentar alguma perda em sua condutividade elétrica em relação ao grafeno³⁶, o que pode limitar sua aplicação direta em materiais e dispositivos que são ativos eletricamente. A presença desses grupos funcionais pode fornecer vantagens ao utilizar GO em inúmeras outras aplicações. Como o grupo funcional do oxigênio polar tende a estar fortemente hidrofílico, isso resulta em boa dispersão em muitos solventes, particularmente em água³⁷. O GO pode ser subsequentemente depositado em vários substratos para preparar filmes finos por diferentes métodos, incluindo *drop-casting*, *spraying* e *spin-coating*³⁸, podendo ser utilizado como um excelente eletrodo em materiais. Por apresentar apropriados parâmetros de oxidação ou redução e com desordenamento estrutural, o GO pode ser utilizado como um material isolante ou semicondutor, o que o torna atrativo para pesquisas em ciência básica, podendo consequentemente ser utilizado em várias aplicações tecnológicas³⁹.

Atualmente, o estudo com GO vem se tornando popular e extensivo, especialmente com aplicações em eletroquímica. Além disso, a utilização de GO também permite um controle sobre o microambiente local. Isso ocorre na maioria dos casos em que o GO é depositado em superfícies extremamente bem definidas a partir da solução.

2.4 Células-tronco

Células-tronco ou células-mãe são as células responsáveis por se dividir dando origem a duas células semelhantes às progenitoras que apresentam o potencial para se tornar algum tipo de célula no corpo. Uma das principais características das células-tronco é a habilidade de se autorrenovarem ou multiplicarem enquanto está mantido o potencial de desenvolvimento em outros tipos de células. Células-tronco podem tornar-se células do sangue, coração, pele, músculo, cérebro, neurônios, etc.

Essas células são de diferentes origens, mas todos os tipos de células-tronco apresentam a mesma capacidade de se desenvolverem em múltiplos tipos de células.

O tecido nervoso encontra-se por todo o organismo, com uma conectividade, formando o sistema nervoso. Este sistema é dividido em sistema nervoso central (SNC), com a presença do encéfalo, constituintes neurais do sistema fotorreceptor, medula espinhal, e sistema nervoso periférico (SNP), constituído pelos nervos e por pequenos agregados das células nervosas, denominados gânglios nervosos. Os nervos são constituídos por prolongamentos dos neurônios situados no SNC ou nos gânglios nervosos. Os dois componentes principais presentes no tecido nervoso são neurônios – normalmente estas células apresentam um perfil prolongado – e várias células da glia ou neuroglia, com a principal finalidade de sustentar os neurônios. De forma geral, na glia incluem-se vários tipos celulares presentes no sistema nervoso central ao redor dos neurônios. Oligodendrócitos e astrócitos são os principais componentes das células glia. Oligodendrócitos produzem bainhas de mielina, cuja finalidade refere-se ao isolamento elétrico para os neurônios do sistema nervoso central, enquanto os astrócitos são células com formato semelhante a uma estrela com múltiplos processos irradiando do corpo celular, apresentam feixes de filamentos intermediários constituídos pela proteína fibrilar ácida da glia, reforçando a estrutura celular. Além da função de sustentação, os astrócitos participam do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular dos neurônios⁴⁰. A figura 4 ilustra a representação da composição de células-tronco neurais.

Figura 4 – Representação da composição das células-tronco neurais em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

2.5 Óptica não-linear e a geração de soma de frequências

A espectroscopia vibracional por Geração de Soma de Frequências (SFG) é uma técnica específica que investiga o espectro vibracional de moléculas em interfaces, não destrutível, com possibilidade de monitorar a adsorção molecular *in situ* e em tempo real⁴¹. SFG ocorre quando dois feixes de laser, um fixado na frequência no visível ω_{Vis} e outro sintonizado na frequência no infravermelho ω_{IR} , se sobrepõem no espaço e no tempo em uma interface. Este processo consiste na soma de duas frequências, isto é, $\omega_{SF} = \omega_{Vis} + \omega_{IR}$. A intensidade da luz é ressonantemente aumentada quando a frequência do feixe de infravermelho é sintonizada e coincide com o modo vibracional de moléculas na interface. A detecção da soma de frequências (SF) está em função da frequência no infravermelho, em que o espectro vibracional é obtido.

Muitos fenômenos da óptica não-linear estudam fenômenos que não são reversíveis, ocorrendo como uma consequência da modificação das propriedades ópticas de um material com a presença da luz de alta intensidade para produzir tais modificações das propriedades ópticas de um material. Após a demonstração do primeiro laser desenvolvido por Maiman em 1960, o início do campo da óptica não linear está muitas vezes relacionado com a descoberta da geração do segundo harmônico por Franken *et al*⁴². O fenômeno da óptica não linear ocorre quando a resposta de um material depende de uma maneira não linear da amplitude do campo óptico. Por exemplo, a geração do segundo harmônico ocorre como um resultado parcial da resposta atômica que depende quadraticamente da amplitude do campo óptico aplicado. Consequentemente, a intensidade da luz gerada na frequência do segundo harmônico tende a aumentar com o quadrado da intensidade da luz laser aplicada⁴¹.

A relação entre a matéria e a radiação ocorre de tal forma que uma altera as características da outra. Um exemplo são as ondas eletromagnéticas (OE) que atuam em átomos e moléculas, permitindo a orientação do seu momento de dipolo elétrico, ou até mesmo criando uma polarização momentânea. De uma forma simplificada, a presença da matéria altera a configuração das linhas de força do campo elétrico (e/ou magnético) e as suas configurações espaciais, ocasionando, por exemplo, a mudança

da velocidade de propagação das ondas OE (índice de refração) ou a absorção destas.

2.5.1 Efeitos da óptica não linear e a geração de soma de frequências

O campo elétrico $\mathbf{E}$ de uma onda de luz propaga e exerce uma força nos elétrons de valência das moléculas que estão incluídas neste meio. Em um ambiente isotrópico em que a intensidade de luz é de baixa intensidade e não coerente, esta força é pequena; desta forma, o momento de dipolo elétrico μ é representado por:

$$\mu = \mu_0 + \alpha E \quad (1)$$

Onde μ_0 é o dipolo estático (permanente) do material e α é a polarizabilidade dos elétrons na molécula. Em uma fase condensada, a soma do dipolo elétrico molecular permite um aumento no momento de dipolo elétrico por unidade de volume, resultando na polarização $\mathbf{P}$ do *bulk*. Poucos materiais apresentam uma polarização estática. Desta forma, considerando apenas a polarização induzida pela oscilação de um campo elétrico, temos:

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 \chi^{(1)} \mathbf{E} \quad (2)$$

$\chi^{(1)}$ é a média macroscópica de α , e é conhecida como susceptibilidade de primeira ordem (ou linear). ϵ_0 é a permissividade no vácuo e contribui para a polarização $\mathbf{P}$ no sistema internacional de unidades. O dipolo induzido oscila na mesma frequência em que o campo elétrico é direcionado, emitindo luz na frequência do campo incidente. Este campo elétrico produz propriedades ópticas lineares, por exemplo, reflexão e refração.

Como o campo elétrico está ampliado a um valor insignificante, a não linearidade aumenta e deve estar incluída na descrição do dipolo induzido pela incorporação dos seguintes termos adicionais:

$$\mu = \mu_0 + \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots \quad (3)$$

β e γ são as hiperpolarizabilidades de primeira e segunda ordem, respectivamente. Para o *bulk* do material (novamente assumindo a polarização igual a zero), a polarização torna-se:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 (\chi^{(1)} \mathbf{E} + \chi^{(2)} \mathbf{E}^2 + \chi^{(3)} \mathbf{E}^3 + \dots) = \mathbf{P}^{(1)} + \mathbf{P}^{(2)} + \mathbf{P}^{(3)} + \dots \quad (4)$$

$\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$ são as susceptibilidades de segunda e terceira ordem, respectivamente, na qual são consideravelmente menores que $\chi^{(1)}$. Efeitos não lineares somente tornam-se significativos quando o campo eletromagnético aplicado é comparável com o campo realizado pelos elétrons em uma molécula. Magnitudes deste campo estão apenas presentes com lasers pulsados ($\sim 10^8$ V/m).

De acordo com a teoria proposta, a aproximação do dipolo elétrico é utilizada para descrever a interação da luz com a matéria. Dentro dessa aproximação, os efeitos dos campos magnéticos na óptica e dos multipolos (por exemplo, quadropolos) serão desprezados. Além disso, assume-se que o dipolo induzido no interior de uma molécula é único devido ao campo macroscópico aplicado e contribuições do campo dipolar ao redor dos dipolos induzidos podem ser ignoradas. A correção para este efeito do campo local foi inicialmente descrita por Lorentz⁴³, enquanto a aplicação para SFG foi apresentada por Boyd⁴⁴, consequentemente discutida detalhadamente por Casson⁴⁵ e Braun *et al*⁴⁶. O efeito de campo local deve estar estritamente incluído por rigorosas polarizabilidades não lineares induzidas. Entretanto, esses efeitos são normalmente omitidos na maioria de estudos teóricos sobre SFG⁴⁷, e são ignorados neste estudo em favor de uma sucinta explicação acessível de origens do sinal SFG.

Em 1961, Franken e colaboradores⁴⁸ obtiveram com sucesso o experimento da óptica não-linear quando observaram a geração de segundo harmônico (SHG) do cristal de quartzo irradiado por um laser de rubi. A frequência depende de um campo eletromagnético incidente, portanto, a origem de SHG pode ser demonstrada por:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_1 \cos \omega t \quad (5)$$

ω é a frequência da luz incidente. Então, a polarização induzida da Eq. 4 torna-se:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 (\chi^{(1)}(\mathbf{E}_1 \cos \omega t) + \chi^{(2)}(E_1 \cos \omega t)^2 + \chi^{(3)}(\mathbf{E}_1 \cos \omega t)^3 + \dots) \quad (6)$$

A Eq. 6 pode ser reescrita como:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \left(\chi^{(1)}(\mathbf{E}_1 \cos \omega t) + \frac{\chi^{(2)}}{2} E_1^2 (1 + \cos 2\omega t) + \frac{\chi^{(3)}}{4} E_1^3 (3 \cos \omega t + \cos 3\omega t) + \dots \right) \quad (7)$$

Essa equação mostra que a polarização é induzida, por isso, o feixe de luz emitido contém termos que oscilam duas vezes (geração de segundo harmônico), três vezes (geração de terceiro harmônico), podendo oscilar mais vezes a frequência do campo $\mathbf{E}$ incidente.

A origem da teoria de SFG pode ser demonstrada através de um argumento análogo, em que a superfície do campo $\mathbf{E}$ está expressa como a soma de dois campos incidentes de diferentes oscilações, isto é, originados de dois feixes de laser de frequências ω_1 e ω_2 .

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_1 \cos \omega_1 t + \mathbf{E}_2 \cos \omega_2 t \quad (8)$$

Considerando somente o termo de polarização de segunda ordem (ou quadrático), $\mathbf{P}^{(2)}$, e substituindo-o pela combinação do campo $\mathbf{E}$, temos:

$$\begin{aligned} \mathbf{P}^{(2)} &= \varepsilon_0 \chi^{(2)} (\mathbf{E}_1 \cos \omega_1 t + \mathbf{E}_2 \cos \omega_2 t)^2 \\ &\quad \begin{array}{l} \swarrow \quad \searrow \\ \mathbf{E}_1^2 + \mathbf{E}_2^2 \quad \quad \quad \frac{1}{2} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \cos(\omega_1 + \omega_2) t \\ \swarrow \quad \searrow \\ \mathbf{E}_1^2 \cos 2\omega_1 t + \mathbf{E}_2^2 \cos 2\omega_2 t \quad \quad \quad \frac{1}{2} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \cos(\omega_1 - \omega_2) t \end{array} \end{aligned} \quad (9)$$

Os dois campos incidentes resultam em uma dependência sem frequência, há SHG para ambas as frequências, geração de diferença de frequências (DFG), em que a luz é emitida em uma diferença de frequências incidentes $\omega_1 - \omega_2$, e SFG, em que a luz é emitida em uma soma de frequências emitidas $\omega_1 + \omega_2$ (conforme representado em azul na equação 9). A equação 9 é uma abordagem simples do eletromagnetismo, mas suficiente para demonstrar as origens de SFG; uma complexa abordagem é

obtida através de rigorosos cálculos da mecânica quântica, conforme apresentado por Shen⁵¹ ou Boyd⁴⁴.

Se a convenção não explícita inclui o tempo de dependência do campo, a descrição mais simples da componente de SFG da polarização não linear de segunda ordem é:

$$\mathbf{P}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 \quad (10)$$

Onde $\chi^{(2)}$ (susceptibilidade não linear de segunda ordem) é um tensor de terceira ordem, descrevendo a relação entre os dois campos elétricos dos vetores $\mathbf{E}_1$ e $\mathbf{E}_2$ e o vetor resultante $\mathbf{P}^{(2)}$.

2.5.2 Interação do laser com a superfície

SFG é desenvolvido no contexto de investigar moléculas presentes na interface plana entre dois *bulks*. Um sistema de coordenadas no qual segue a convenção da mão direita (rotação da mão direita, em que o plano x, y produz translação na direção positiva do eixo z) é adotado e ilustrado na figura 6. Devem ser verificados o sistema de eixos e as geometrias dos feixes utilizadas na literatura⁴⁹, sempre precisando de uma atenção em relatar equações para as direções de um campo específico e sistemas de eixos em que foram derivados.

Ao descrever uma onda eletromagnética incidindo em uma superfície plana, é possível relacionar o campo $\mathbf{E}$ em componentes de polarizações paralelas (p) e perpendiculares (s) com o plano de incidência (figura 5).

Figura 5 – Incidência e reflexão dos feixes visível e infravermelho, reflexão do feixe SFG no plano de propagação x,z .

Normalmente, as equações eletromagnéticas consideram as polarizações s e p separadamente, pois apresentam diferentes comportamentos na interface.

Figura 6 – Diferentes polarizações nos campos elétricos: (a) Polarização s , apresenta uma componente perpendicular com o plano de incidência; (b) Polarização p , apresenta duas componentes paralelas com o plano de incidência.

A figura 6 (a) ilustra o sistema de eixos e a geometria de feixes sobre o plano de incidência; o campo elétrico E produzido pela luz na superfície pela polarização s pode ser descrito por uma superfície ligada no campo elétrico ao longo do eixo y . A figura 6 (b) ilustra o campo estabelecido pela luz de polarização p incidente que pode ser resolvido até a superfície do campo elétrico nos eixos x, z .

A base da superfície (plano x, y) e a componente z da luz incidente são representadas pelas seguintes equações:

$$\mathbf{E}_x^I = E_x^I \cdot \hat{\mathbf{x}} \quad (11)$$

$$\mathbf{E}_y^I = E_y^I \cdot \hat{\mathbf{y}} \quad (12)$$

$$\mathbf{E}_z^I = E_z^I \cdot \hat{\mathbf{z}} \quad (13)$$

E_i^I é a magnitude da componente ao longo do eixo i ($i = x, y$ ou z) e $\mathbf{I}$ é o vetor unitário ao longo do eixo. A magnitude relativa das componentes resolvidas pode ser calculada trigonometricamente:

$$E_x^I = \pm E_p^I \cos \theta_I \quad (14)$$

$$E_y^I = E_s^I \quad (15)$$

$$E_z^I = E_p^I \sin \theta_I \quad (16)$$

Figura 7 – Luz com polarizações s e p na interface.

O sinal positivo da equação 14 é empregado se o feixe incidente está propagado na direção positiva de x , enquanto o sinal negativo é empregado se o feixe incidente está propagado na direção negativa de x .

A extensão em que um feixe é refletido ou transmitido em uma interface pode ser determinada utilizando-se a equação e o coeficiente de Fresnel⁵⁰. Em um material dielétrico, a equação de Fresnel envolve o ângulo de incidência e transmissão de um feixe relativo com a superfície normal (θ_1 e θ_2 , respectivamente) e o índice de refração dos dois meios (n_1 e n_T , respectivamente), conforme verificado na figura 7.

Figura 8 – Feixe de luz incidido, transmitido e refletido: (a) Luz com polarização s; (b) Luz com polarização p.

O coeficiente da amplitude de Fresnel pela reflexão e transmissão nas polarizações s e p é representado por:

$$r_s \equiv \left(\frac{E_s^R}{E_s^I} \right) = \frac{n_I \cos \theta_I - n_T \cos \theta_T}{n_I \cos \theta_I + n_T \cos \theta_T} \quad (17)$$

$$r_p \equiv \left(\frac{E_p^R}{E_p^I} \right) = \frac{n_T \cos \theta_I - n_I \cos \theta_T}{n_I \cos \theta_I + n_T \cos \theta_T} \quad (18)$$

$$t_s \equiv \left(\frac{E_s^T}{E_s^I} \right) = \frac{2n_I \cos \theta_I}{n_I \cos \theta_I + n_T \cos \theta_T} \quad (19)$$

$$t_p \equiv \left(\frac{E_p^T}{E_p^I} \right) = \frac{2n_I \cos \theta_I}{n_I \cos \theta_I + n_T \cos \theta_T} \quad (20)$$

O campo elétrico total na interface é a soma dos campos incidentes e dos feixes refletidos. Portanto, as componentes das magnitudes dos campos elétricos na interface são representadas por:

$$E_x = E_x^I + E_x^R = E_x^I + r_p E_x^I = \mp (E_p^I \cos \theta_I - r_p E_p^I \cos \theta_I) = \mp E_p^I \cos \theta_I (1 - r_p) \quad (21)$$

$$E_y = E_y^I + E_y^R = E_y^I + r_s E_y^I = E_s^I (1 + r_s) \quad (22)$$

$$E_z = E_z^I + E_z^R = E_z^I + r_p E_z^I = E_p^I \sin \theta_I = E_p^I \sin \theta_I (1 + r_p) \quad (23)$$

A direção do feixe utilizado na figura 8 corresponde ao feixe do IR no experimento utilizado na figura 6 envolvendo os experimentos de SFG, resultando em uma direção no campo em que é negativo para E_x^I e positivo para E_x^R , consequentemente, torna a equação 21 negativa. No entanto, se um feixe propaga na direção oposta, como o feixe visível da figura 6, E_x^I é positivo e E_x^R é negativo, desta forma torna a equação 21 positiva.

2.5.3 Equação de soma de frequências

A espectroscopia por Soma de Frequências é geralmente utilizada para investigar ressonâncias vibracionais de moléculas em interfaces, e consequentemente um dos feixes incidentes é selecionado em uma frequência no infravermelho. No entanto, a detecção em uma luz de baixa intensidade é mais fácil na região do visível de um espectro eletromagnético; portanto, este segundo feixe incidente é fixado em uma frequência no visível. Da equação 9, segue-se que a frequência do sinal SFG emitido é simplesmente a soma das frequências sintonizada no infravermelho com a frequência fixa do feixe no visível.

$$\omega_{SFG} = \omega_{IR} + \omega_{Vis} \quad (24)$$

A equação 10 pode ser reescrita como:

$$\mathbf{P}_{SF}^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}_{Vis} \mathbf{E}_{IR} \quad (25)$$

Para alcançar a geração de SFG, é fundamental a sobreposição no tempo e no espaço dos feixes do infravermelho e visível na superfície. Um sinal SFG coerente é subsequentemente gerado em um ângulo com a superfície normal de θ_{SFG} , em que

pode ser calculado utilizando a conservação de momento dos três feixes paralelos com a interface, cuja denominação é a condição de casamento de fases, representada por:

$$n_{SFG}\omega_{SFG}\text{sen}\theta_{SFG} = n_{Vis}\omega_{Vis}\text{sen}\theta_{Vis} \pm n_{IR}\omega_{IR}\text{sen}\theta_{IR} \quad (26)$$

Ou:

$$n_{SFG}k_{SFG}\text{sen}\theta_{SFG} = n_{Vis}k_{Vis}\text{sen}\theta_{Vis} \pm n_{IR}k_{IR}\text{sen}\theta_{IR} \quad (27)$$

Em que n é o índice de refração do meio em que o feixe relevante se propaga, ω é a frequência, θ é o ângulo com a superfície normal de cada feixe e $k = \omega/c$ (c é a velocidade da luz). A equação 27 é mais utilizada que a equação 26. O sinal positivo refere-se à copropagação do feixe (visível e infravermelho originado da mesma direção x); e o sinal negativo em direção oposta, a propagação dos feixes (visível e infravermelho chegam de direções opostas de x , conforme apresentado na figura 9). A intensidade de SFG é refletida e transmitida até uma superfície, normalmente ocorre a detecção desses dois feixes.

Figura 9 – Geometria dos feixes visível, infravermelho e SFG na interface n_1 e n_2 .

2.6 Filmes de Langmuir

Em 1770, Benjamin Franklin depositou óleo sobre a superfície da água e presenciou a formação de um filme fino, cuja espessura apresentava aproximadamente 100 moléculas. Após um século, Agnes Pockels realizou o primeiro trabalho envolvendo filmes finos sobre a água utilizando barreiras móveis; Lord Rayleigh e seus colaboradores finalizaram esse trabalho e publicaram na revista *Nature*. Em 1910, ocorreu a comprovação científica da monocamada por Irving Langmuir (1881-1957). Nesse mesmo ano foi possível demonstrar os conceitos teóricos e os fenômenos de formação de filmes finos sobre a superfície da água. Em 1932, Langmuir recebeu o Prêmio Nobel de Química pelos interessantes avanços nessa pesquisa. Atualmente os filmes de Langmuir são muito investigados em nanociência.

De uma forma geral, o filme de Langmuir é constituído de uma monocamada de material anfifílico ou anfipática (molécula com uma cabeça polar, hidrofílico e a cauda apolar, hidrofóbica). As moléculas encontram-se na interface entre o ar e a subfase; normalmente a subfase é composta por água, mas pode ser também de hidrocarbonetos ou mercúrio⁵¹. Os exemplos mais conhecidos de moléculas anfifílicas são os sabões (composição de sais de ácidos graxos) e os fosfolipídios. Esses compostos são denominados de surfactantes.

Em situações em que a cauda hidrofóbica é muito pequena em relação à cabeça polar, ou quando o grupo polar é muito forte, o material depositado sobre a superfície pode se dissolver na subfase de tal forma que ocorra um comprometimento da estabilidade do filme. Portanto, para ocorrer o filme de Langmuir, é fundamental existir o equilíbrio entre a parte polar e apolar das moléculas que formarão a monocamada.

Outro importante parâmetro para a formação do filme de Langmuir é a presença de um pequeno volume contendo a solução do composto em um solvente volátil e imiscível espalhado sobre a subfase em um material inerte, normalmente de Teflon[®], denominado de Cuba de Langmuir. Por exemplo, em subfase contendo água, pode-se utilizar clorofórmio como solvente. A figura 10 ilustra um esquema do aparato experimental geral de uma Cuba de Langmuir.

Figura 10 – Esquema geral da Cuba de Langmuir⁵².

As Cubas de Langmuir possuem barreiras móveis (Teflon[®]), com um controle eletrônico preciso da posição e velocidade de compressão, além de medidores de pressão e potencial de superfície. A pressão de superfície (π) é definida como a diferença da tensão superficial entre uma subfase com água pura (γ_0) e uma subfase com o filme (γ), ou seja: $\pi = \gamma_0 - \gamma$. Essa pressão pode ser obtida através da força por unidade de comprimento sobre uma barreira fixa, através de uma eletrobalança, ou medindo-se as tensões superficiais pelo método de Wilhelmy, mais comum nas cubas comerciais. A pressão mínima de superfície medida é 0, e a máxima pode se aproximar da tensão superficial em água pura (25°C), com valor aproximado de 73 mN/m⁵¹.

A compressão do filme, através de barreiras móveis, induz a orientação das moléculas de modo que seus eixos tendem a estar perpendiculares à superfície da água.

Um filme sem compressão apresenta um comportamento semelhante ao de um gás bidimensional, pois as moléculas estão dispersas sobre a superfície e não há uma interação entre elas. Esse estágio inicial é denominado de fase gasosa, e com uma posterior compressão (diminuição da área ocupada pela monocamada) atinge-se a fase líquido-expandida, na qual as moléculas estão mais próximas e iniciam uma interação. Com as compressões das barreiras, as moléculas iniciam um arranjo regular em um filme condensado (fase líquido-condensada), e posteriormente, se o filme é comprimido, atinge-se a desestruturação da monocamada, denominada por colapso. Um exemplo típico é a molécula de ácido esteárico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$), pois as fases do filme podem ser relacionadas a regiões da isoterma de pressão de

superfície, ou seja, a pressão (π) *versus* a área por molécula do filme ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$). A relação entre isoterma de pressão e as fases do filme para o ácido esteárico⁵³ também está ilustrada na figura 11.

Figura 11 – Modelo de isoterma ideal.

As isotermas podem ser alteradas com a modificação dos constituintes da subfase, como diferentes pHs ou força iônica, consequentemente alterando o empacotamento das moléculas na superfície.

Vale a pena ressaltar a importância da velocidade com que as moléculas são comprimidas (compressão das barreiras da Cuba de Langmuir); o tempo de compressão é fundamental para a reorganização das moléculas que se encontram na superfície, para que formem um empacotamento próximo ao da situação de equilíbrio termodinâmico. As curvas de histerese são o processo repetitivo dos ciclos de compressão e descompressão das moléculas (as barreiras da Cuba de Langmuir são “fechadas e abertas” repetitivamente) na superfície da água. O estudo da estabilidade dos filmes é realizado pela observação da área por molécula de um filme comprimido a uma determinada pressão de superfície, normalmente na fase líquido-expandida em função do tempo. Em filmes estáveis, as variações nas áreas são mínimas em função do tempo⁵¹.

Os filmes ultrafinos apresentam elevada organização molecular e estabilidade (por exemplo, filmes de LB) e podem ter diversas aplicações, como a fabricação de dispositivos ópticos⁵³⁻⁵⁵ ou dispositivos foto/eletroluminescentes e sensores⁵⁶. A adsorção de proteínas em filmes nano-organizados é útil porque a imobilização protéica ocorre sem que sua bioatividade seja afetada. Por isso, tais metodologias são ferramentas úteis para a fabricação de biossensores e para estudos básicos sobre as interações proteína-matriz⁵⁷⁻⁶⁶. De fato, tais filmes são utilizados na detecção de pesticidas⁶⁷, na fabricação de superfícies de eletrodos com enzimas⁶⁸, em sensores aptos a identificar interações antígeno-anticorpo^{69,70} e também em estudos básicos de atividade catalítica de enzimas imobilizadas^{71,72}. Isso se torna útil tanto na investigação de sistemas biomiméticos⁷³ como no uso desses sistemas em biorreatores⁷⁴ e em biossensores^{75,76}.

2.7 Filmes de Langmuir-Blodgett

Em 1930, Katherine Blodgett (1898-1979) colaborou e desenvolveu os primeiros trabalhos de Irving Langmuir. Ambos publicaram os trabalhos envolvendo a transferência de filmes monomoleculares da superfície da água (filmes de Langmuir) sobre substratos sólidos. Quando o filme de Langmuir obtém uma compactação, este pode ser transferido para suportes sólidos através do processo de emersão e imersão vertical desses suportes na subfase aquosa contendo a monocamada⁷⁷. Em cada imersão ou emersão é transferida uma monocamada para o substrato, conforme ilustrado na figura 12, de tal maneira que é possível obter um filme com número de camadas e espessura desejados. A taxa de transferência dos filmes LB representa a razão da área superficial reduzida (área em que as barreiras da Cuba de Langmuir foram comprimidas) em relação à área emersa do substrato sólido com a monocamada. Desta forma, uma taxa de transferência unitária representa uma transferência perfeita de uma monocamada, de tal forma que o substrato fica completamente recoberto com um filme de mesma densidade superficial que o filme de Langmuir, enquanto uma taxa de transferência menor que valor unitário significa que o filme LB transferido tem menor densidade superficial que o filme de Langmuir

(normalmente é homogêneo, com diversas regiões vazias ao redor do filme transferido). Desta forma, os filmes LB apresentam elevada organização em nível molecular, e sua caracterização pode ser realizada através de diversas técnicas espectroscópicas e ópticas. Além disso, sua massa, normalmente da ordem de nanogramas, pode ser obtida por microgravimetria utilizando a microbalança de cristal de quartzo.

Figura 12 – Processo de formação do filme Langmuir-Blodgett.

3 OBJETIVOS

Esta tese de doutorado tem como principais objetivos: 1) investigar detalhadamente a interação entre nanopartículas (Fe_3O_4 -Dextran, Fe_3O_4 -PDAC, PDAC, Dextran) e nanotubos de carbono funcionalizados com ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), com modelos de membranas celulares, e 2) desenvolver nanofibras poliméricas contendo óxido de grafeno, pela técnica de *electrospinning*, para serem utilizadas como modelos mimetizados (*scaffolds*) para a diferenciação de células-tronco neurais de rato.

4 INTERAÇÕES ENTRE NANOMATERIAIS E MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES

Neste capítulo apresentaremos uma descrição da membrana celular, descrevendo sua estrutura, composição e modelos mimetizados que podem ser representados de uma forma simplificada (filmes de Langmuir). Posteriormente, há uma descrição detalhada sobre os materiais e a metodologia utilizada para o desenvolvimento dos modelos biológicos mimetizados, em conjunto com as nanopartículas e nanotubos de carbono. A metodologia envolvendo a utilização da espectroscopia SFG para caracterizar o biosistema também está presente neste capítulo. A última abordagem neste capítulo descreve os resultados/conclusões sobre as interações entre os modelos de membranas celulares com nanopartículas ou nanotubos de carbono.

4.1 Aspectos gerais da membrana celular

Em 1972, Singer e Nicholson estudaram a estrutura e a composição de membranas biológicas utilizando a microscopia eletrônica. Com essa investigação, foi possível desenvolver o Modelo do Mosaico Fluido (figura 13). Este modelo é utilizado atualmente para representar a estrutura e a composição da membrana celular⁷⁸.

As membranas biológicas são caracterizadas pela presença de uma bicamada lipídica, que atua como uma barreira para o transporte de determinadas moléculas. As moléculas que constituem a bicamada não estão ligadas covalentemente entre si, portanto, existe uma flexibilidade em toda a sua estrutura, podendo ocorrer movimentos e, conseqüentemente, alterações no seu formato⁷⁹. Lipídios (fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol), proteínas especializadas, carboidratos como parte de glicoproteínas e glicolipídios são os constituintes da membrana celular. As proporções relativas de proteínas e lipídios estão em função do modelo de membrana e de sua respectiva função.

Figura 13 – Modelo de Mosaico Fluido da membrana celular⁸⁰.

Muitas funções biológicas são determinadas pelos parâmetros fundamentais da composição e propriedades físicas da matriz dos fosfolípidos das membranas biológicas. Com a complexidade da membrana celular, as investigações consistem em modelos de membranas simplificadas, (sistemas biomiméticos) que incluem bicamadas de fosfolípido (vesículas de lipídio unilamelar⁸¹ e multilamelar⁸²), micelas constituídas de detergentes⁸³, monocamadas de Langmuir de fosfolípidos⁸⁴ e outros sistemas com a presença de moléculas de interesses biológico, físico e químico. A monocamada lipídica representa um modelo eficiente, pois mimetiza aspectos de algumas funções da membrana nativa. As substâncias que são incorporadas no interior de uma monocamada podem resultar em modificações de suas características, por exemplo, densidade de empacotamento, organização de moléculas durante a formação do filme de Langmuir, as propriedades elétricas das monocamadas, entre outras⁸⁴. Uma importante abordagem que deve ser mencionada é a vesícula multilamelar (MLV), sistema biomimético constituído por bicamadas lipídicas formando uma “grande esfera”, com possibilidade de investigar a influência dessas bicamadas na organização estrutural de proteínas inseridas e/ou em contato. Com a vesícula, existe a possibilidade do estudo da suposta localização de compostos como drogas ou proteínas e peptídeos que interagem com estas bicamadas⁸².

4.2 Experimental

Para a síntese das nanopartículas foram utilizados os seguintes reagentes: sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Baker), cloreto de ferro (III) (FeCl_3 , VETEC), os estabilizantes Dextran (peso molecular: 40.000) e PDAC (Cloreto de Polidialidimetiamonium, peso molecular: 400.000-500.000) ambos obtidos da Sigma – Aldrich. Para a fabricação dos filmes de Langmuir foram utilizados os fosfolipídios: Dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG, pureza: > 99%) e Dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC, pureza: 99%) (obtidos da *Avanti Polar Lipids, Inc.*). Nanotubos de carbono de paredes simples funcionalizados com ácido carboxílico foram adquiridos da *CheapTubes* (pureza: > 90%). As estruturas moleculares dos estabilizantes e dos fosfolipídios estão ilustradas na figura 14. Na subfase aquosa foram utilizadas soluções contendo fosfato monobásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), ambos obtidos da Sigma – Aldrich, pureza: $\geq 99\%$).

Figura 14 – Estruturas químicas dos estabilizantes e fosfolipídios: (a) Dextran; (b) PDAC; (c) DPPG; (d) DPPC.

4.2.1 Preparação dos filmes de Langmuir de DPPG e DPPC

Iniciaram-se os estudos dos filmes de Langmuir na sala limpa para investigar o comportamento das monocamadas dos fosfolipídios. DPPG e DPPC foram diluídos em clorofórmio a uma concentração de 0,5 mg/mL, sendo que 15 μ L da solução foram espalhados por toda a superfície aquosa (área da superfície de 19 x 5 cm²) em pH neutro (pH ~ 6,7) utilizando uma minicuba de Langmuir modelo *KSV NIMA -Small*. Além disso, acrescentou-se uma solução de fosfato monobásico (Na₂HPO₄.H₂O) e uma solução de fosfato dibásico (NaH₂PO₄.H₂O) na subfase aquosa, ambas com concentração de 0,1 mol/L, cujo objetivo foi manter constante a força iônica (concentração de íons) da subfase. Esperou-se 10 minutos antes de iniciar o movimento de compressão das barreiras para que as moléculas se espalhassem por toda a área da superfície e houvesse evaporação completa do solvente. As barreiras da cuba se moveram com uma velocidade constante de 8 mm/min.

4.2.2 Preparação dos filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de DPPG e DPPC em subfase com diferentes nanomateriais

Após ter realizado os experimentos de DPPG e DPPC em subfase aquosa (pura), iniciou-se a fabricação dos filmes de Langmuir com esses fosfolipídios na presença de nanopartículas (NPs) e, posteriormente, realizou-se esse mesmo procedimento utilizando nanotubos de carbono na subfase aquosa – em todas as subfases foram acrescentadas uma solução fosfato monobásico (Na₂HPO₄.H₂O) e uma solução de fosfato dibásico (NaH₂PO₄.H₂O) na subfase aquosa, ambas com concentração de 0,1 mol/L (com o mesmo objetivo de manter constante a força iônica da subfase).

As nanopartículas superparamagnéticas de Fe₃O₄ foram sintetizadas e funcionalizadas com o polieletrólito poli dialildimetilcloreto de amônio (PDAC) e Dextran; todas as nanopartículas (Fe₃O₄-PDAC e Fe₃O₄-Dextran), PDAC e Dextran puros foram utilizadas com uma concentração de 10⁻⁵ mol/L. Desta forma, foram

utilizadas essas nanopartículas separadamente na subfase para investigar e entender possíveis interações com os fosfolipídios. Em seguida, foram espalhadas as soluções de DPPG ou DPPC com um volume de 15 μL (ambas com concentração de 0,5 mg/mL) sobre a superfície aquosa e esperou-se 10 minutos para que o solvente evaporasse por completo, e finalmente as barreiras da cuba moveram-se com uma velocidade constante de 8 mm/min.

A metodologia utilizando SWCNT-COOH na subfase foi um processo semelhante em relação às nanopartículas, mas com concentração adotada foi 40 $\mu\text{g/mL}$. Os volumes espalhados dos fosfolipídios, o tempo de espera para que o solvente fosse evaporado e a velocidade das barreiras foram os mesmos adotados em relação às nanopartículas, conforme mencionado no parágrafo anterior.

Os filmes Langmuir-Blodgett com DPPG e DPPC puros ou utilizando SWCNT-COOH na subfase foram preparados com os mesmos procedimentos dos filmes de Langmuir com SWCNT-COOH na subfase. Os substratos de vidros (10 x 20 mm, espessura ~ 1 mm) foram utilizados como plataformas para a transferência dos nanomateriais. A limpeza destes substratos consistiu na imersão em acetona (*Synth*, 99,5 %), sob uma temperatura ~ 50 °C por 30 minutos, posteriormente ocorreu enxague com etanol e finalmente, secagem em nitrogênio.

4.2.3 Espectrômetro SFG

Para a obtenção do espectro de SFG, foi utilizado um espectrômetro da EKSPLA, cujo arranjo experimental está ilustrado na figura 15. Nesse espectrômetro, um laser pulsado (duração do pulso ~ 30 ps, frequência de 20 Hz) de Nd^{+3} : YAG emite luz de comprimento de onda de $\lambda = 1064$ nm e excita uma Unidade Geradora de Harmônicos (HGU). Essa unidade produz feixes de 2° harmônicos a $\lambda = 532$ nm (visível) e de 3° harmônico a $\lambda = 355$ nm (UV), além de permitir um sinal de saída no fundamental (1064 nm). Este fundamental e o UV excitam um Oscilador/Amplificador Paramétrico Óptico (OPO/OPA), responsável pela geração do feixe infravermelho (IR) sintonizável que incidirá na amostra (λ_{IR}). O feixe no visível ($\lambda_{\text{vis}} = 532$ nm) será o outro feixe incidente na amostra.

Figura 15 – Esquema simplificado de um espectrômetro SFG típico.

O OPO/OPA pode então gerar luz IR em uma faixa de intervalo entre 2300~10000 nm através de um estágio Gerador de Diferença de Frequências (DFG). O IR gerado pode variar em um intervalo pré-estabelecido conforme a faixa de varredura que se deseja investigar. Portanto, o sinal de Soma de Frequências varia conforme a combinação dos feixes ω_{IR} do OPA e do feixe ω_{Vis} da HGU (intervalo de 440 ~ 510 nm). O sinal SFG é então detectado por um conjunto monocromador/fotomultiplicador e, através de um *software* em LABVIEW e sistema de aquisição de dados, esses são coletados em um computador. Todo o aparato (espectrômetro e Cuba de Langmuir) está montado em uma mesa óptica com sistema de isolamento pneumático de vibrações.

Os ângulos de incidência dos feixes de entrada em relação aos filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett foram $\phi_{Vis} = 61,4^\circ$ e $\phi_{IR} = 54,8^\circ$. Desta forma, pela relação de casamento de fase, temos $k_{SFG} = k_{Vis} + k_{IR}$, ou, $k_{SFG} \text{seno} \phi_{SFG} = k_{Vis} \text{seno} \phi_{Vis} + k_{IR} \text{seno} \phi_{IR}$, resultando em um sinal de soma de frequência com ângulo $\phi_{SOMA} \cong 60,5^\circ$. As energias dos feixes visível e IR, foram $\sim 650 \mu\text{J}$ e $\sim 140 \mu\text{J}$. O ponto da superposição destes feixes sobre as amostras apresenta uma área $\cong 1 \text{ mm}^2$, e a combinação de polarização utilizada em todas as medidas foi SSP, para os feixes SFG, visível e infravermelho, respectivamente.

4.2.4 Espectroscopia SFG de filmes de Langmuir de DPPG e DPPC com os nanomateriais

Utilizou-se a técnica de espectroscopia SFG para investigar os estiramentos CH da cadeia alquila dos fosfolipídios em função da presença das nanopartículas. Esses experimentos foram realizados em uma minicuba de Langmuir acoplada no espectrômetro (mesma cuba utilizada no subitem 4.2.1), com uma velocidade constante da compressão das barreiras de 8 mm/min. Os filmes foram preparados em subfase aquosa contendo as nanopartículas (Fe_3O_4 -PDAC, Fe_3O_4 -Dextran, PDAC e Dextran), e posteriormente em subfase contendo SWCNT-COOH. Em todos os eventos utilizou-se solução de fosfato monobásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e a solução de fosfato dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) na subfase aquosa, ambas com concentração de 0,1 mol/L (procedimento semelhante à fabricação dos filmes de Langmuir dos fosfolipídios com as nanopartículas e SWCNT-COOH).

Antes da pressão de superfície atingir o valor máximo ($\pi \sim 38$ mN/m, antes de alcançar o colapso da monocamada), foi interrompido o movimento de compressão das barreiras para iniciar a aquisição dos espectros SFG. A medida dos espectros de SFG ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, utilizou-se a subfase com as nanopartículas (Fe_3O_4 -PDAC, Fe_3O_4 -Dextran, PDAC e Dextran). Nesta etapa, a varredura selecionada foi de 2750 a 3050 cm^{-1} , com uma aquisição de 100 medições por ponto, e o intervalo entre dois pontos (*steps*) de 3 cm^{-1} – esse curto intervalo do número de onda entre dois pontos foi realizado para a melhor visualização dos estreitos picos CH da cadeia alquila. Na segunda etapa, utilizou-se subfases com SWCNT-COOH. Nesta etapa, a varredura ocorreu de 2700 a 3800 cm^{-1} , com uma aquisição de 100 medições por ponto, e o intervalo entre dois pontos (*steps*) foi de 10 cm^{-1} – esse longo intervalo de varredura foi realizado para visualizar os picos CH da cadeia alquila e bandas largas dos estiramentos OH das moléculas de água na interface.

A figura 16 ilustra alguns dos modos vibracionais CH de cadeias alquila $(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$. As setas representam a direção do deslocamento interno dos estiramentos C-H. Algumas das frequências de ressonância desses modos estão mostradas na tabela 2

Figura 16 – Modos vibracionais do metil e do metileno. Os índices np e fp significam no plano e fora do plano, respectivamente, onde o plano é definido pelas ligações C-C. Por simplicidade, somente o deslocamento dos átomos de hidrogênio são mostrados.

Tabela 2 – Atribuições dos modos estiramentos dos grupos C-H observados por SFG

Modo	Descrição	Frequência (cm ⁻¹)
CH₃(sim.)	Estiramento simétrico do CH ₃	~2878
CH₃(sim., FR)	Estiramento simétrico do CH ₃ (Ressonância de Fermi)	~2945
CH₂(assim.,np)	Estiramento anti-simétrico no plano	~2962
CH₂(assim.,fp)	Estiramento anti-simétrico fora do plano	~2952
CH₂(sim.)	Estiramento simétrico do CH ₂	~2846
CH₂(sim.,FR)	Estiramento simétrico do CH ₂ (Ressonância de Fermi)	~2890
CH₂(assim.)	Estiramento anti-simétrico do CH ₂	~2915

4.2.5 Espectroscopia SFG de filmes de Langmuir-Blodgett de DPPG e DPPC com SWCNT-COOH

Para a fabricação dos filmes de Langmuir-Blodgett de DPPG e DPPC com SWCNT-COOH na subfase, as condições experimentais foram semelhantes às dos filmes de Langmuir de DPPG e DPPC com SWCNT-COOH na mesma subfase, conforme descrito no subitem 4.2.2. Antes de espalhar a solução de DPPG e DPPC sobre a subfase, um substrato sólido (vidro) foi imerso na subfase aquosa. Em seguida, espalhou-se por toda a superfície da subfase aquosa as soluções de DPPG e DPPC com uma concentração de 0,5 mg/mL diluída em clorofórmio, com um volume espalhado de 15 μ L. As barreiras da cuba moveram-se com uma velocidade constante de 8 mm/min, até que a pressão de superfície atingisse ~ 38 mN/m. Manteve-se, então, a pressão superficial constante e iniciou-se o processo de emersão vertical do substrato sólido juntamente com a monocamada numa velocidade de 1 mm/min. Ocorreu, assim, o processo de fabricação do filme de Langmuir-Blodgett de DPPG e DPPC com SWCNT-COOH na subfase. A taxa de transferência (T. R.) dos filmes para os substratos contendo apenas DPPG e DPPC para o substrato foi aproximadamente 1, enquanto a taxa de transferência dos filmes contendo fosfolípidios e SWCNT-COOH na subfase foi de 1,7 – um valor não comum para a obtenção de uma monocamada compacta e organizada⁷⁷. Uma possível explicação para esse valor será apresentada no item 4.3 (Resultados e discussão sobre a interação de Modelos de Membranas Celulares com Nanomateriais).

Após a fabricação dos filmes de Langmuir-Blodgett contendo DPPG, DPPC, DPPG-SWCNT-COOH e DPPC-SWCNT-COOH, esses filmes foram caracterizados por espectroscopia SFG, em varredura de 2700 a 3800 cm^{-1} , com aquisição de 100 medições por ponto, e o intervalo entre dois pontos (*steps*) foi de 10 cm^{-1} – essa longa varredura foi realizada para visualizar os picos CH da cadeia alquila, e possivelmente OH da água remanescente no filme.

4.3 Resultados e discussão sobre a interação de modelos de membranas celulares com nanomateriais

Após a síntese das nanopartículas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$, PDAC e Dextran), foram realizadas medidas de potencial zeta em temperatura ambiente (25 °C). A tabela 3 apresenta a distribuição de cargas para as nanopartículas.

Tabela 3 – Distribuição de cargas das nanopartículas por potencial zeta

Nanopartículas	Potencial Zeta	Desvio padrão da frequência	Temperatura (°C)
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$	-25,9	5,3	25,1
Dextran	-8,9	9,6	25
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$	51,3	8,5	25,1
PDAC	50,5	8,4	25

De acordo com a tabela 3, Dextran e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$ apresentaram cargas negativas. PDAC e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$ apresentaram cargas positivas, devido a presença da amina quaternária na estrutura química de PDAC (figura 14 (b)). Vale a pena ressaltar que a precisão dos valores estão diretamente relacionados com o formato esférico das nanopartículas. Nesta situação, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$, apresentaram valores mais precisos, pois Fe_3O_4 possuem estruturas similares a uma esfera, enquanto os estabilizantes Dextran e PDAC não possuem este formato regular.

A figura 17 ilustra a distribuição de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$ em função do seu tamanho através da técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*). $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$ apresentou uma distribuição média de 23 %, com tamanho ~ 60 nm e índice de polidispersão de 0,245, enquanto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$ apresentou uma dispersão média de 20 %, com tamanho de ~ 245 nm e índice de polidispersão de 0,285. Os resultados de DLS demonstraram que as nanopartículas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dextran}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDAC}$) são homogêneas e com dimensões ideais para investigar as interações com modelos de membranas celulares.

Figura 17 – Distribuição do tamanho das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico

As imagens por Microscopia por Ângulo de Brewster (BAM, *Brewster Angle Microscopy*), modelo *BAM 2 PLUS Nanofilm Technology, Germany*) de DPPG e DPPC foram obtidas na sala limpa (classe 10000), com uma temperatura aproximada de 22°C, usando como subfase as soluções de fosfato monobásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), ambas com concentração de 0,1 mol/L. Espalhou-se sobre a superfície 150 μL da solução de fosfolipídio (DPPG ou DPPC) diluído em clorofórmio, em uma área superficial da cuba de 625 cm^2 , com uma concentração de 0,5 mg/mL. Inicialmente (instante em que se inicia a compressão das barreiras), as moléculas de fosfolipídios estavam dispersas, não sendo possível visualizar a superfície. Mantendo-se a velocidade de compressão das barreiras, ocorreu a transição de fase (fase líquido-expandida): as moléculas de fosfolipídios iniciaram uma autointeração, formando domínios, com pressão de superfície de aproximadamente 7 e 10,8 mN/m para o DPPG e DPPC, respectivamente. Essas imagens estão ilustradas na figura 18. Há um aumento na dimensão dos domínios até atingir um instante em que ocorre a formação da monocamada, de tal forma que não

foi possível visualizar por BAM, pois houve uma pequena amplitude de luz refletida na interface filme/ar.

Figura 18 – Imagens por BAM: (a) DPPG (esquerda: $\pi = 0$ mN/m, direita: $\pi = 7$ mN/m); (b) DPPC (esquerda $\pi = 0$ mN/m, direita: $\pi = 10,8$ mN/m).

A técnica por BAM demonstrou ser de grande importância para se visualizar a formação de filmes ultrafinos na superfície da água, e aqui teve importância para verificar a insolubilidade dos fosfolipídios na superfície da subfase, com a formação de seus respectivos domínios.

4.3.1 Estudo da interação entre DPPG e DPPC com nanopartículas e estabilizantes

Inicialmente, foram desenvolvidos filmes de Langmuir contendo apenas DPPG ou DPPC. Em seguida, esses filmes foram novamente fabricados com a presença das nanopartículas na subfase, sendo as condições experimentais as mesmas descritas no parágrafo anterior, com a presença de sua respectiva nanopartícula e estabilizante: Fe_3O_4 -PDAC, Fe_3O_4 -Dextran, PDAC e Dextran. O objetivo foi verificar e entender as interações desses fosfolipídios com cada nanopartícula presente na subfase, bem como verificar uma estabilidade desses filmes na presença de tais nanopartículas. Foram realizadas cinco isotermas (pressão de superfície em função da área por molécula) em diferentes subfases para os fosfolipídios DPPG e DPPC, separadamente.

As isotermas contendo nanopartículas, PDAC e Dextran na subfase com DPPG e DPPC estão plotadas, respectivamente, nas figuras 19 e 20.

Figura 19 – Isotermas de DPPG contendo diferentes subfases

Figura 20 – Isotermas de DPPC contendo diferentes subfases.

Nas figuras 19 e 20, foi possível verificar que nenhuma das isotermas mostra ruptura da membrana sob interação com nanopartículas ou estabilizantes, pois a pressão máxima de superfície atingida foi de 60 e 50 mN/m, respectivamente. Na figura 19, verificamos que a isoterma da monocamada de DPPG/ Fe_3O_4 -PDAC foi deslocada para um valor maior da área por molécula quando comparada com o sistema contendo DPPG puro. Este efeito não foi observado para monocamadas em contato com nanopartículas de Dextran ou Fe_3O_4 -Dextran, indicando que a interação entre estes nanomateriais e a membrana não é forte suficiente para ocasionar uma reorganização das moléculas de fosfolipídios na membrana. Um comportamento diferente foi verificado para o sistema de DPPC, conforme está ilustrado na figura 20. As isotermas para monocamadas em contato com ambas nanopartículas e com DPPC puro deslocaram para menores áreas por molécula. Em contraste, o sistema em contato com Dextran puro não apresentou uma alteração significativa.

Desta forma, com base apenas nas isotermas (pressão de superfície vs área por molécula), foi possível inferir que essas nanopartículas interagiram com o DPPG e

DPPC. Contudo, não foi possível entender como ocorreu essa interação, sendo necessário utilizar outra técnica para investigar a interação entre os fosfolipídios com as nanopartículas.

A figura 21 ilustra a presença de fosfolipídios (DPPG ou DPPC) na superfície de água com a presença de nanopartículas na subfase aquosa. Mostraremos um modelo de interação com três hipóteses de interações com as nanopartículas presentes na subfase. Inicialmente, há uma interação dos fosfolipídios (DPPG ou DPPC, representados em vermelho) com as nanopartículas (representados em laranja); tal interação foi comprovada com os resultados nos filmes de Langmuir (figuras 19 e 20).

Figura 21 – Possíveis interações entre os fosfolipídios (DPPG ou DPPC) com as nanopartículas.

- Hipótese 1 – As nanopartículas interagem ao redor da região polar dos fosfolipídios, sendo assim, deslocadas para a interface (água/ar). Esta possibilidade pode ser válida apenas para interação DPPG com as nanopartículas, pois com o deslocamento das nanopartículas para a interface há um aumento da área por molécula (figura 19). Na interação do DPPC com as nanopartículas isso não se aplica, pois as isotermas apresentaram resultado contrário (redução dos deslocamentos de área por molécula com a presença de nanopartículas).

- Hipótese 2 – As nanopartículas interagem com a região da ponta polar dos fosfolipídios, de forma que estas permanecem na subfase, próximas à superfície da água. Assim, não ocorre deslocamento de posição dos fosfolipídios. Esta

possibilidade é pouco provável, pois em ambas as isotermas (DPPG ou DPPC) há um deslocamento de área por molécula, conforme demonstrado nas figuras 19 e 20. Há um aumento da área por molécula para DPPG e uma diminuição de área por molécula para o DPPC.

- Hipótese 3 – As nanopartículas são deslocadas para a interface (água/ar) de tal forma que os fosfolipídios que estão sob interação com as nanopartículas apresentam-se completamente no ar (a interação dos fosfolipídios acompanha o formato das nanopartículas). Esta possibilidade pode ser válida para o DPPG, pois as moléculas desse fosfolipídio recobrem as nanopartículas na interface e consequentemente há um aumento na área por molécula. Para o DPPC essa hipótese não se aplica, pois há um menor deslocamento de área por molécula.

Utilizou-se a técnica de espectroscopia SFG para investigar o estiramento CH da cadeia alquila (cauda da molécula do DPPG e DPPC) e os possíveis estiramentos dos grupos funcionais que compõem as nanopartículas (PDAC, Dextran, Fe₃O₄-Dextran e Fe₃O₄-PDAC) que estão na subfase aquosa.

O experimento foi realizado em uma cuba de Langmuir acoplada ao espectrômetro SFG, e as condições experimentais foram as mesmas utilizadas na formação dos filmes de Langmuir do item 4.2.2. Os espectros para DPPG e DPPC são mostrados, respectivamente, nas figuras 22 (a) e 22 (b). Ambos os espectros apresentaram dois picos intensos em 2879 cm⁻¹ e 2945 cm⁻¹, que são atribuídos ao estiramento simétrico do CH₃ terminal da cadeia alquila dos fosfolipídios (desdobrado por ressonância de Fermi com o sobretom do modo de dobramento simétrico do CH₃⁸⁵). Os estiramentos CH₂ não estão presentes nesta monocamada, comprovando a formação de um filme ultrafino, organizado, compacto e orientado na subfase aquosa.

Figura 22 – Espectros SFG em subfase aquosa: (a) DPPG; (b) DPPC.

Os espectros do DPPG contendo nanopartículas e estabilizantes na subfase aquosa estão ilustrados na figura 23. Esses espectros apresentaram ressonâncias muito próximas em relação ao DPPG. Todos os espectros apresentaram dois picos intensos em 2879 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , com as mesmas atribuições do espectro da figura 22 (a), enquanto os estiramentos CH_2 não estão presentes nesta monocamada, comprovando novamente um filme ultrafino, organizado e compacto.

Figura 23 – Espectros SFG do DPPG com diferentes nanopartículas na subfase.

Após obter os espectros de SFG do DPPG com as nanopartículas, analisamos as três hipóteses da figura 21 entre DPPG/PDAC e DPPG/Fe₃O₄-PDAC com as nanopartículas. Verificamos que as nanopartículas incorporam na membrana, ocupando maior área por molécula (conforme verificado nos sistemas de isotermas) e a cadeia alquila dos fosfolipídios estão compactadas/orientadas na interface ar/água, em que somente os estiramentos CH₃ são detectados por espectros de SFG (figura 23). PDAC puro também apresenta o mesmo comportamento, mas a alteração é menor, conforme constatado na figura 19. Portanto, a hipótese 1 da figura 21 é compatível com os sistemas DPPG/PDAC e DPPG/Fe₃O₄-PDAC.

No entanto, para os sistemas com Dextran, diferenças não foram observadas nas isotermas (figura 19) ou por espectros SFG (figura 23) na presença de DPPG (carga negativa). Isto é esperado devido a carga negativa do Dextran em pH neutro. Dextran e Fe₃O₄-Dextran não interagiram com DPPG e permaneceram na subfase, consequentemente, a interação entre as nanopartículas (Fe₃O₄-Dextran ou Fe₃O₄-PDAC) ou estabilizantes e monocamadas de DPPG é direcionada por um mecanismo de repulsão eletrostática.

Os espectros de DPPC contendo nanopartículas e estabilizantes na subfase aquosa estão ilustrados na figura 24. Nestes espectros, somente modos de estiramentos CH₃ foram detectados, e as cadeias alquila dos fosfolipídios também permaneceram distendidas na interface ar/água, situação semelhante com o sistema de DPPG.

Figura 24 – Espectros SFG do DPPC com diferentes nanopartículas na subfase.

Nos sistemas de monocamadas de DPPC (figura 20), ocorreu uma diminuição na área por molécula após a incorporação de nanopartículas e/ou PDAC puro. Um possível cenário neste caso pode ser que PDAC/Nanopartículas interagem e removem moléculas de DPPC da interface ar/água, conforme está ilustrado na figura 25. A interação ocorre por imobilização de DPPC ao redor de toda a nanopartícula, deslocando a cauda hidrofóbica, semelhante a um colapso de domínios de lipídios.

Figura 25 – Interação entre DPPC com suas respectivas nanopartículas⁸⁶.

Este modelo de interação também está relacionado com a intensidade dos espectros de SFG (figura 24). Nos três sistemas onde as monocamadas estão condensadas (figura 21): PDAC, e ambas as nanopartículas, um aumento no sinal

SFG deve ser esperado por causa do aumento da compactação da monocamada. Entretanto, uma diminuição na intensidade é observada para os sistemas com DPPC/PDAC e DPPC/PDAC-Fe₃O₄ em comparação com DPPC puro ou DPPC/Dextran. Este fato pode ser devido a um cancelamento parcial do sinal CH₃ de uma monocamada compacta de DPPC (válido para todos os sistemas), grupos CH₃ estão ao redor das nanopartículas sobre a monocamada contribuindo com um revestimento da monocamada de DPPC.

O efeito nas isotermas de DPPC (figura 20) foi o mesmo para as nanopartículas com os estabilizantes (Dextran e PDAC). Situação esperada, pois DPPC é zwitteriônico (carga total neutra), entretanto, para polímeros puros, este efeito foi diferente, sugerindo que o efeito eletrostático e o tamanho das nanopartículas são importantes.

4.3.2 Estudo da interação entre DPPG e DPPC com CNTs

Foram produzidos separadamente filmes de Langmuir com DPPG e DPPC, em subfase contendo SWCNTs-COOH, obtidos a partir de uma dispersão de nanotubos com concentração de 40 µg/mL. A figura 26 ilustra as isotermas de DPPG e DPPC puros e, em contato com CNTs na subfase aquosa. Através da isoterma (pressão vs área por molécula), foi possível verificar que ocorreu interação entre CNTs com os fosfolipídios através do deslocamento das isotermas para maiores áreas por molécula (isotermas em vermelho e verde), em relação aos fosfolipídios puros.

Figura 26 – Isotermas com CNTs nas subfases: DPPG e DPPC.

Na figura 26, verifica-se que nenhuma das isotermas mostra ruptura da membrana com a interação de SWCNTs-COOH (isotermas representadas em vermelho), pois a pressão máxima de superfície atingida foi de 60 e 70 mN/m, para os sistemas com DPPG/SWCNTs-COOH e DPPC/SWCNTs-COOH, respectivamente. Essas isotermas apresentaram um pequeno aumento na sua área por molécula. Com base apenas nas isotermas (pressão de superfície vs área por molécula), foi possível inferir que SWCNTs-COOH interagiram tanto com o DPPG como com o DPPC. Contudo, não foi possível entender como ocorreu essa interação, sendo necessário utilizar outra técnica para investigar a interação entre os fosfolipídios com estes nanomateriais.

Através da espectroscopia SFG, foi possível investigar o estiramento CH da cadeia alquila (cauda da molécula do DPPG e DPPC), os possíveis estiramentos dos grupos funcionais (-COOH) que compõem os CNTs que estão na subfase aquosa, e entender como ocorreram as possíveis interações. Os experimentos foram realizados com os mesmos procedimentos do item 4.2.1: em uma cuba de Langmuir acoplada ao espectrômetro SFG com subfase contendo fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico. Foi realizada uma varredura de 2700 a 3800 cm^{-1} . Os dois espectros

da figura 27 mostram dois picos intensos em 2879 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , que são atribuídos ao estiramento simétrico do CH_3 terminal da cadeia alquila dos fosfolipídios (desdobrado por ressonância de Fermi com o sobretom do modo de dobramento simétrico do CH_3 ⁸⁵). Os estiramentos CH_2 não estão presentes nesta monocamada, comprovando a formação de um filme ultrafino, organizado, compacto e orientado.

Figura 27 – Espectros SFG de monocamadas de DPPG e DPPC em subfases contendo SWCNT-COOH.

Com o objetivo de comparar a estrutura dos filmes de DPPG e DPPC na superfície da água e em um substrato sólido, foram fabricados filmes LB sobre substratos de vidro. Os filmes foram transferidos à pressão constante de 38 mN/m (em subfase pura e em subfase contendo CNTs). A taxa de transferência (T.R.) dos filmes contendo apenas fosfolipídios para o substrato foi de cerca de 1, valor ideal para a formação de monocamada compacta e organizada sobre o vidro. Ambos os espectros apresentados na figura 28 revelam dois picos intensos em 2879 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , que são atribuídos ao estiramento simétrico do CH_3 terminal da cadeia

alquila dos fosfolipídios (desdobrado por ressonância de Fermi com o sobretom do modo de dobramento simétrico do CH_3 ⁸⁵). A taxa de transferência dos filmes contendo fosfolipídios e CNTs na subfase foi de 1,7 – valor não comum para a obtenção de uma monocamada compacta e organizada⁷⁷. Uma possível explicação para esse valor será apresentada no final deste item.

Nos espectros dos filmes de LB contendo apenas DPPG e DPPC (figura 28) estão presentes os mesmos picos intensos em 2879 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , comprovando a formação de uma monocamada compacta e organizada sobre o substrato; além disso, a taxa de transferência dessas monocamadas foi 1, valor ideal para a formação de monocamada compacta e organizada sobre um substrato sólido.

Figura 28 – Espectro SFG de filmes LB com DPPG e DPPC.

Os espectros dos filmes de LB contendo SWCNTs-COOH na subfase estão ilustrados na figura 29, e mostram as mesmas ressonâncias obtidas dos grupos CH_3 , e bandas representando os estiramentos OH das moléculas de água em 3200 cm^{-1} . Essas ressonâncias dos estiramentos OH são originadas de moléculas da água da subfase, que estavam interagindo com o grupo funcionalizado OH dos CNTs. Desta

forma, verificou-se que, ao serem transferidas para o substrato de vidro, moléculas de água da subfase foram também incorporadas ao substrato. Esse fato é ainda corroborado pelas isotermas obtidas na presença dos CNTs (figura 26), que ilustram um aumento nos valores da área por molécula, em relação ao fosfolípídio puro, demonstrando uma interação entre a ponta polar dos fosfolípidos e os grupos funcionalizados dos nanomateriais (-COOH).

Figura 29 – Espectros dos filmes de LB com DPPG/SWCNTs-COOH e DPPC/SWCNTs-COOH.

A presença de CNTs no filme LB foi confirmada por microscopia de força atômica (AFM), como mostram as imagens da figura 30. Na figura 30 (a) temos a imagem de filme LB contendo apenas DPPG, enquanto na figura 30 (b) está ilustrado filme LB de DPPG com CNTs-COOH – ambos os filmes foram analisados com o objetivo de verificar a incorporação de CNTs sobre o substrato de vidro.

Figura 30 – Imagens de filmes LB por AFM: (a) DPPG e (b) DPPG com CNTs-COOH.

Uma vez comprovada a presença de CNTs no filme, há duas possíveis explicações para os elevados valores para a taxa de transferência (1,7). Em ambos os casos (DPPC/SWCNTs-COOH e DPPG/SWCNTs-COOH), essa elevada taxa de transferência é devida à transferência de moléculas de CNTs-COOH complexados de alguma forma com a monocamada. Nestes dois sistemas, moléculas de água interagem com grupos carboxílicos (-COOH) dos CNTs e são transferidas juntamente com a monocamada sobre o substrato. Nos dois sistemas utilizados há dois possíveis cenários que podem ocorrer as interações entre os modelos de membranas e CNTs-COOH.

A primeira hipótese é de que os CNTs interagem com a monocamada na subfase aquosa, e durante a transferência, CNTs permanecem horizontalmente sobre o substrato. Este possível cenário pode ser aplicado no sistema DPPC/SWCNTs-COOH, pois DPPC é zwitteriônico (possui carga elétrica total nula), interagindo entre a região polar destes fosfolipídios com os grupos funcionalizados (-COOH) dos CNTs, apresentando-se compactados e ordenados sobre este nanomaterial. A sequência 1 da figura 31 ilustra este possível cenário de interação entre DPPC/SWCNTs-COOH.

Com a compressão do sistema, a segunda hipótese consiste em uma ruptura da monocamada, com a incorporação de CNTs na interface água/ar, por causa da repulsão eletrostática entre DPPG e SWCNTs-COOH (ambos possuem carga negativa), portanto, durante a remoção deste sistema há uma desorganização dos

CNTs e moléculas de DPPG revestem este nanomaterial de forma colapsada, conforme apresentado na sequência 2 da figura 31.

Figura 31 – Formação dos filmes LB contendo fosfolípidios, moléculas de água e CNTs desorganizados sobre o substrato de vidro.

4.4 Conclusões sobre o estudo das interações entre modelos de membranas celulares com nanomateriais

Os sistemas de isotermas e espectros de SFG foram fundamentais para investigar a formação dos modelos de membranas celulares, possíveis interações entre monocamadas com nanopartículas e/ou nanotubos de carbono, entendendo detalhadamente a compactação e a orientação das moléculas que compõem a membrana celular a ser investigada. Neste trabalho os resultados mostraram que não ocorreu dissolução dos fosfolípidios em contato com as nanopartículas ou nanotubos de carbono.

As nanopartículas funcionalizadas são capazes de interagir com monocamadas de DPPG e DPPC. Nanopartículas carregadas positivamente incorporaram em membranas carregadas negativamente (DPPG), permanecendo na interface, ocasionando um aumento nos valores de área por molécula. Nos sistemas DPPC/NPs, as nanopartículas são capazes de interagir com moléculas de DPPC (zwitteriônico), ocorrendo um revestimento de lipídios nas NPs sobre a monocamada de DPPC, conseqüentemente, ocorreu uma redução de áreas por molécula, conforme verificado nas isotermas. Os resultados sobre o entendimento das interações entre o fosfolipídio DPPC com as NPs apresentaram maior dificuldade de interpretação; esses fosfolipídios conseguiram imobilizar as nanopartículas na interface ar/água (conforme apresentado por sistemas de isotermas e espectros SFG do item 4.3.1).

A transferência da monocamada contendo fosfolipídios puros para o substrato de vidro comprovou-se ser possível, com poucos defeitos em sua estrutura. Ao incorporar CNTs na subfase, moléculas de água também são removidas juntamente com CNTs e fosfolipídios sobre o substrato, conforme apresentados pelos espectros de SFG (item 4.3.2). As moléculas de DPPG e CNTs apresentaram-se desorganizadas sobre o substrato, por causa do mecanismo de ruptura (repulsão eletrostática) da membrana ocasionada pelo nanomaterial.

As cargas eletrostáticas das regiões polares dos fosfolipídios ou dos nanomateriais (nanopartículas e nanotubos de carbono) são fundamentais para promover as interações de cada sistema utilizado, na interface ar/água, ou durante a transferência para um substrato sólido.

5 PLATAFORMAS PARA CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS

5.1 Nanofibras produzidas por *electrospinning*

Em 1934, Formhals⁸⁷ descobriu a técnica denominada *electrospinning*, enquanto Norton patenteou-a em 1936⁸⁸. Essa técnica é extremamente simples e muito eficaz para a produção de nanofibras a partir de diferentes polímeros. No entanto, esta metodologia ficou por um longo período sem utilização na área da ciência, mas na última década, com a expressiva expansão da nanociência e nanotecnologia, a produção de nanofibras voltou a ser utilizada, por exemplo, na produção de tecidos de matrizes contendo nanofibras que podem representar modelos mimetizados de nanoestruturas de fibras de matriz extracelular nativa (ECM – *Extra Cellular Matrix*)⁸⁹. Com a evolução dos conhecimentos científicos e as diferentes ferramentas para realizar análises de estruturas de dimensões nanométricas, foi possível investigar e entender as potencialidades envolvidas na fabricação de nanofibras.

A fabricação de nanofibras por *electrospinning* consiste na formação de um jato muito fino a partir de uma solução de polímeros, através de uma diferença de potencial muito elevada. Os equipamentos que compõem a técnica de *electrospinning* são muito simples: fonte de alimentação de alta tensão (corrente contínua, ordem de kilovolts), seringa de plástico (descartável), agulha de seringa, bombeador de seringa (dispositivo em que é possível programar a taxa de deposição em mL/h e o tempo de deposição) e suporte metálico revestido com uma folha de alumínio. O conector positivo da fonte de alta tensão é acoplado à agulha da seringa, enquanto o conector negativo da fonte permanece acoplado ao suporte metálico. A figura 32 ilustra o *layout* do sistema que compõe a produção de nanofibras por *electrospinning*.

Figura 32 – Fabricação de nanofibras de polímeros por *electrospinning*.

Existem outros arranjos experimentais para se produzir nanofibras utilizando *electrospinning*. Todos os sistemas consistem em utilizar uma elevada tensão entre a solução e o suporte metálico em que as nanofibras são depositadas. Em geral, o que diferencia cada sistema é a posição da agulha (acoplada à seringa); desta forma, é possível produzir nanofibras com diferentes estruturas, diâmetros, uniformidade dos diâmetros, randômicas ou alinhadas.

A solução de polímeros dissolvida é introduzida no interior da seringa e conduzida para a agulha através do bombeador de seringa, formando uma pequena gota em sua ponta. Ao ser aplicada uma diferença de potencial elevada (ordem de kilovolts) entre a agulha e o suporte metálico, a gota adquire o formato de um cone, denominado cone de Taylor⁹⁰, conforme ilustrado na figura 33. Com as condições adequadas para a formação das nanofibras, a solução que está no interior da agulha está eletricamente carregada e será direcionada ao suporte metálico sob uma elevada tensão. Durante a trajetória do jato contendo a solução polimérica, as moléculas de polímeros sofrem um estiramento e o solvente é evaporado antes de chegar ao

suporte metálico (revestido por uma folha de alumínio); desta forma, há apenas a presença de nanofibras no suporte metálico.

Figura 33 – Formação de nanofibras poliméricas ilustrando a formação do cone de Taylor.

Recentemente, tem sido produzidas nanofibras por *electrospinning* de diversos polímeros e biopolímeros. Com essa técnica, é possível utilizar diferentes materiais biológicos para investigar o comportamento e a interação com estas nanofibras. A maioria dos polímeros apresenta vantagens como não-toxicidade e biocompatibilidade com outras moléculas ou (nano)materiais. Vale a pena lembrar que normalmente os biopolímeros são menos poluentes e oriundos de fontes renováveis, comparativamente aos demais polímeros⁹¹. Matrizes produzidas por *electrospinning* possuem características interessantes, como a elevada porosidade, o tamanho reduzido dos poros, a interação com outras moléculas ou nanomateriais de interesse e a elevada razão entre superfície e volume.

5.2 Experimental

Para a produção das nanofibras, utilizaram-se os seguintes reagentes: PCL (Poli(ϵ -Caprolactone), Sigma-Aldrich, peso molecular: 80.000 g/mol, pureza: > 99%), clorofórmio e metanol (ambos da *Fischer*, pureza: $\geq 99,8\%$). Óxido de grafeno (GO) foi sintetizado a partir do grafite (1 g, Sigma - Aldrich).

PCL (Poli(ϵ -Caprolactone)) é um polímero biodegradável e um poliéster biocompatível aprovado pela FDA (*Foods and Drugs Association*), utilizado em humanos como *drug delivery* e também utilizado em *Tissue Engineering*⁹². Nanofibras poliméricas foram produzidas a partir de soluções contendo PCL, cuja estrutura molecular está ilustrada na figura 34, dissolvido em clorofórmio e metanol.

Figura 34 – Estrutura química do Poli(ϵ -Caprolactone).

Utilizou-se uma concentração de 3,9 % (m/v) de PCL em clorofórmio e metanol (proporção em volume 75/25). A solução foi constantemente agitada em um agitador magnético por 3 horas, sendo os 30 minutos iniciais a 60°C, para ocorrer uma completa dissolução do polímero. Durante a montagem do aparato para a fabricação de nanofibras de PCL, notou-se que a distância ideal entre a ponta da agulha e o suporte metálico (formação das nanofibras poliméricas) foi 15 cm. Foram investigados diferentes parâmetros, como a tensão aplicada (corrente contínua) entre a agulha da seringa e o suporte metálico. As tensões investigadas no transformador de alta tensão (*Harvard Apparatus – Holliston, MA, USA*) foram 10 e 20 kVolts. Outros parâmetros investigados foram os diâmetros das agulhas acopladas à seringa, uma vez que podem influenciar nas estruturas das nanofibras, como diâmetro e uniformidade. Foram utilizadas agulhas com os seguintes diâmetros internos (*Fisher Scientific*): 0,41 mm (G-22); 0,6 mm (G-20); 0,84 mm (G-18); e 1,07 mm (G-17).

Nanofibras de PCL foram depositadas sobre folha de alumínio, em seguida foram transferidas para um substrato de vidro utilizando cola de silicone (*Secure Silicone Adhesive B-400 – Lakeside, AZ, USA*). A figura 35 ilustra a sequência em que as nanofibras de PCL foram transferidas para o substrato de vidro.

Figura 35 – Sequência da fabricação de nanofibras de PCL em substrato de vidro

Inicialmente, foi utilizado em conjunto as soluções de PCL com GO em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL). As soluções com estes nanomateriais foram inseridas no interior da seringa para a obtenção das nanofibras por *electrospinning*. No entanto, não foi possível obter óxido de grafeno com nanofibras de PCL, provavelmente por não possuir interações entre GO (hidrofílico) com PCL (hidrofóbico) e GO possuir maiores dimensões em relação as nanofibras.

Com o objetivo de tornar a superfície de PCL hidrofílica, realizou-se um tratamento com plasma de oxigênio por um minuto neste modelo de *scaffold*. Este procedimento foi fundamental para ocorrer a adesão das células-tronco neurais sobre o biosistema com nanofibras de PCL e GO/nanofibras de PCL. A figura 36 ilustra a imagem de microscopia por ângulo de contato da deposição de uma gota de água sobre nanofibras de PCL, comprovando a superfície hidrofílica deste sistema.

Figura 36 – Imagens por microscopia de ângulo de contato da superfície de nanofibras de PCL:

(a) superfície hidrofóbica; (b) superfície hidrofílica⁹³.

GO com diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) foi diluído em água deionizada. Essas dispersões foram aplicadas sobre *scaffolds* de nanofibras. Dessa forma, neste microambiente, obteve-se um suporte celular mimetizado, com possibilidade de ocorrer crescimento e viabilidade celular. Células-tronco neurais de rato (*MilliTrace Constitutive GFP Reporter Rat Hippocampal Neural Stem Cell*, tipo de linhagem celular: *Neural Stem Cells*) foram aplicadas nesse sistema mimetizado com o objetivo de entender o comportamento celular sob a presença de GO. A figura 37 ilustra todo o processo de formação de *scaffolds* contendo: células-tronco neurais/GO/nanofibras de PCL.

Figura 37 – Processo de formação de *scaffolds*: células-tronco neurais/GO/nanofibras⁹³.

5.3 Resultados e discussão sobre a fabricação de *scaffolds* de nanofibras com óxido de grafeno

A figura 38 (a) ilustra imagem de MEV de nanofibras de PCL obtidas com taxa de deposição de 0,1 mL/h; enquanto a figura 38 (b) ilustra as fibras obtidas com taxa de deposição de 0,3 mL/h.

Figura 38 – Imagens de MEV das nanofibras de PCL com diferentes taxas de deposição: (a) 0,1 mL/h; (b) 0,3 mL/h.

Conforme verificado nas imagens da figura 38, uma pequena variação na taxa de deposição influencia a formação das nanofibras. Utilizando uma taxa inferior a 0,2 mL/h, verificamos que não há diferença na formação das estruturas das nanofibras, apresentando uma melhor uniformidade e sem deformações em sua estrutura. No entanto, quando aumentamos para 0,3 mL/h, verificamos uma notável junção de nanofibras – talvez não tenham sido completamente distendidas pelo curto intervalo de deposição da solução polimérica, podendo haver também a presença de pequenos aglomerados de PCL. Esta análise comparativa mostra que a taxa ideal de deposição é inferior a 0,3 mL/h.

As figuras 39 e 40 trazem uma série de imagens comparativas por MEV de *scaffolds* com nanofibras de PCL em função de diferentes diâmetros de agulhas da

seringa. O conjunto de imagens da figura 39 refere-se a uma tensão de 10 kV, enquanto o conjunto de imagens da figura 40 refere-se a uma tensão de 20 kV.

Figura 39 – Imagens de MEV de *scaffolds* de nanofibras de PCL sob tensão de 10 kV, com diferentes diâmetros das agulhas da seringa: (a) 1,07 mm; (b) 0,84; (c) 0,6 mm; (d) 0,41 mm.

Figura 40 – Imagens de MEV de *scaffolds* de nanofibras de PCL sob tensão de 20 kV, com diferentes diâmetros das agulhas da seringa: (a) 1,07 mm; (b) 0,84; (c) 0,6 mm; (d) 0,41 mm.

Em uma análise comparativa, interpreta-se que, utilizados uma tensão de 10 kVolts no sistema e um elevado diâmetro da agulha (1,07 mm), as nanofibras de PCL não estão uniformizadas em sua estrutura, ao serem comparadas com o sistema que utilizou a tensão de 20 kVolts e diâmetro de 0,41 mm. A figura 41 ilustra uma análise

comparativa da média dos diâmetros das nanofibras em função dos diâmetros das agulhas utilizadas.

Figura 41 – Média dos diâmetros das nanofibras em função dos modelos internos das agulha em diferentes tensões elétricas.

De acordo com a figura 41, verificou-se uma diferença em utilizar a agulha de 0,41 mm (G-22), ocorrendo um menor diâmetro médio das nanofibras de PCL. Portanto, padronizou-se por utilizar esse modelo de agulha com uma tensão elétrica de 20 kVolts nos experimentos envolvendo óxido de grafeno e com células-tronco neurais. Com o objetivo de verificar se há interações entre as nanofibras de PCL e GO, utilizaram-se diferentes concentrações de GO dispersos em água; as concentrações utilizadas foram 0,1; 0,5; e 1,0 mg/mL. Em seguida, as soluções de GO foram aplicadas sobre *scaffolds* de PCL. Posteriormente, as soluções foram inseridas em uma seringa para serem utilizadas por *electrospinning*. A figura 42 ilustra imagens de MEV das nanofibras de PCL com GO em diferentes concentrações.

(a)

(b)

(c)

Figura 42 – Imagens de GO/nanofibras de PCL em diferentes concentrações: (a) 0,1 mg/mL; (b) 0,5 mg/mL; (c) 1,0 mg/mL.

De acordo com as imagens da figura 42, é possível visualizar a presença de GO em todas as fibras, demonstrando-se que a presença deste nanomaterial aumenta com a concentração utilizada. Através desta análise comparativa, adotou-se a concentração de 1,0 mg/mL de GO para desenvolver *scaffolds* com nanofibras de PCL. Utilizou-se também a espectroscopia Raman (*Renishaw in Via microscope*) para caracterizar a presença dos modos vibracionais das moléculas que compõem o óxido de grafeno; nesta caracterização também foi possível quantificar a presença de GO em função da intensidade das bandas presentes nos espectros. A figura 43 ilustra os espectros em função das concentrações de GO.

Figura 43 – Espectro Raman em *scaffolds* com GO/nanofibras de PCL em diferentes concentrações.

Na figura 43 estão presentes bandas em 1351 cm^{-1} , “banda D”, representando uma redução no tamanho dos domínios do plano sp^2 (C-C) pela criação de defeitos, vacâncias e distorções dos domínios sp^2 após completa oxidação; em 1603 cm^{-1} , “banda G”, representando a presença de domínios sp^3 (C-C) do GO. Nesses espectros verifica-se através de uma análise comparativa/quantitativa que no *scaffold*

contendo GO cuja concentração é 0,1 mg/mL, as ressonâncias presentes em 1351 e 1603 cm^{-1} apresentaram uma baixa intensidade, devido à pequena quantidade de GO presente; enquanto em *scaffold* com concentração de 0,5 mg/mL essas bandas apresentaram uma intensidade significativa, cujas ressonâncias podem ser visualizadas no espectro (em vermelho). O espectro cuja concentração contém 1,0 mg/mL apresentou maior intensidade nas bandas ressonantes, e essa composição foi selecionada para os experimentos com células.

Após a obtenção de nanofibras de PCL uniformes utilizou-se esse modelo mimetizado para a cultura de células-tronco neurais de rato (seis dias de crescimento celular) com o objetivo de investigar se há uma interação neste biossistema, e em caso positivo, utilizar este modelo mimetizado em conjunto com GO para verificar uma possível alteração/diferenciação celular. A figura 44 ilustra imagens obtidas por MEV (FE-SEM, *Zeiss Sigma Field emission scanning electron*) de *scaffolds* contendo células-tronco neurais de rato/nanofibras de PCL sobre substrato de vidro.

Figura 44 – Imagens de SEM de *scaffolds* com células-tronco neurais de rato e nanofibras de PCL⁹³.

Pelas imagens da figura 44, verifica-se a presença das células-tronco sobre as nanofibras de PCL. Em ambas as imagens visualiza-se a dispersão de várias células-tronco sobre o modelo mimetizado; desta forma, torna-se de grande relevância investigar e comparar esse biossistema em *scaffolds* com GO, com o objetivo de

entender o comportamento celular e diferenciar a viabilidade celular dos neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

Imagens por MEV de *scaffolds* contendo células-tronco neurais em GO/nanofibras de PCL estão ilustradas na figura 45. No centro da imagem da figura 45 (a) está presente a célula-tronco neural de rato. Na imagem, é possível visualizar toda a célula sobre o sistema mimetizado. A figura 45 (b) ilustra a ampliação deste biossistema, podendo-se ver detalhadamente a sequência contendo célula-tronco, GO e nanofibras de PCL. Vale a pena ressaltar que neste modelo de *scaffold* ocorreu interação de todo o sistema, cuja célula apresentou diferente comportamento celular em relação ao *scaffold* contendo apenas nanofibras de PCL (figura 44).

Figura 45 – Imagens de SEM em *scaffold* contendo células-tronco neurais de rato/GO/nanofibras de PCL: (a) Célula no centro da amostra; (b) Detalhe da interface entre célula-tronco neurais/GO/nanofibras de PCL⁹³.

O trabalho envolvendo a diferenciação de oligodendrócitos em células-tronco neurais de rato em *scaffolds* com nanofibras de PCL e GO foi realizado por um estágio no *KBLee Group* do Departamento de Química da Rutgers – *The State University of New Jersey*, Estados Unidos. Este estágio foi realizado por um ano (processo FAPESP-BEPE: 2012/06394-8) e, no entanto, não foi possível concluir este trabalho (em colaboração) durante o período de estágio. A obtenção das imagens por microscopia eletrônica confocal e fluorescência e as análises bioquímicas foram

realizadas por outros estudantes de pós-graduação (Shreyas Shah *et al*⁹³) sob a supervisão do Prof. Dr. Ki-Bum Lee. A complementação desta etapa do trabalho sobre a diferenciação de células-tronco cultivadas nos *scaffolds* de PCL/GO está descrita no final desta tese, no Apêndice A.

5.4 Conclusões do estudo de células-tronco sobre *scaffolds*

A segunda etapa de trabalho desta tese de doutorado consistiu no desenvolvimento de *scaffolds* com GO, nanofibras de PCL e GO/nanofibras de PCL (diferentes concentrações de GO). Inicialmente, procurou-se otimizar as estruturas das nanofibras de PCL (uniformidade, diâmetros uniformes e rigidez). Os melhores resultados para ocorrer o desenvolvimento das nanofibras de PCL uniformes com diâmetro médio de 130 nm, foi em um sistema de 20 kV e com diâmetro interno da agulha de 0,41 mm. GO em diferentes concentrações foram revestidos pelas nanofibras com o objetivo de entender possíveis influências que este nanomaterial pode ocasionar como um modelo de *scaffold* para a diferenciação celular de células-tronco neurais.

Imagens por MEV mostraram que *scaffolds* com células-tronco neurais sobre diferentes composições de nanomateriais (nanofibras de PCL e GO/nanofibras de PCL) interagem, possibilitando utilizar estas plataformas artificiais em uma análise comparativa para a diferenciação de células-tronco neurais.

Na continuidade do trabalho em colaboração, observou-se que *scaffolds* com grafeno/nanofibras apresentaram um elevado potencial para a diferenciação seletiva de células-tronco neurais para oligodendrócitos sem introduzir indutores que podem prejudicar o meio de cultura celular. A orientação seletiva de células-tronco neurais alterou as propriedades de um *scaffold* específico, podendo ser uma abordagem valiosa para *Tissue Engineering*, onde é possível complementar ou eliminar o uso da diferenciação de exógenos como vetores de genes virais, fatores de crescimento e drogas. O biosistema desenvolvido é um ótimo modelo de *scaffold*, combinando as propriedades de nanofibras e grafeno (nanofibras apresentaram uma topografia ideal para conduzir nervos, direcionando o crescimento de neuritos e promovendo o

crescimento de axônios). Diferentes modelos de *scaffolds* podem ser uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de futuras terapias envolvendo doenças e lesões do sistema nervoso central.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os sistemas de isothermas obtidos pela cuba de Langmuir e os espectros da espectroscopia SFG foram cruciais para investigar as interações entre Modelos de Membranas Celulares com Nanopartículas e Nanotubos de Carbono. A espectroscopia SFG permitiu entender as interações moleculares na interface dos materiais em superfícies líquida ou sólida, com espessura monomolecular, não alterando a organização.

As nanopartículas funcionalizadas são capazes de interagir espontaneamente com monocamadas de DPPG e DPPC. Nanopartículas carregadas positivamente incorporaram em membranas carregadas negativamente (DPPG), permanecendo na interface, ocasionando um aumento nos valores de área por molécula. Os sistemas DPPC/NPs, as nanopartículas são capazes de interagir com moléculas de DPPC (zwitteriônico), ocorrendo um revestimento de lipídios nas NPs sobre a monocamada de DPPC, ocasionando uma redução de área por molécula, conforme verificado nas isothermas (capítulo 4.3.1).

SWCNTs-COOH (carregado negativamente) também foi capaz de interagir espontaneamente com as monocamadas de DPPG e DPPC. Os sistemas com DPPG/SWCNTs-COOH e DPPC/SWCNTs-COOH apresentaram um aumento nos valores de área por molécula devido à repulsão e interação eletrostática, conforme verificado nas isothermas (capítulo 4.3.2). Durante a remoção destes sistemas (DPPG/SWCNTs-COOH e DPPC/SWCNTs-COOH) sobre um substrato sólido, observou-se que as moléculas de DPPC permaneceram sobre moléculas de água e SWCNTs-COOH posicionados horizontalmente sobre o substrato. No sistema DPPG/SWCNTs-COOH, ocorreu uma ruptura da monocamada com a incorporação de CNTs na interface água/ar, por causa da repulsão eletrostática entre DPPG e SWCNTs-COOH. Portanto, durante a remoção deste sistema ocorreu uma desorganização dos CNTs e moléculas de DPPG revestem este nanomaterial de forma colapsada.

A segunda abordagem desta tese, envolvendo o desenvolvimento de *scaffolds* (GO; nanofibras de PCL; GO/nanofibras de PCL) para a diferenciação de células-tronco neurais, foi desenvolvida em colaboração com a *Rutgers – The State University*

of New Jersey, Estados Unidos. Nesse período de estágio foi possível desenvolver e manipular diferentes nanomateriais (nanofibras poliméricas e GO) para serem utilizados em conjunto na cultura de células-tronco neurais. Os resultados comprovaram que a presença de GO é determinante para ocorrer a diferenciação celular nos modelos de *scaffolds* desenvolvidos. Este biosistema desenvolvido (*Tissue Engineering*) é muito importante para aplicações em nanomedicina, uma vez que um determinado nanomaterial pode ser utilizado para o tratamento de determinadas patologias.

As investigações desenvolvidas nesta tese de Doutorado envolveram a interdisciplinaridade de diversas áreas (Física, Química, Engenharia de Materiais e Medicina), que foram fundamentais para a contribuição à Nanociência e Nanotecnologia em um cenário internacional. Até o momento, as investigações sobre: “*Interações entre Modelos de Membranas Celulares com Nanopartículas*” e “*A diferenciação de células-tronco neurais utilizando scaffolds de grafeno*” são trabalhos inéditos na literatura e têm contribuído para o avanço nessa área.

7 TRABALHOS FUTUROS

Pretende-se prosseguir nos estudos utilizando diferentes composições de Modelos de Membranas Celulares e outros Nanomateriais, com o objetivo de entender o efeito que esses nanomateriais podem gerar nos modelos de membranas mimetizados. Essa próxima abordagem pode resultar em um interessante estudo na Nanomedicina, confirmando a toxicidade que um determinado nanomaterial pode causar no modelo de membrana a ser investigado. Células-tronco vêm despertando forte interesse (principalmente na Medicina), e desta forma, pretende-se utilizar outras linhagens de células-tronco para investigar o seu comportamento em diferentes modelos de *scaffolds*, com o objetivo de desenvolver biosistemas com diferentes nanofibras e/ou nanomateriais em sua composição.

REFERÊNCIAS

- 1 POTOČNIK, J. Commission recommendation of 18 october 2011 on the definition nanomaterial. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EM:PDF>>. Acesso em 05 ago. 2014.

- 2 NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, n 5761, p. 622-627, 2006.

- 3 XIA. X.-R.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. An index for characterization of nanomaterials in biological systems. *Nature Nanotechnology*, v. 5, n. 1, p. 602-606, 2010.

- 4 MACIEL, A. P.; LONGO, E.; LEITE, E. R. Dióxido de estanho nanoestruturado: síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 855-862, 2003.

- 5 FDA - U. S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em 20 Jul. 2014.

- 6 JAMES, F. H.; DANIEL, N. S.; HENRY, M. S. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*, v. 49, n. 18, p. N309, 2004.

- 7 HAZARIKA, P.; CEYHAN, B.; NIEMEYER, C. M. Reversible Switching of DNA-Gold Nanoparticle Aggregation. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 43, n. 47, p. 6469-6471, 2004.

- 8 WANG, X.; LIU, L.-H.; RAMSTRÖM, O.; YAN, M. Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, n. 10, p. 1128-1139, 2009.

- 9 WALKEY, C.; SYKES, E. A.; CHAN, W. C. W. Application of Semiconductor and Metal Nanosctructures in Biology and Medicine. *Hematology*, v. 2009, n. 1, p. 701-707, 2009.

- 10 DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 6, p. 2256-2282, 2012.

- 11 MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, v. 150, n. 5, p. 552-558, 2007.
- 12 KENNEDY, L. C.; BICKFORD, L. R.; LEWINSKI, N. A.; COUGHLIN, A. J.; HU, Y.; DAY, E. S.; WEST, J. L.; DREZEK, R. A. A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*, v. 7, n. 2, p. 169-183, 2011.
- 13 GHANN, W. E.; ARAS, O.; FLEITER, T.; DANIEL, M.-C. Syntheses and Characterization of Lisinopril-Coated Gold Nanoparticles as Highly Stable Targeted CT Contrast Agents in Cardiovascular Diseases. *Langmuir*, v. 28, n. 28, p. 10398-10408, 2012.
- 14 SOO, P.-C.; HORNG, Y.-T.; CHANG, K.-C.; WANG, J.-Y.; HSUEH, P.-R.; CHUANG, C.-Y.; LU, C.-C.; LAI, H.-C. A simple gold nanoparticle probes assay for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex from clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes*, v. 23, n. 5, p. 240-246, 2009.
- 15 ROLIM, T. V. C. Síntese e funcionalização de nanopartículas com Oligonucleotídeo para aplicação em genossensores no diagnóstico avançado de predisposição à hipertensão arterial. 2013. 129 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 16 IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.
- 17 IIJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, v. 363, n. 6430, p. 603-605, 1993.
- 18 BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science & Engineering B*, v. 119, n. 2, p. 105-118, 2005.
- 19 THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.
- 20 CHARLIER, J.-C. Defects in carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 12, p. 1063-1069, 2002.

21 JIA, L.; ZHANG, Y.; LI, J.; YOU, C.; XIE, E. Highly ordered in-plane orientation of single-walled carbon nanotubes. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, v. 10, n. 10, p. 2743-2747, 2008.

22 SUN, Y.-P.; FU, K.; LIN, H.; HUANG, W. Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 12, p. 1096-1104, 2002.

23 CHEN, J.; HAMON, M. A.; HU, H.; CHEN, Y.; RAO, A. M.; EKLUND, P. C.; HADDON, R. C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science*, v. 282, n. 5386, p. 95-98, 1998.

24 MICKELSON, E. T.; CHIANG, I. W.; ZIMMERMAN, J. L.; BOUL, P. J.; LOZANO, J.; LIU, J.; SMALLEY, R. E.; HAUGE, R. H.; MARGRAVE, J. L. Solvation of fluorinated single-wall carbon nanotubes in alcohol solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, n. 21, p. 4318-4322, 1999.

25 CHEN, J.; RAO, A. M.; LYUKSYUTOV, S.; ITKIS, M. E.; HAMON, M. A.; HU, H.; COHN, R. W.; EKLUND, P. C.; COLBERT, D. T.; SMALLEY, R. E.; HADDON, R. C. Dissolution of full-length single walled carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, n. 13, p. 2525-2528, 2001.

26 ZUCOLOTTO, V.; BARBOSA NETO, N. M.; RODRIGUES JUNIOR, J. J.; CONSTANTINO, C. J. L.; ZILIO, S. C.; MENDONÇA, C. R.; AROCA, R. F.; OLIVIERA JUNIOR, O. N. Photoinduced phenomena in layer-by-layer films of Poly(Allylamine Hydrochloride) and brilliant yellow azodye. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 4, n. 7, p. 855-860, 2004.

27 HE, J. A.; BIAN, S.; LI, L.; KUMAR, J.; TRIPATHY, S. K.; SAMUELSON, L. A. Surface relief gratings from electrostatically layered azo dye films. *Applied Physics Letters*, v. 76, n. 22, p. 3233-3235, 2000.

28 KHOPADE, A. J.; CARUSO, F. Stepwise self-assembled poly(amidoamine) dendrimer and poly(styrenesulfate) microcapsules as sustained delivery vehicles. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 6, p. 1154-1162, 2002.

29 ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; MOREIRA, W. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Nanoscale processing of polyaniline and phthalocyanines for sensing applications. *Sensors and Actuators B*, v. 113, n. 2, p. 809-815, 2006.

30 NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

31 LEE, C.; WEI, X.; KYSAR, J. W.; HONE, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science*, v. 321, n. 5887, p. 385-388, 2008.

32 BALANDIN, A. A.; GHOSH, S.; BAO, W.; CALIZO, I.; TEWELDEBRHAN, D.; MIAO, F.; LAU, C. N. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano Letters*, v. 8, n. 3, p. 902-907, 2008.

33 GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. *Nature Materials*, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

34 RUOFF, R. Graphene: calling all chemists. *Nature Nanotechnology*, v. 3, n. 1, p. 10-11, 2008.

35 COMPTON, O. C.; NGUYEN, S. T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *Small*, v. 6, n. 6, p. 711-723, 2010.

36 MKHOYAN, K. A.; CONTRYMAN, A. W.; SILCOX, J.; STEWART, D. A.; EDA, G.; MATTEVI, C.; MILLER, S.; CHHOWALLA, M. Atomic and electronic structure of graphene-oxide. *Nano Letters*, v. 9, n. 3, p. 1058-1063, 2009.

37 PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology*, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2009.

38 KIM, F.; COTE, L. J.; HUANG, J. Graphene oxide: surface activity and two-dimensional assembly. *Advanced Materials*, v. 22, n. 17, p. 1954-1958, 2010.

39 EDA, G.; CHHOWALLA, M. Chemically derived graphene oxide: towards large-area thin-film electronics and optoelectronics. *Advanced Materials*, v. 22, n. 22, p. 2392-2415, 2010.

40 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

41 LAMBERT, A. G.; DAVIES, P. B.; NEIVANDT, D. J. Implementing the theory of sum frequency generation vibrational spectroscopy: a tutorial review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 40, n. 2, p. 103-145, 2005.

42 FRANKEN, P. A.; HILL, A. E.; PETERS, C. W.; WEINREICH, G. Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, v. 7, n. 4, p. 118-119, 1961.

43 LORENTZ, H. A. *The theory of electrons*. New York: Dover, 1952.

44 BOYD, R. W. *Nonlinear optics*. San Diego: Academic Press, 1992.

45 CASSON, B. D. *Phase transitions in surfactant monolayers*. 1988. Ph. D. Thesis. (Physics) – University of Oxford, Oxford, 1998.

46 BRAUN, R.; CASSON, B. D.; BAIN, C. D. A sum-frequency study of the two-dimensional phase transition in a monolayer of undecanol on water. *Chemical Physics Letters*, v. 245, n. 4, p. 326-334, 1995.

47 SOMORJAI, G. A.; SU, X.; McCREA, K. R.; RIDER, K. B. Molecular surface studies of adsorption and catalytic reaction on crystal (Pt, Rh) surfaces under high pressure conditions (atmospheres) using sum frequency generation (SFG) – surface vibrational spectroscopy and scanning tunneling microscopy (STM). *Topic in Catalysis*, v. 8, n. 1, p. 23-34, 1999.

48 FRANKEN, P. A.; HILL, A. E.; PETERS, C. W.; WEINREICH, G. Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*, v. 7, n. 4, p. 118-119, 1961.

49 SHEN, Y. R. *The principles of nonlinear optics*. New York: Wiley & Sons, 1984. Cap. 6, 25.

50 HIROSE, C.; AKAMATSU, N.; DOMEN, K. Formulas for the analysis of the surface SFG spectrum and transformation coefficients of Cartesian SFG tensor components. *Applied Spectroscopy*, v. 46, n. 6, p. 1051-1072, 1992.

51 ROBERTS, G. *Langmuir-Blodgett films*. New York: Plenum Press, 1990.

52 BONARDI, C. *Potencial de superfície de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett*. 1995. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

53 FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.

54 HO, K. C.; TSOU, Y. H. Chemiresistor-type NO gas sensor based on nickel phthalocyanine thin films. *Sensors and Actuators B: chemical*, v. 77, n. 1, p. 253-259, 2001.

55 AROCA, R.; THEDCHANAMOORTHY, A. Vibrational studies of molecular-organization in evaporated phthalocyanine thin solid films. *Chemistry of Materials*, v. 7, n. 1, p. 69-74, 1995.

56 RIUL JUNIOR, A.; MALMEGRIM, R. R.; FONSECA, F. J.; MATTOSO, L. H. C. An artificial taste sensor based on conducting polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, n. 11, p. 1365-1369, 2003.

57 FABRE, R. M.; OKEYO, G. O.; TALHAM, D. R. Supported lipid bilayers at skeletonized surfaces for the study of transmembrane proteins. *Langmuir*, v. 28, n. 5, p. 2835-2841, 2012.

58 SAMUELSON, L. A.; MILLER, P.; GALOTTI, D. M.; MARX, K. A.; KUMAR, J.; TRIPATHY, K.; KAPLAN, D. L. The monomolecular organization of a photodynamic protein system through specific surface recognition of streptavidin by biotinylated Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, v. 8, n. 2, p. 604-608, 1992.

59 GANGULY, A.; RAJDEV, P.; WILLIAMS, S. M.; CHATTERJI, D. Nonspecific interaction between DNA and protein allows for cooperativity: a case study with mycobacterium DNA binding protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 1, p. 621-632, 2012.

60 CLOP, E. M.; CLOP, P. D.; SANCHEZ, J. M.; PERILLO, M. A. Molecular packing tunes the activity of *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase incorporated in Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, v. 24, n. 19, p. 10950-10960, 2008.

61 OWAKU, K.; GOTO, M.; IKARIYAMA, Y.; AIZAWA, M. Protein a Langmuir-Blodgett film for antibody immobilization and its use in optical immunosensing. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 9, p. 1613-1616, 1995.

62 SUN, Q.; ZORIN, N. A.; CHEN, D.; CHEN, M.; LIU, T.-X.; MIYAKE, J.; QIAN, D. -J. Langmuir-Blodgett films of pyridyldithio-modified multiwalled carbon nanotubes as a support to immobilize hydrogenase. *Langmuir*, v. 2010, n. 12, p. 10259-10265, 2010.

63 SAKAKIBARA, K.; KAMITAKAHARA, H.; TAKANO, T.; NAKATSUBO, F. Redox-active cellulose Langmuir-Blodgett films containing β -carotene as a molecular wire. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 5, p. 1657-1664, 2007.

64 ZHAO, S.; WALKER, D. S.; REICHERT, W. M. Cooperativity in the binding of avidin to biotin-lipid doped Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, v. 9, n. 11, p. 3166-3173, 1993.

65 EDMISTON, P. L.; LEE, J. E.; CHENG, S.-S.; SAAVEDRA, S. S. Molecular orientation distributions in protein films. 1. cytochrome *c* adsorbed to substrates of variable surface chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 3, p. 560-570, 1997.

66 KAMILIYA, T.; PAL, P.; TALAPATRA, G. B. Interaction of ovalbumin with phospholipids Langmuir-Blodgett film. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 5, p. 1199-1205, 2007.

67 CAO, X. H.; MELLO, S. V.; LEBLANC, R. M.; RASTOGI, V. K.; CHENG, T. C. DEFRANK, J. J. Detection of paraoxon by immobilized organophosphorus hydrolase in a Langmuir-Blodgett film. *Colloids and Surfaces A – physicochemical and engineering aspects*, v. 250, n. 1, p. 349-356, 2004.

68 WANG, J.; ZHAO, H. X.; DU, L. P.; CAI, H.; WANG, P. An enzyme-metal-insulator-silicon structured sensor using surface photovoltage technology for potentiometric glucose detection. *Sensors and Actuators B: chemical*, v. 187, p. 147-152, 2013.

69 RUPP, S.; VON SCHICKFUS, M.; HUNKLINGER, S.; EIPEL, H.; PRIEBE, A.; ENDERS, D.; PUCCI, A. A shear horizontal surface acoustic wave sensor for the detection of antigen-antibody reactions for medical diagnosis. *Sensors and Actuators B: chemical*, v. 134, n. 1, p. 225-229, 2008.

70 SUN, Y.; LIU, X.; SONG, D.; TIAN, Y.; BI, S.; ZHANG, H. Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance immunosensing by antibody-antigen coupling. *Sensors and Actuators B: chemical*, v. 122, n. 2, p. 469-474, 2007.

71 TAKAHASHI, H.; LI, B.; SASAKI, T.; MIYAZAKI, C.; KAJINO, T.; INGAKI, S. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chemistry of Materials*, v. 12, n. 11, p. 3301-3305, 2000.

72 AISSAOUI, N.; LANDOULSI, J.; BERGAOUI, L.; BOUJDAY, S.; LAMBERT, J.-F. Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: Influence of the crosslinking agent. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, n. 6, p. 336-343, 2013.

73 TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y. Magneto-controlled bioelectronics for the antigen-antibody interaction based on magnetic-core/gold-shell nanoparticles functionalized biomimetic interface. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, n. 2, p. 55-61, 2008.

74 LEE, R. J.; NIKLASON, L. A novel flow bioreactor for *in vitro* microvascularization. *Tissue Engineering C*, v. 16, n. 5, p. 1191-1200, 2010.

75 LEE, J.-H.; KIM, B.-C.; OH, B.-K.; CHOI, J. W. Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 9, n. 7, p. 1018-1026, 2013.

76 BALAMURUGAN, S.; MAYER, K. M.; LEE, S.; SOPER, S. A.; HAFNER, J. H.; SPIVAK, D. A. Nanostructure shape effects on response of plasmonic aptamer sensors. *Journal of Molecular Recognition*, v. 26, n. 9, p. 402-407, 2013.

77 PETTY, M. C. *Langmuir-blodgett films*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

78 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers, 2000.

79 HULBERT, A. J.; ELSE, P. L. Membrane as possible pacemakers of metabolism. *Journal of Theoretical Biology*, v. 199, n. 3, p. 257-274, 1999.

80 CELL membrane. Disponível em: <en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane>. Acesso em: 9 abr. 2012.

81 CAJAL, Y.; ALSINA, M. A.; REIG, F.; RODRIGUEZ, L.; MESTRES, C.; HARO, I. Interaction of a multiple antigenic peptide of hepatitis A virus with monolayers and bilayers of acid, basic, and zwitterionic phospholipids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 198, n. 1, p. 78-86, 1998.

82 MARTINI, M. F.; DISALVO, E. A. Influence of electrostatic charges and non-electrostatic components on the adsorption of an aspartyl protease to lipid interfaces. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, v. 22, n. 3, p. 219-226, 2001.

83 CHOU, J. J.; KAUFMAN, J. D.; STAHL, S. J.; WINGFIELD, P. T.; BAX, A. Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel. *Journal of the American Chemistry Society*, v. 124, n. 11, p. 2450-2451, 2002.

84 BORISSEVITCH, G. P.; TABAK, M.; OLIVEIRA, O. N. Interaction of dipyrindamole with lipids in mixed Langmuir monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta – biomembranes*, v. 1278, n. 1, p. 12-18, 1996.

85 GUYOT-SIONNEST, P.; HUNT, J. H.; SHEN, Y. R. Sum-frequency vibrational spectroscopy of a Langmuir film: Study of molecular orientation of a two-dimensional system. *Physical Review Letters*, v. 59, n. 14, p. 1597-1600, 1987.

86 UEHARA, T. M.; MARANGONI, V. S.; PASQUALE, N.; MIRANDA, P. B.; LEE, K.-B.; ZUCOLOTTI, V. A detailed investigation on the interactions between magnetic nanoparticles and cell membrane models. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 5, n. 24, p. 13063-13068, 2013.

87 FORMHALS, A. *Process and apparatus for preparing artificial threads*. USPO 1975504, 2 out. 1934.

88 Massachusetts Institute of Technology. C. L. Norton. *Method and apparatus for producing fibrous or filamentary material*. US Patent, 2048651, 1944.

89 XIE, J.; MACEWAN, M. R.; SCHWARTZ, A. G. XIA, Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*, v. 2, n. 1, p. 35-44, 2010

90 WILSON, C. T. R.; TAYLOR, G. I. The bursting of soap-bubbles in a uniform electric field. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, v. 22, n. 5, p. 728-730, 1925.

91 YANG, X.; CHEN, X.; WANG, H. Acceleration of Osteogenic Differentiation of Preosteoblastic Cells by Chitosan Containing Nanofibrous Scaffolds. *Biomacromolecules*, v.10, n. 10, p. 2772-2778, 2009.

92 CIPITRIA, A.; SKELTN, A.; DARGAVILLE, T. R.; DALTON, P. D.; HUTMACHER, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds – a review. *Journal of Material Chemistry*, v. 21, n. 26, p. 9419-9453, 2011.

93 SHAH, S.; YIN, P. T.; UEHARA, T. M.; CHUENG, S.-T. D.; YANG, L.; LEE, K.- B. Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Hybrid Scaffolds. *Advanced Materials*, v. 26, n. 12, p. 1793-1946, 2014.

APÊNDICE A

Diferenciação de células-tronco neurais em *scaffolds* com nanofibras de PCL e óxido de grafeno

Descreveremos a seguir a complementação dos trabalhos iniciados durante meu estágio BEPE (processo FAPESP: 2012/06394-8) com nanofibras de PCL/GO em *scaffolds* celulares. Esta etapa do trabalho foi desenvolvida por estudantes de pós-graduação (*Shreyas Shah, Perry T. Yin, Sy-Tsong Dean Chueng, Letao Yang*) sob a supervisão do Prof. Dr.: Ki-Bum Lee no Departamento de Química e Química Biológica da Rutgers - *The State University of New Jersey*, Estados Unidos.

1 Metodologia

1.1 Cultura de células-tronco neurais sobre nanofibras de PCL

Um conjunto de *scaffolds* sobre substrato de vidro – controle, nanofibras de PCL, GO e GO/nanofibras de PCL – foi inserido em placas para cultura de células (24 divisões) contendo solução tampão fosfato-salino (PBS – *Phosphate buffered saline*). Em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo/biomarcador específico por 1 hora, utilizou-se o anticorpo anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen/Molecular Probes Alexas Fluor 546).

Os volumes utilizados para o anticorpo com seus respectivos marcadores biológicos foram estes:

- 400 μ L de anticorpo + 1,33 μ L de MBP (proteína básica de mielina de rato) – MBP é específico para marcar oligodendrócitos;
- 400 μ L de anticorpo + 1 μ L de *beta-III tubulin (TuJ 1)* – *TuJ1* é específico para marcar neurônios;

- 400 μ L de anticorpo + 1,33 μ L de GFAP (*Glial Fibrillary Acidc Protein*) – GFAP é específico para marcar astrócitos.

A cultura de células foi mantida por seis dias a uma temperatura de 37°C. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (em cada lavagem, as amostras foram mantidas por cinco minutos). Após a lavagem, foi adicionada uma solução de 400 μ L do anticorpo com 2 μ L do biomarcador (MBP, TuJ1 e GFAP) para ser analisada por microscópios de fluorescência e confocal.

2 Resultados e discussão

Realizou-se a cultura de células-tronco neurais de rato por seis dias sob diversos modelos de *scaffolds* (em substratos de vidros): controle (somente células-tronco neurais sobre substrato de vidro), GO (concentrações: 0,1; 0,5; e 1,0 mg/mL), nanofibras de PCL e GO/nanofibras de PCL (concentrações de GO: 0,1; 0,5; e 1,0 mg/mL). O conjunto desses modelos mimetizados foi investigado por imagens de microscopia por fluorescência, utilizando-se seus respectivos marcadores neurais: GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) – Astrócitos; TuJ1 (β -III tubulin) – Neurônios e MBP (Proteína básica de mielina) – Oligodendrócitos.

QPCR (técnica baseada no princípio da reação em cadeia da polimerase para multiplicar ácidos nucleicos e quantificar DNA) foi utilizada para comparar a expressão gênica de três marcadores que são utilizados para a diferenciação de células-tronco neurais: GFAP – astrócitos; TuJ1 – neurônios e MBP – oligodendrócitos. O gráfico da figura 46 mostra uma análise comparativa de *scaffolds* com diferentes composições (nanofibras de PCL; GO em diferentes concentrações e GO em diferentes concentrações/nanofibras de PCL) em relação ao controle (*glass* – amostra com apenas células-tronco neurais sobre o substrato de vidro).

Scaffolds contendo apenas nanofibras de PCL ou GO (0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) apresentaram um aumento da expressão gênica de oligodendróctios (barras verticais em azul), praticamente dobrando a expressão de MBP em relação ao controle, nesta mesma comparação, TuJ1 mostrou apenas um aumento ~ 1,3 vezes e GFAP uma redução (~ metade) em relação ao controle (vidro), indicando uma evidência para a

diferenciação de oligodendrócitos comparado com astrócitos (verde) e neurônios (vermelho). Na literatura não há estudos do efeito que grafeno pode ocasionar para a diferenciação de oligodendrócitos, somente há estudos que nanofibras (produzidas por *electrospinning*) podem servir como *scaffolds* para a cultura de oligodendrócitos⁹⁴.

Figura 46 – Análise comparativa de qPCR do crescimento celular (seis dias) de células-tronco neurais em diferentes *scaffolds*⁹³.

Neste trabalho, a interação destes dois nanomateriais (GO e nanofibras de PCL) pode ser favorável para o desenvolvimento com células-tronco neurais. *Scaffolds* com nanofibras revestidas com baixa concentração de GO (0,1 mg/mL) resultou em um aumento da expressão gênica ~ 6,5 vezes maior de MBP em relação ao controle, valor superior em relação com somente nanofibras de PCL ou GO. As expressões foram altamente pronunciadas em células-tronco sobre GO (0,5 mg/mL)/nanofibras de PCL com um aumento ~ 8,9 vezes e GO (1,0 mg/mL)/nanofibras de PCL com um aumento ~ 9,9 vezes de MBP. Nestes resultados comparativos não houve uma diferença significativa entre GO (0,5 mg/mL) e GO (1,0 mg/mL), indicando uma saturação de GO com concentração de 1,0 mg/mL sobre a superfície de nanofibras de PCL. Além disso, neste estudo comparativo temos uma diminuição da expressão de GFAP e um aumento significativo de TuJ1, demonstrando que estes

scaffolds promovem uma seleção de diferenciação de células-tronco neurais com forte preferência para a linhagem celular de oligodendrócitos.

Para explorar o potencial destes *scaffolds* híbridos como plataforma de cultura para diferenciação de oligodendrócitos, selecionamos GO (1,0 mg/mL)/nanofibras de PCL para todos os experimentos. Caracterizou-se o grau de diferenciação para oligodendrócitos examinando a expressão de marcadores estabelecidos em nível celular e genético. Após seis dias de cultura celular, as células foram crescidas em *scaffolds* com GO/nanofibras de PCL marcadas com Olig2 e MBP. As células imunologicamente mostraram uma expressiva extensão de ambas as localizações de Olig2 e MBP. A figura 47 mostra a diferenciação de oligodendrócitos sobre GO/nanofibras de PCL por microscopia de fluorescência após seis dias de cultura celular.

Figura 47 – Imagens da diferenciação de oligodendrócitos em GO/nanofibras de PCL por microscopia de fluorescência⁹³.

Há vários estudos sugerindo que integrinas (proteínas de adesão presentes na membrana celular) sinalizam a regulação de diferenciação e desenvolvimento de oligodendrócitos, onde é possível incluir: FAK (kinase de adesão focal), akt (proteína kinase B), ILK (kinase ligada a integrina) e Fyn (proteína Fyn kinase). Dentre as diversas proteínas de sinalização celular, investigamos a expressão de FAK, Akt, ILK

e Fyn que são utilizados para mediar o citoesqueleto e o processo de extensão durante o desenvolvimento de oligodendrócitos.

A ruptura de cada uma destas proteínas é relatada para causar uma variedade de defeitos de desenvolvimentos (incluindo processos de redução de extensão, formação aberrante de mielina⁹⁵⁻⁹⁸). A cultura de células-tronco neurais sobre superfícies revestidas com GO aumentou a expressão gênica de todos estes fatores (figura 48). Estas moléculas de sinalização mostraram uma tendência de expressão semelhante, em que *scaffold* com apenas GO mostrou um aumento relativo da expressão em relação com as nanofibras de PCL. O maior nível de expressão gênica foi novamente confirmado em *scaffold* com GO/nanofibra de PCL, com aumentos ~ 2,6 vezes em FAK e ~ 1,7 vezes em Akt, ILK e Fyn. Portanto, estes resultados comprovam a função de GO na sinalização de integrina, podendo explicar o aumento da diferenciação de oligodendrócitos de células-tronco sobre *scaffolds* híbridos.

Figura 48 – Expressão da sinalização da integrina sobre proteínas em *scaffolds*: (a) Diagrama da sinalização de integrinas em proteínas na diferenciação/desenvolvimento de oligodendrócitos. (b) Análise quantitativa de PCR para avaliar a expressão gênica da integrina sinalizando as proteínas FAK, Akt, ILK, Fyn⁹³.

Com o objetivo de elucidar esta correlação, investigamos a localização/diferenciação das sinalizações de ambos os marcadores biológicos de integrinas utilizando a microscopia confocal. Foram realizadas uma coloração dupla para: a) Olig2 – marcador de oligodendrócitos; b) FAK – um dos principais reguladores de

sinalização integrina – ECM, e comprovamos nesse estudo uma elevada expressão em cultura de células sobre nanofibras de GO/nanofibras de PCL. A coloração em roxo para Olig2 (roxo) e FAK (laranja) por microscopia confocal foi comparada por cultura de células-tronco neurais sobre nanofibras de GO/PCL com outros substratos de controle (figura 49). Anteriormente, mencionamos que o crescimento de células sobre nanofibras de GO/nanofibras de PCL mostrou uma maior intensidade e o maior número de expressão de células de Olig2, enquanto nanofibras de PCL e GO apresentam expressões mínimas e moderadas, condição similar ao que foi verificada em FAK (laranja), cuja expressão está demonstrada na figura 49. FAK (localizada no citoplasma) e Olig2 (localizada no núcleo) podem ser facilmente visualizados. As expressões de FAK e Olig2 também foram observadas em todas as amostras (figura 48). Além disso, GO/nanofibras de PCL mostrou expressão gênica de maior intensidade para ambos marcadores e o maior número de células em FAK e Olig2. Portanto, estes resultados sugeriram que *scaffolds* com GO/nanofibras de PCL permitiram promover a diferenciação de oligodendrócitos através de microambientes específicos ativando a sinalização intracelular da integrina.

Figura 49 – Imagens por microscopia confocal de células-tronco neurais após seis dias de cultura celular sobre diferentes *scaffolds*⁹³

REFERÊNCIAS

- 94 LEE, S.; LEACH, M.; K.; REDMOND, S. A.; CHONG, S. Y. C.; MELLON, S. H.; TUCK, S. J.; FENG, Z.-Q.; COREY, J. M.; CHAN, J. R. A culture system to study oligodendrocyte myelination process using engineered nanofibers. *Nature Methods*, v. 9, n. 9, p. 917-922, 2012.
- 95 O'MEARA, R. W.; MICHALSKI, J. P.; ANDERSON, C.; BHANOT, K.; RIPPSTEIN, P.; KOTHARY, R. Integrin-linked kinase regulates process extension in oligodendrocytes via control of actin cytoskeletal dynamics. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 23, p. 9781-9783, 2013.
- 96 OSTERHOUT, D. J.; WOLVEN, A.; WOLF, R. M.; RESH, M. D.; CHAO, M. V. Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *The Journal of Cell Biology*, v. 145, n. 6, p. 1209-1218, 1999.
- 97 BARROS, C. S.; NGUYEN, T.; SPENCER, K. S.; NISHIYAMA, A.; COLOGNATO, H.; MÜLLER, U. Beta1 integrins are required for normal CNS myelination and promote AKT-dependent myelin outgrowth. *Development*, v. 136, n. 16, p. 2717-2724, 2009.
- 98 FORREST, A. D.; BEGGS, H. E.; REICHARDT, L. F.; DUPREE, J. L.; COLELLO, R. J.; FUSS, B. Focal adhesion kinase (FAK): A regulator of CNS myelination. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 15, p. 3456-3464, 2009.

APÊNDICE B

Artigos publicados

Durante o Doutorado, foi possível publicar alguns dos trabalhos em revistas especializadas nas áreas de elevada repercussão internacional, a seguir, encontram-se os artigos:

✓ **UEHARA, T. M.**; MARANGONI, V. S.; PASQUALE, N.; MIRANDA, P. B.; LEE, K. B.; ZUCOLOTTI, V. A detailed investigation on the interactions between magnetic nanoparticles and cell membrane models. ***ACS Applied Materials and Interfaces***, v. 5, n. 24, p. 13063-13068, 2013.

✓ SHAH, S.; YIN, P. T.; **UEHARA, T. M.**; CHUENG, S. -T. D.; YANG, L.; LEE, K. -B. Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Hybrid Scaffolds. ***Advanced Materials***, v. 26, n. 12, p. 3673-3680, 2014.

✓ **UEHARA, T. M.**; AGUIAR, H. B.; BERGAMASKI, K.; MIRANDA, P. B. Adsorption of Alkylthiol Self-Assembled Monolayers on Gold and the Effect of Substrate Roughness: A Comparative Study Using Scanning Tunneling Microscopy, Cyclic Voltammetry, Second-Harmonic and Sum-Frequency Generation. ***ACS The Journal of Physical Chemistry C***, v. 118, n. 35, p. 20374-20382, 2014.