Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

***AUTO-ORGANIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE
SENSORES, BIOSSENSORES E MODELOS DE MEMBRANA
PARA APLICAÇÃO EM NANOMEDICINA***

Juliana Cancino Bernardi

Orientador: Sergio A. Spinola Machado

Co-Orientador: Valtencir Zucolotto

Juliana Cancino Bernardi

*AUTO-ORGANIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES,
BIOSSENSORES E MODELOS DE MEMBRANA PARA APLICAÇÃO EM
NANOMEDICINA*

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências, área de
concentração Química Analítica.

Orientador: Sergio A. Spinola Machado

Co-Orientador: Valtencir Zucolotto

São Carlos

Outubro/2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 30/11/2011

Juliana Cancino Bernardi

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Bernardi, Juliana Cancino

Auto-organização no desenvolvimento de sensores, biossensores e modelos de membrana para aplicação em nanomedicina. / Juliana Cancino Bernardi. -- São Carlos, 2011.

153 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2011.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado.

1. Sensores. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

Dedico este trabalho,

Aos meus pais: Maria Euride e José

A vocês, meus maiores incentivadores...

“A vocês que compartilharam meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos, lutando comigo... A vocês, a quem cada vitória representou toda a esperança de uma vida gratificada por conquistas... A vocês, a quem muitas vezes fui motivo de alegria, outras de tristeza, porém sempre alvo de atenção maior, dedico a minha conquista com a mais profunda admiração e respeito. A vida... dedico, a você mãe que me ensinou a vivê-la com dignidade. O futuro... a você pai, que se deu por inteiro e renunciou seus sonhos para realizar os meus. Sou o que sou hoje à custa dos seus sacrifícios. Estas palavras são a expressão da minha gratidão e imenso amor.”

À minha irmã Joseane, ao meu cunhado Juliano e aos meus lindos sobrinhos Arthur e Gabriela,

Pelo imenso amor, alegria e apoio nas etapas da minha vida...

“Minha família, minha vida... jamais os deixarei sozinhos, pois estarão comigo... esteja onde estiver de vocês sempre lembrarei.”

Em especial, ao meu amor e companheiro Jivago,

Pelo imenso amor, paciência e respeito em todas as decisões da minha vida...

“O tempo de ausência, de isolamento nas intermináveis horas de estudo, de dedicação a um compromisso de luta pelo meu ideal, ausência que foi vivida e chorada ao longo desses anos. Você soube entender, compreender, às vezes, até com o coração apertado a atenção que não lhe foi dada devidamente, as datas que não pudemos comemorar, à distância por longos meses, sempre sacrificando minha ausência pelo compromisso do estudo. Hoje, no fim dessa caminhada, agradeço a você pela compreensão, respeito e pelo estímulo nas horas de desânimo. Muito obrigada, pois o mérito da vitória também é seu. Eu que te amo!”

AGRADECIMENTO

A Deus, que iluminou minha vida por meio de força, sabedoria e capacidade de discernimento. Cresci, e este crescimento gradativo aconteceu como fruto de Suas mãos.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela orientação, pela confiança depositada em mim, dando autonomia, apoio e incentivo para minha formação. Muito obrigada!

Ao meu chefinho Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela paciência e amizade, pela confiança e autonomia, me ensinou grandes lições como paciência e determinação. Xuxa, obrigada por toda confiança que depositou em mim, você é um exemplo que pretendo passar adiante, obrigada!

Ao Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann, por ser uma pessoa muito especial na minha carreira científica, aceitando-me em seu laboratório na Universidade de Ruhr, Alemanha, para a realização do meu estágio. *Vielen Danke!*

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., por abrir as portas do grupo de Polímeros, em especial a sala limpa, para a realização de parte do meu trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicidade: Valéria, Lilian, Iêda, Thalita, Verônica, Jaciara, Denise, Larissa, Monique, Laís, Letícia, Edson, Luís, Fabrício, Rodrigo, Wagner, Camilo, Léo, Juliano, Thiers, Thomas, Elias (hoje em Campinas) e Luana (hoje em São Paulo).

Aos amigos, professores e funcionários do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos – GMEME (IQSC-USP), do Grupo de Biofísica Molecular (IFSC-USP), do Grupo de Polímeros Bernhard Gross (IFSC-USP), do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UFSCar) e do grupo *Analytische Chemie - Elektroanalytik & Sensorik* (ELAN) de Bochum, Alemanha, que fizeram parte dessa caminhada, obrigada pelo companheirismo.

As amigas comadres Andressa Galli e Claudia Razzino, grandes amigas, pelo companheirismo, discussões analíticas e incentivo em todos os momentos, sejam felizes ou tristes sempre ali, prontas para escutar ou dizer alguma palavra.

Aos amigos Thatyane Nobre-Pavinatto e Felipe Pavinatto pela amizade, que com paciência e dedicação me ensinaram muito sobre filmes de Langmuir, principalmente modelos de membrana.

À Kelli Micocci, que com paciência me ensinou que as células também têm temperamento.

Aos amigos do ELAN: Justus, Sabine, Jorge e Raoudha pelas discussões científicas, e por todo o ensinamento e dedicação que tiveram por mim durante meu estágio na Alemanha.

Vielen Danke!

Ao IQSC-USP, IFSC-USP e Ruhr University, em Bochum, Alemanha, pelas facilidades e infraestrutura fornecidas.

À FAPESP pela bolsa de doutorado (processo 2008/00545-6) e ao DAAD pela bolsa de estágio no exterior.

À Biblioteca do IQSC e do IFSC, ao Serviço de Pós-Graduação do IQSC, em especial à Andrea e Silvia, pela competência e pronta ajuda sempre que necessário nas etapas decisivas do meu doutoramento.

A todos os funcionários do IQSC e do IFSC que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de certo modo contribuíram para que esses anos de doutorado fossem alegres e proveitosos. Obrigada!

“...espero que, nos corredores da vida, possa encontrar o mesmo carinho e respeito que aqui me foi dado... A vocês, meu carinho e gratidão!”

"Cada pessoa em sua existência pode ter duas atitudes:

Construir e Plantar.

Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param e ficam limitados por suas próprias paredes. A vida perde o sentido quando a construção acaba. Mas existem os que plantam. Estes, às vezes, sofrem com tempestades, com as estações e raramente descansam. Mas ao contrário de um edifício, o jardim jamais para de crescer e, ao mesmo tempo em que exige atenção do jardineiro, também permite que, para ele, a vida seja uma grande aventura. Os jardineiros sempre se reconhecerão entre si porque sabem que na história de cada planta está o crescimento de toda a Terra."

(Paulo Coelho)

RESUMO

Essa tese de doutoramento utiliza a auto-organização dos filmes finos *layer-by-layer* (LbL), auto-organização por alcanotióis mistas (SAM_{mix}) e monocamada de Langmuir no desenvolvimento de dispositivos e novas metodologias para aplicações em nanomedicina. Foram desenvolvidos e aplicados biossensores utilizando as técnicas de LbL e SAM. Dentre os biossensores construídos está o sensor para óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), que é de grande importância no sistema fisiológico. O sensor foi construído por meio da modificação de ultramicroeletrodos de fibra de carbono pela técnica LbL. A caracterização do sensor foi realizada por voltametrias e espectroscopias de impedância eletroquímica. Os resultados revelaram que a difusão de $NO^{\bullet}$ é dependente do número de bicamadas empregadas e da disposição das moléculas no filme. O sensor com arquitetura CF-(PAMAM/NiTsPc), fibra de carbono (CF), ftalocianina de níquel tetrasulfonada (NiTsPc) e dendrímero poliamidoamina (PAMAM), apresentou o melhor sinal analítico. Além disso, foi analisada a detecção de $NO^{\bullet}$ com interferentes como nitrito, nitrato, peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e a norepinefrina. Os resultados mostraram alta seletividade devido à utilização do dendrímero PAMAM. O segundo biossensor utilizou a enzima acetilcolinesterase imobilizada em monocamadas auto-organizadas mistas (SAM_{mix}) de alcanotióis. A detecção eletroquímica mostrou-se altamente sensível, uma vez que não há o uso do glutaraldeído como agente reticulante. Com essa plataforma foi possível desenvolver um biossensor de acetilcolina estável e robusto, sendo calculado o valor de $K_m^{app} = 0,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, limite de detecção $LD = 3,32 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação $LQ = 1,11 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, valores inferiores aos encontrados na literatura, ressaltando a eficiência da nova plataforma. Seguindo a mesma ideia de auto-organização, foram realizados estudos de nanotoxicidade utilizando modelos de membrana a partir de filmes de Langmuir. O principal objetivo foi elucidar a ação dos nanotubos de carbono (SWCNT), PAMAM e do nanocomplexo entre os dois materiais (SWCNT-PAMAM) nas membranas celulares, a nível molecular, usando um sistema modelo de membrana. A penetração de SWCNT e dos nanocomplexos em monocamadas lipídicas foi estudada utilizando microscopia de ângulo de Brewster (BAM) simultaneamente com cinética de absorção e pressão de superfície. Os resultados confirmaram a interação entre os nanomateriais e a membrana, indicando que a presença dos nanomateriais afeta o empacotamento dos lipídios. Foram realizados ainda estudos de citotoxicidade dos mesmos nanomateriais em sistemas celulares *in vitro*. Os resultados de citometria, proliferação celular, morfologia e inibição de adesão apresentaram-se evidenciaram que a combinação entre SWCNT e PAMAM, proporciona um maior índice de toxicidade em relação ao SWCNT, um comportamento diferente do que relatado nos componentes individuais. A toxicidade de nanocomplexos de SWCNT-PAMAM e de seus componentes individuais podem estar fortemente ligados ao tipo de material e como estes estão disponíveis no meio de cultura. Os estudos contidos nessa tese mostram a versatilidade dos filmes finos em sistemas auto-organizados e biomiméticos, e podem ser relevantes para o avanço de pesquisas sobre interação de nanomateriais e biosistemas.

ABSTRACT

In this thesis we employed the concept of self-organization, including the *layer-by-layer* (LbL) technique, alkanethiols self-assembled monolayers (SAM_{mix}) and Langmuir monolayers, to develop new methods for materials and devices manipulation for application in nanomedicine. Two different types of biosensors were developed. The first one was based on the LbL technique to detect nitric oxide (NO[•]), which is of great importance in the medicine. The second biosensor was based on SAM monolayers supporting acetylcholinesterase for pesticide monitoring. The NO[•] was constructed by modified carbon fiber (CF) assembled with nickel phthalocyanine tetrasulfonate (NiTsPc) and polyamidoamine dendrimer (PAMAM) in the form of ultramicroelectrodes (UMEs) by the LbL technique. The sensor was characterized using differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The results showed that NO[•] diffusion is dependent on the number of bilayers employed and the arrangement of molecules in the film. The sensor architecture with CF-(PAMAM/NiTsPc) presented the best analytical signal. In addition, we analyzed the detection of interfering with NO[•] as nitrite, nitrate, hydrogen peroxide, ascorbic acid, dopamine, epinephrine and norepinephrine. The results showed high selectivity due to the use of PAMAM dendrimer as selective layer. The second biosensor used the enzyme acetylcholinesterase immobilized on SAM_{mix}. The electrochemical detection of carbaryl was highly sensitive, since there is no use of glutaraldehyde as crosslinking agent. Using acetylcholine as a probe, K_m^{app} value was determined at $0.46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, with detection limit of $3.32 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ and quantification limit of $1.11 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, values lower than those found in the literature, highlighting the efficiency of the new platform. Langmuir films made of lipids were employed as cell membrane models, in order to investigate the interactions between single-wall carbon nanotubes (SWCNT), PAMAM and their nanocomplex (SWCNT-PAMAM) at the molecular level. The interaction of SWCNT and nanocomplexes in lipid monolayers was studied using Brewster angle microscopy (BAM) in conjunction with absorption kinetics and surface pressure. The results confirmed the interaction between nanomaterials and the membrane, indicating that the presence of nanomaterials affects the packing of the lipids. Cytotoxicity studies were also employed to investigate the interaction of nanomaterials in *in vitro* cell systems. The results of flow cytometry, cell proliferation, morphology and inhibition of adhesion revealed the toxicological aspects of the materials, demonstrating a higher toxicity to the nanocomplex, compared to SWCNT, differently of the individual components. The toxicity of SWCNT nanocomplex and its individual components can be related to the type of material and how these materials are available in the culture medium. The studies in this thesis show the versatility of self-assembly thin films on biomimetic systems and may be relevant to the advance of research on the interaction of nanomaterials and biosystems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de difusão de moléculas sinalizadoras como peróxido de hidrogênio, superóxido e óxido nítrico em uma membrana celular. Dependendo do microambiente local, as moléculas de sinalização podem executar várias reações químicas que resultam em uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) ^[6]. **27**

Figura 2.2. Ligação do NO[•] ao sítio ativo da molécula de metaloporfirina, (a) o cátion nitrosila, NO⁺ e (b) o ânion nitroxil, NO⁻ ^[15]. **32**

Figura 2.3. Esquema da construção do filme LbL com espécies aniônicas e catiônicas proposto por Decher e Hong ^[27]. **36**

Figura 2.4. Estruturas dos dendrímeros da geração zero (sem nenhuma ramificação além da estrutura original) para a geração dois (com duas ramificações além da estrutura original). A segunda geração é dividida em núcleo, interior e casca, como as setas indicam ^[31]. **38**

Figura 2.5. Extrator capilar: (a) posição do parafuso micrométrico capilar na bobina de aquecimento, (b) tubo de vácuo, (c) capilar, (d) bobina de aquecimento e (e) peso. **42**

Figura 2.6. Voltamograma cíclico do ultramicroeletrodo de fibra de carbono em 5 mmol L⁻¹ de cloreto de hexaaminrutênio III, [Ru(NH₃)₆Cl₃], em solução 0,1 mmol L⁻¹ de KCl. Velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. **43**

Figura 2.7. Microscopias dos UMEs fabricados para avaliação da junção vidro-fibra (A) e o diâmetro da fibra de carbono utilizado (B). **43**

Figura 2.8. Esquema da fabricação de filmes automontados pela técnica de LbL com dendrímero e ftalocianina de níquel tetrassulfonada em superfície de ultramicroeletrodo de fibra de carbono. **44**

Figura 2.9. Esquema da produção da solução saturada padrão de NO[•] a partir das soluções de NaNO₂ e H₂SO₄, utilizando sistema a vácuo e controle de temperatura. **46**

Figura 2.10. (A) Curva analítica de calibração de NO₂⁻, para o monitoramento de NO[•] pela reação de NO₂⁻ com o reagente Griess nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 10; 15; 20 e 25 μmol L⁻¹. (B) Regressão linear dos máximos de absorbância de NO₂⁻ por meio da técnica de Griess nas concentrações da curva analítica de calibração do gráfico A. **48**

Figura 2.11. Valores médios das concentrações de NO[•] após cada síntese utilizando o técnica colorimétrica com a reação de Griess. **49**

Figura 2.12. Esquema da ligação entre os grupos amina da molécula do dendrímero PAMAM com os grupos sulfônicos da molécula de ftalocianina de níquel tetrassulfonada. (*representação de 1/6 da estrutura da molécula de PAMAM). **51**

Figura 2.13. (A) Voltamogramas de pulso diferencial dos sensores de $\text{NO}^\bullet$ nas arquiteturas CF-PAMAM ($\square$), CF-NiTsPc ($\bullet$), CF-(NiTsPc/PAMAM) ($\triangle$) e CF-(PAMAM/NiTsPc) ($\circ$) na concentração de $\text{NO}^\bullet$ de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curvas analíticas de calibração para as quatro arquiteturas empregadas no gráfico A, nas concentrações 0, 16, 24, 32, 40, 48, 60, 80 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS pH 7,4 desoxigenada. **52**

Figura 2.14. Circuito equivalente proposto por Fleischmann e Pons para ultramicroeletrodos com superfície em formato de microdisco^[43]. **54**

Figura 2.15. Diagramas de Nyquist obtidos para o UME de fibra de carbono sem modificação ($\blacksquare$) e com as bicamadas ($\square$) PAMAM, ($\bullet$) NiTsPc, ($\triangle$) NiTsPc/PAMAM e ($\circ$) PAMAM/NiTsPc. Eletrólito composto por solução tampão desgaseificada (PBS pH 7,4) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$. Potencial de 0,80 V, faixa de frequência de 0,1 Hz a 10 kHz e 5 mV de amplitude de pulso. **56**

Figura 2.16. (A) Voltamogramas cíclicos do UME de fibra de carbono (a) com 5 (b), 10 (c), 15 (d) e 20 (e) bicamadas de CF-(PAMAM/NiTsPc)_n em solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ em KCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Resposta linear decrescente da corrente em função do número de bicamadas de PAMAM/NiTsPc na superfície do UME de fibra de carbono no potencial -0,296 V. **57**

Figura 2.17. (A) Diagramas de Nyquist e (B) voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o UME de fibra de carbono sem modificação e modificado com 1, 2 e 3 bicamadas de PAMAM/NiTsPc. Para EIE, foi utilizado potencial de 0,80 V e faixa de frequência de 0,1 Hz a 10 kHz, 5mV de amplitude de pulso. Para DPV, foi utilizada velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} ; amplitude de pulso: 25 mV; largura de pulso: 50 ms. Eletrólito composto por solução tampão desoxigenada (PBS pH 7,4) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$. **58**

Figura 2.18. (A) Curva analítica de calibração de $\text{NO}^\bullet$ com o sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) nas concentrações crescentes de 8, 16, 24, 32, 40, 48, 60 e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtida por DPV (velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} ; amplitude de pulso: 25 mV; largura de pulso: 50 ms). (B) Gráfico de Nyquist para a curva analítica de calibração de $\text{NO}^\bullet$ nas mesmas concentrações da curva analítica por DPV. **59**

Figura 2.19. Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) (A) e do UME (B) de $\text{NO}^\bullet$ ($\blacksquare$) na concentração $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença dos interferentes nitrito (NO_2^-) ($\square$), nitrato (NO_3^-) ($\circ$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($\blacktriangledown$) na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. **62**

Figura 2.20. Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) (A) e do UME (B) de $\text{NO}^\bullet$ na concentração $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença dos interferentes dopamina ($\blacksquare$), epinefrina ($\circ$), norepinefrina ($\square$) e ácido ascórbico ($\diamond$) na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. **63**

Figura 3.1. Esquema de transferência de elétrons em diferentes gerações de biossensores amperométricos: (a) primeira geração, mediadores redox naturais, (b) segunda geração, mediadores redox sintéticos; (c) terceira geração, transferência eletrônica direta^[5] (S= substrato enzimático, P= produto da reação enzimática e M= mediador de elétrons). **70**

Figura 3.2. (A) Estrutura cristalográfica da enzima Acetilcolinesterase tipo VI-S^[11,13]. (B) As linhas do campo (em amarelo) são originadas a partir da região de potencial negativo, no fundo do sítio ativo. Átomos em azul destacam a entrada do sítio ativo^[14]. **75**

Figura 3.3. Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ouro (■) sem modificação e modificado com as SAMs de: C₂OH (○), 11-AMU (Δ) nas concentrações 1,0 mmol L⁻¹ e a mistura 1,0 mmol L⁻¹ de 11-AMU + 0,12 mmol L⁻¹ de C₂OH (◇). Eletrólito composto por 4,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]⁴⁻ em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3, e velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. **82**

Figura 3.4. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de Au (■), Au/SAM_{mix} (○) e Au/SAM_{mix}/AChE (Δ) em solução de ATI 3,0 mmol L⁻¹. Eletrólito: PBS pH=6,5. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. **85**

Figura 3.5. (A) Voltamogramas cíclicos dos biossensores Au/SAM_{mix}/AChE, Au/C₂OH/AChE e Au/11AMU/AChE em ATI 3,0 mmol L⁻¹ em PBS pH=6,5. (B) Voltamogramas cíclicos da parte selecionada em (A) dos biossensores Au/SAM_{mix}/AChE, Au/C₂OH/AChE e Au/11AMU/AChE nas mesmas condições anteriores. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. **86**

Figura 3.6. Esquema da funcionalidade da SAM_{mix} na construção de um biossensor. **87**

Figura 3.7. Variação da corrente de oxidação da tiocolina obtida em função da concentração de ATI utilizando o eletrodo de Au/SAM_{mix}/AChE. A linha vermelha mostra o cálculo da constante de Michaelis-Menten e da corrente máxima da reação da enzima AChE por meio do ajuste não linear da corrente de oxidação da tiocolina em função da concentração de ATI para o biossensor de Au/SAM_{mix}/AChE. $K_M^{app} = 0,46 \text{ mmol L}^{-1}$ e $I_{m\acute{a}x} = 4,38 \text{ nA}$. Eletrólito: PBS pH=6,5. **88**

Figura 3.8. (A) Respostas amperométricas do biossensor Au/SAM_{mix}/AChE para diferentes concentrações de carbaril em PBS, pH = 6,5. Concentrações em ordem crescente (indicada pela seta) de carbaril: 0; 0,25; 0,75; 1,10; 1,2; 1,5 e 1,75 μmol L⁻¹. (B) Curva analítica da inibição da AChE frente o pesticida carbaril em concentrações de 0,25 a 1,75 μmol L⁻¹ em PBS pH = 6,5. O valor de corrente foi coletado com um tempo de 180 s, onde o processo de difusão das espécies é constante. **91**

Figura 4.1. Isoterma de π-A para o fosfolipídio DPPC com ilustrações da estrutura das moléculas nos diferentes estágios de compressão: gasoso, líquido-expandido (LE), líquido-condensado (LC) e sólido^[16]. **101**

Figura 4.2. Esquema da formação do nanocomplexo SWCNT com o dendrímero PAMAM de segunda geração. **106**

Figura 4.3. Foto de cuba de Langmuir utilizada nos experimentos de modelo de membrana da KSV Instruments Ltda. **107**

Figura 4.4. Foto da cuba de Langmuir com o microscópio no ângulo de Brewster (BAM) utilizado nos experimentos. **109**

Figura 4.5. Isotermas de pressão superficial pela área molecular de uma monocamada de DPPC e DPPC com os nanocomplexos. O DPPC foi espalhado sobre a solução dos nanocomplexos e a compressão foi realizada depois de por 40 minutos. Subfase: PBS, pH 7,4, $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração dos nanocomplexos foram de $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. As barreiras foram comprimidas a uma taxa de velocidade de 10 mm min^{-1} até o colapso da membrana. **114**

Figura 4.6. (A) Isotermas de pressão superficial para os nanocomplexos adsorvidos na subfase depois de 40 minutos. A concentração dos nanocomplexos de SWCNT e SWCNT-PAMAM G2 foram de $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, pH 7,4, $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. (B) Módulo de elasticidade dilatacional superficial (Cs^{-1}) para o fluido de membrana para SWCNT e SWCNT-PAMAM G2 em monocamada de DPPC com uma pressão de superfície inicial de 0 mN m^{-1} . **115**

Figura 4.7. Efeito dos nanocomplexos SWCNT e SWCNT-PAMAM sobre a pressão da superfície da monocamada de DPPC. Subfase: PBS, pH 7,4 e $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Concentração dos nanocomplexos: $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. **118**

Figura 4.8. Imagens de BAM de monocamada de Langmuir de DPPC em subfase de tampão PBS (pH 7,4). As imagens foram obtidas em diferentes pontos do filme sob compressão: (A) $0,5\text{ mN m}^{-1}$, (B) $6,5\text{ mN m}^{-1}$, (C) $10,6\text{ mN m}^{-1}$, e (D) 19 mN m^{-1} . Concentração de DPPC = $1 \times 10^{-3}\text{ mg mL}^{-1}$ e $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. A direção horizontal da imagem corresponde a 953 mm , e a direção vertical corresponde a 768 mm . **121**

Figura 4.9. Imagens de BAM da interação entre DPPC-SWCNT monocamada de Langmuir formada por um tampão PBS subfase (pH 7,4) contendo $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de SWCNT. Imagens foram tiradas em diferentes pontos do filme sob compressão: (A) 3 mN m^{-1} , (B) $7,1\text{ mN m}^{-1}$, (C) $9,7\text{ mN m}^{-1}$, (D) $10,4\text{ mN m}^{-1}$ e (E) 19 mN m^{-1} . $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. A direção horizontal da imagem corresponde a 953 mm , e a direção vertical corresponde a 768 mm . **122**

Figura 4.10. Esquema do modelo da membrana para o efeito de nanocomplexos de SWCNT PAMAM na pressão superficial da monocamada de DPPC. Dois tipos de interações podem ocorrer nesse sistema: (a) processo de adsorção por interação eletrostática e (b) incorporação através da membrana. **123**

Figura 5.1. Micrografia das células submetidas aos nanomateriais: (A) Controle – células C2C12; (B) SWCNT 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (C) SWCNT-PAMAM 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (D) PAMAM 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tempo de incubação 24 horas. **138**

Figura 5.2. Proliferação da linhagem celular C2C12 após incubação com nanotubos de carbono de parede simples - SWCNT, nanocomplexo – SWCNT-PAMAM e o dendrímero poliamidoamina de segunda geração PAMAM por 12, 24, 36 e 48 horas. Os valores com significância estatística foram atribuídos para $p < 0,05$, sendo os intervalos de confiança de *95%, **99% e ***99,9% (ANOVA one-way/Turkey). Quantidade de células distribuídas por poço 10^4 células. Concentração dos nanomateriais de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. **140**

Figura 5.3. Histogramas individuais representando o percentual de células controle C2C12 (A) fluorescentes obtidas após incubação de 24 horas dos nanomateriais (B) SWCNT, (C) SWCNT-PAMAM e (D) PAMAM na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de células fluorescentes como controle interno. **143**

Figura 5.4. Porcentagem de mioblastos aderidos a fibronectina após incubação com os nanomateriais: SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM. O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle. Os resultados foram expressos como média de três experimentos independentes em quadruplicata. Concentração dos nanomateriais de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores com significância estatística foram atribuídos para $p < 0,05$, sendo os intervalos de confiança de *95% (ANOVA one-way/Turkey). **145**

Figura 5.5. Teste de fragmentação de DNA das células C2C12 (A controle) tratadas com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de (B) SWCNT, (C) SWCNT-PAMAM e (D) PAMAM por 24 horas a 37 °C. Após a extração do DNA este foi analisado por gel de agarose. **147**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Valores de resistência de solução, R_s , capacitância, C e resistência de transferência de carga, R_{ct} , por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos modificados com os alcanotióis*. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 MHz. **83**

Tabela 3.2. Comparação dos biossensores de AChE aplicados à detecção de carbaril. **92**

Tabela 4.1. Valores de potencial zeta (ξ) e a estimativa média do tamanho do nanocomplexos de SWCNT e SWCNT-PAMAM em suspensão a 25 °C. **112**

Tabela 4.2. Variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) com os nanocomplexos em diferentes pressões: 10, 20 and 30 mN m⁻¹. Subfase: PBS, pH 7,4, T = 21 °C. Tempo de cinética: 40 minutos. **117**

Tabela 4.3. Elasticidade de superfície dinâmica para a superfície da gota de solução tampão (PBS, pH 7,4, T = 21 °C) com uma monocamada de DPPC, DPPC/SWCNT e com os nanocomplexos de DPPC/SWCNT-PAMAM. Pressão superficial: 30 mN m⁻¹. Frequência: 1,2 Hz. Amplitude: 0,1 mm. A concentração dos nanocomplexos corresponde aos valores da cuba (47 µg mL⁻¹). **119**

Tabela 5.1. Estatística dos valores obtidos pela citometria de fluxo. **144**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LbL - *layer-by-layer*

SAM_{mix} - Monocamadas auto-organizadas mistas de alcanotióis

PAMAM - Dendrímero poliamidoamina

SWCNT - Nanotubos de carbono de parede simples

BAM - Microscopia de ângulo de Brewster

NiTsPc - Ftalocianina de níquel tetrasulfonada

UME - Ultramicroeletrodos de fibra de carbono

NEp - Norepinefrina

DA - Dopamina

Ep - Epinefrina

AA - Ácido ascórbico

PBS - Solução tampão fosfato salino

DPV - Voltametria de pulso diferencial

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

R_u - Resistência do eletrólito

R_{ct} - Resistência de transferência de carga

C_{dl} - Capacitor referente a dupla camada

11-AMU - Ácido 11-mercaptoundecanóico

AChE - Enzima acetilcolinesterase

C₂OH - 2-mercaptoetanol

ATI - Iodeto de acetiltiocolina

LISTA DE ESTRUTURAS

Ftalocianina de níquel tetrassulfonada

Dopamina

Norepinefrina

Epinefrina

Ácido ascórbico

Iodeto de acetilcolina

Carbaril

Ácido 11-mercaptoundecanóico

2-mercaptoetanol

Dipalmitoilfosfatidilcolina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
Bibliografia	23
 CAPÍTULO I: Objetivos	 25
 CAPÍTULO II: SENSOR DE ÓXIDO NÍTRICO	 26
2.1 Revisão bibliográfica	26
2.1.1 Reatividade do NO [•] : um aliado à eletroquímica	30
2.1.2 A auto-organização pela técnica <i>layer-by-layer</i>	35
2.2 Parte Experimental	40
2.2.1 Reagentes e soluções	40
2.2.2 Fabricação do ultramicroeletrodo de fibra de carbono	41
2.2.3 Fabricação dos filmes LbL	44
2.2.4 Técnicas de caracterização	45
2.2.5 Solução padrão de NO [•]	46
2.2.6 Determinação da concentração de NO [•] por meio do teste de Griess	47
2.2.7 Detecção de NO [•]	49
2.2.8 Detecção dos interferentes	50
2.3 Resultados e Discussão	50
2.3.1 Estudo com interferentes	61
2.4 Conclusões Parciais	64
2.5 Bibliografia	65
 CAPÍTULO III: MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA MISTA PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR	 69
3.1 Revisão bibliográfica	69
3.2 Parte Experimental	76
3.2.1 Reagentes e Soluções	76
3.2.2 Medidas Eletroquímicas	77
3.2.3 Pré-tratamento do Eletrodo	77

3.2.4 Preparação das SAMs e SAMs mistas na superfície de ouro	78
3.2.5 Preparação do biossensor Au/SAM _{mix} /AChE	79
3.2.6 Determinação amperométrica do pesticida	79
3.3 Resultados e Discussão	81
3.3.1 Inibição da enzima AChE com o pesticida carbaril	90
3.4 Conclusões Parciais	93
3.5 Bibliografia	94

CAPÍTULO IV: MODELO DE MEMBRANA - ESTUDO DE NANOTOXICIDADE

4.1 Revisão bibliográfica	98
4.1 Parte Experimental	105
4.1.1 Reagentes e Soluções	105
4.1.2 Instrumentação e Metodologia	106
4.1.2.1 Formação das monocamadas de Langmuir	106
4.1.2.2 Efeito das nanopartículas nas isotermas de π -A	108
4.1.2.3 Medidas no BAM	108
4.1.2.4 Medidas de potencial zeta das nanopartículas	109
4.1.2.5 Medidas de tensão e elasticidade dilatacional superficial por meio da técnica da gota pendente	109
4.2 Resultados e Discussão	111
4.2.1 Estudos de monocamadas de Langmuir com COOH-SWCNT e seus nanocomplexos com o dendrímero PAMAM	111
4.2.2 Estudos da interação de monocamadas de Langmuir com nanomateriais por microscopia no ângulo de Brewster	120
4.3 Conclusões Parciais	124
4.4 Bibliografia	124

CAPÍTULO V - NANOTOXICIDADE *IN VITRO*

5.1 Revisão bibliográfica	129
5.1 Parte Experimental	132
5.1.1 Reagentes e soluções	132
5.1.2 Cultura celular	133

5.1.3 Nanomateriais para ensaio de toxicidade	133
5.1.4 Ensaio de proliferação – Cristal Violeta	133
5.1.5 Ensaio de inibição de adesão	134
5.1.6 Ensaio de fragmentação de DNA	135
5.1.7 Eletroforese em gel de agarose	135
5.1.8 Protocolo FITC Annexin V	136
5.2 Resultados e Discussão	137
5.2.1 Estudo da interação de nanomateriais com cultura de células	137
5.2.2 Efeito sobre a morfologia das células	138
5.2.3. Viabilidade celular	139
5.2.4 Citometria de fluxo	141
5.2.5 Medidas de inibição de adesão	144
5.2.6 Fragmentação do DNA	146
5.3 Conclusões Parciais	148
5.4 Bibliografia	149
 CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	 151
 CAPÍTULO VII – PERSPECTIVAS	 153

O conceito de nanociência foi empregado pela primeira vez pelo físico Richard P. Feynman em 1959, em uma apresentação para a American Physical Society. Após 15 anos, o pesquisador japonês Norio Taniguchi implementava um novo termo ao universo científico, a nanotecnologia ^[1]. Desde então, os estudos relacionados ao mundo nanométrico tornavam-se objeto de interesse da comunidade científica. De acordo com a definição da Royal Society e da Royal Academy of Engineering do Reino Unido, *Nanociência* é o estudo do fenômeno e da manipulação de materiais na escala atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente dos materiais de grande escala. Enquanto isso, *Nanotecnologia* é definida como o modelo, caracterização, produção e aplicação de estruturas, através do controle de formato e tamanho de moléculas em escala nanométrica ^[2].

A nanotecnologia vem recebendo significativos investimentos de diversos setores nos últimos 10 anos, além da criação de programas governamentais para acelerar o crescimento e conhecimento desse novo universo. Nos EUA, por exemplo, o programa federal National Nanotechnology Initiative (NNI) coordena os esforços de agências na ciência, engenharia e tecnologia em nanoescala. O investimento anual desse programa fica em torno de 2 bilhões de dólares ^[3]. No Brasil, os investimentos em nanotecnologia são recentes. As agências de fomento do governo federal, CAPES e CNPq, aliadas às agências de fomento estaduais como Fapesp (São Paulo), Fapemig (Minas Gerais), Fapergs (Rio Grande do Sul), entre outras, investem cerca de 180 milhões de reais ^[4] em incentivos às pesquisas nessa área, ainda pouco se comparado aos grandes benefícios que essa ciência pode trazer ao país.

Há séculos, pesquisadores tentam desenvolver tratamentos eficazes para doenças e ferimentos. Hoje, grande parte da comunidade científica acredita que a nanotecnologia pode

ser o grande passo rumo a esse objetivo. Hoje parte do investimento em nanotecnologia destina-se aos estudos da nanotecnologia aplicada à medicina, o emergente campo da *nanomedicina* ^[5-7]. Cientistas ao redor do mundo estão pesquisando meios de explorar a nanotecnologia para melhorar a saúde humana. A principal diferença entre a nanomedicina e a medicina tradicional serão as ferramentas utilizadas. Por exemplo, a principal dessas ferramentas serão as nanopartículas multifuncionais, que irão permitir um tratamento orientado/pontual e individual em órgãos, ossos e diferentes tecidos, desde o diagnóstico à terapia, tratando célula a célula com base na precisa dosagem e monitoramento através do uso de sensores e biossensores ^[5]. No entanto, há preocupações toxicológicas como a real interação entre sistemas biológicos e nanomateriais, e questões éticas como o descarte apropriado desses nanomaterias, que surgem com a nanomedicina, e elas devem ser consideradas juntamente com os benefícios que essa ciência traz para a sociedade ^[2,5-8].

A nanotecnologia fornece as ferramentas necessárias para o desenvolvimento e aplicação de diferentes sistemas, como a obtenção de transistores e sensores, e a terapia, no caso de medicina regenerativa ^[9]. Compreender os sistemas biológicos é fundamental no campo da nanomedicina. Um dos aspectos importantes é a presença de estruturas organizadas, em vários níveis, desde o molecular até as membranas, organelas e células, que possibilitam o encadeamento e o confinamento dos processos químicos em compartimentos. Na ausência dessa organização, as biomoléculas dissolvidas ou dispersas em meio aquoso passariam a atuar de forma desordenada, através das colisões promovidas pela energia térmica, comprometendo não só a eficiência, como levando a interferências mútuas de todos os tipos ^[10,11]. Entre as biomoléculas organizadas, as enzimas atuam incessantemente no processo de construção molecular, “montando e desmontando” o complexo enzima-substrato o tempo todo, seguindo a dinâmica da vida. O DNA, através do código genético, constitui um banco pré-programado de dados moleculares ^[12].

A viabilidade desta abordagem depende das interações moleculares e do próprio reconhecimento molecular, que são capazes de direcionar uma montagem seletiva e espontânea de modelos biomiméticos ^[13]. Para que a auto-organização tenha sucesso, duas questões fundamentais devem ser levadas em consideração: a primeira refere-se a qual função irá agir como uma interação ou ligação eficaz para essa organização, e a segunda, como as características de reconhecimento molecular irão facilitar o processo de auto-organização. Estudos revelam que a interação ou ligação utilizada para segurar essa auto-organização são forças não-covalentes, como interações iônicas (íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo), ligações de hidrogênio, empilhamento π - π , forças de dispersão, ligações de coordenação e o efeito hidrofóbico ^[14]. A combinação entre essas forças e outras interações aumenta a seletividade, estabilidade e a adaptação das biomoléculas na organização de dispositivos ^[15].

Nessa tese de doutoramento discutiremos o papel da auto-organização nos estudos em nanomedicina. Dentre as técnicas de auto-organização foram escolhidas a: *layer-by-layer* (LbL), monocamadas auto-organizadas mistas de alcanotióis (SAM) e filmes de Langmuir. O capítulo 2 aborda a auto-organização por meio da técnica LbL no desenvolvimento de sensor para óxido nítrico (NO[•]), desenvolvido durante o período de estágio sanduíche junto ao grupo de *Analytische Chemie - Elektroanalytik & Sensorik*, do prof. Dr. Wolfgang Schuhmann, na Ruhr University, em Bochum, Alemanha. A molécula de NO[•] foi escolhida como principal analito pela grande importância no sistema fisiológico.

O capítulo 3 aborda o desenvolvimento de um biossensor de acetilcolinesterase baseado em monocamadas auto-organizadas mistas (SAM_{mix}) de alcanotióis para promover uma detecção eletroquímica rápida. Seguindo a mesma ideia de auto-organização, o capítulo 4 discute a importância de estudos de nanotoxicidade utilizando modelos de membrana a partir de filmes de Langmuir. O capítulo 5 mostra estudos de nanotoxicidade em sistemas celulares

utilizando técnicas específicas de biologia molecular. Por fim, os capítulos 6 e 7 evidenciam as conclusões desses estudos e as perspectivas para esse novo ramo da ciência.

BIBLIOGRAFIA

[1] BERGER, M. Nano-Society: pushing the boundaries of technology. In: O'BRIEN, P.; CRAIGHEAD, H. G.; KROTO, H. (Ed.). **RSC Nanoscience and Nanotechnology**. London: Royal Society of Chemistry, 2009. v. 8, p. 332.

[2] THE ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING REPORT. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. Londres: Royal Society and Royal Academy of Engineering Press, 2004. 116 p.

[3] INICIATIVA Nacional em Nanotecnologia dos EUA. Disponível em: <<http://www.nano.gov/initiatives/funding-opportunities>>. Acesso em: 16 jul. 2011.

[4] BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia no Brasil. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em: 16 jul. 2011.

[5] MAYNARD, A.D.; WARHEIT, D.B.; PHILBERT, M.A. The new toxicology of sophisticated materials: Nanotoxicology and beyond. **Toxicological Sciences**, v. 120, p. S109-S129, 2011.

[6] BLANCO, E.; HSIAO, A.; MANN, A.P.; LANDRY, M.G.; MERIC-BERNSTAM, F.; FERRARI, M. Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects. **Cancer Science**, v. 102, p. 1247-1252, 2011.

[7] WANG, J.; BYRNE, J.D.; NAPIER, M.E.; DESIMONE, J.M. More effective nanomedicines through particle design. **Small**, v. 7, p. 1919-1931, 2011.

[8] BOULAIZ, H.; ALVAREZ, P.J.; RAMIREZ, A.; MARCHAL, J.A.; PRADOS, J.; RODRÍGUEZ-SERRANO, F.; PERÁN, M.; MELGUIZO, C.; ARANEGA, A. Nanomedicine: application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3303-3321, 2011.

[9] HESTER, R.E.; HARRISON, R.M. Nanotechnology consequences for human health and the environment. In: **Issues in environmental science and technology**. London: Royal Society of Chemistry, 2007. v. 24, p. 134.

[10] TOMA, H.E. **O mundo nanométrico**: a dimensão do novo século. São Paulo: Oficina de textos, 2004. p 102.

[11] PELESKO, J.A. **Self assembly**: the science of things that put themselves together. London: Taylor & Francis Group, 2007. p. 307.

[12] FREEDMAN, D.H. Exploiting the nanotechnology of life. **Science**, v. 254, p. 1308-1310, 1995.

[13] WHITESIDES, G.M.; MATHIAS, J.P.; SETO, C.T. Molecular self-assembly and nanochemistry: A chemical strategy for the synthesis of nanostructures, **Science**, v. 254 n. 5036, p. 1312-1319, 1991.

[14] WHITESIDES, G.M.; GRZYBOWSKI, B. Self-assembly at all scales, **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2418-2421, 2002.

[15] SHENHAR, R.; NORSTEN, T.B.; ROTELLO, V.M. 2. Self-assembly and Self-organization, p 41-72. In: DI VENTRA, M.; EVOY, S.; HEFLIN, J.R. (Ed.). **Introduction to nanoscale science and technology**. New York: Springer, 2004. p. 611.

Os principais objetivos desse trabalho foram:

1. **Desenvolvimento de ultramicroeletrodos modificados incorporando nanomateriais para detecção de óxido nítrico:** desenvolver e caracterizar um ultramicroeletrodo de fibra de carbono modificado com ftalocianina e dendrímero poliamidoamina (PAMAM) por meio da técnica de automontagem *layer-by-layer* para aplicação como sensor para óxido nítrico.
2. **Aplicação de monocamadas auto-organizadas mistas como nova plataforma para biossensores a fim de aumentar a seletividade:** aplicar uma nova plataforma para biossensores, onde os alcanotióis de cadeia carbônica maior promovem suporte para a enzima, enquanto os alcanotióis de cadeia carbônica menor auxiliam na transferência eletrônica através das ilhas de alcanotióis formadas na superfície do eletrodo de ouro.
3. **Aplicação de modelos de membrana por meio de filmes de Langmuir para o estudo de nanotoxicidade de nanomateriais:** aplicação de modelos de membrana utilizando fosfolipídeos para estudo de nanotoxicidade de nanotubos de carbono, complexados ou não com dendrímeros PAMAM.
4. **Estudo de nanotoxicidade em cultura celular:** utilização de métodos da biologia molecular para estudar a interação de nanotubos de carbono com dendrímeros junto a células da linhagem C2C12.

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1980, descobertas surpreendentes revelavam as funções do óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) como mensageiro fisiológico e citotóxico. Em 1992, a revista *Science* nomeou o $\text{NO}^\bullet$ como a "Molécula do Ano", logo em seguida foi fundada a *Nitric Oxide Society* e criada uma revista científica para estudos relacionados à essa molécula ^[1-2]. Os pesquisadores Ferid Murad, Robert F. Furchgott e Louis Ignarro foram premiados com o Nobel de Fisiologia e Medicina em 1998 pela descoberta das propriedades sinalizadoras do óxido nítrico ^[1-4]. Hoje, vários grupos de pesquisa estão trabalhando para desenvolver um sistema que auxilie na compreensão de como os radicais livres do $\text{NO}^\bullet$ são sintetizados, como ocorre seu mecanismo de difusão e como são as reações com os sistemas biológicos. Estima-se que cerca de 3.000 artigos científicos de diferentes áreas são publicados por ano sobre o papel fisiológico do óxido nítrico ^[1-8].

O $\text{NO}^\bullet$ é classificado como uma das espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS). Entre os seus representantes encontramos os superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peroxinitrito, que são consideradas moléculas de sinalização. Um esquema da difusão das RNS e ROS é apresentado na figura 2.1. O $\text{NO}^\bullet$ recebe destaque porque está envolvido em vários processos fisiológicos importantes como a regulação do tônus vascular, neurotransmissão, degeneração neural, vasodilatação, hipertensão pulmonar, inflamação, resposta imunológica, entre outros ^[2-3]. Além disso, diversas patologias são associadas à disfunção na produção endógena de $\text{NO}^\bullet$ ^[4], por exemplo, alterações nas concentrações de $\text{NO}^\bullet$ tem sido associada à doenças como: hipertensão, hiperglicemia, doença de

arteriosclerose, mal de Parkinson, lesões de Alzheimer e câncer ^[1,5]. Dentre as funções relatadas para o NO[•], pode-se mencionar sua intervenção como mediador em atividades antimicrobianas e neurotransmissor, além do seu papel na comunicação neural e no sistema nervoso periférico ^[5].

Figura 2.1. Esquema de difusão de moléculas sinalizadoras como peróxido de hidrogênio, superóxido e óxido nítrico em uma membrana celular. Dependendo do microambiente local, as moléculas de sinalização podem executar várias reações químicas que resultam em uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) ^[6].

Na presença de dois cofatores, o oxigênio e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), a enzima óxido nítrico sintase (NOS) sintetiza o NO[•] e a L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina. Nessa reação, um nitrogênio guanidino da L-arginina é transformado em NO[•] ^[7,8]. A enzima NOS existe em três isoformas codificadas por genes distintos. Todas as isoformas da NOS catalisam a conversão da L-arginina em citrulina e NO[•]. O endotélio usa o NO[•] para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso fazendo com que esse dilate, aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial ^[7-9]. Isso explica o uso de compostos como a nitroglicerina e o nitrito de amila no

tratamento de doenças coronárias. Além disso, o NO[•] produzido pelo endotélio tem ação antitrombótica ^[9].

Sabe-se que a quantificação do NO[•] em sistemas biológicos ou modelos é muito difícil por causa da baixa concentração e do baixo tempo de existência. O NO[•] pode difundir (por exemplo, através de uma membrana celular) distâncias relativamente longas, em concentrações variando de 150 a 300 µmol L⁻¹ com meia-vida biológica de 4 a 15 segundos ^[4]. O mecanismo de difusão do NO[•] depende da sua reatividade, coeficiente de difusão e principalmente do microambiente local. Existe um arsenal de técnicas disponíveis para a detecção do NO[•]. A espectroscopia de ressonância eletrônica de spin ou ressonância eletrônica paramagnética – EPR ^[10,11] é uma delas. Pesquisadores utilizam EPR para estudar as interações estruturais do NO[•] com os metais das proteínas heme e não-heme desde 1960. Neste caso, o NO[•] faz uma ligação forte com o ferro para formar o complexo de ferro-nitrosila ^[10]. Alguns exemplos desses complexos incluem nitrohemoglobina (HbNO) e o nitromioglobina (MbNO). Todos os complexos formados exibem espectros de EPR distintos em baixas temperaturas. De maneira geral, a técnica de EPR pode fornecer sensibilidade e especificidade na detecção de NO[•], mas não pode ser usada para monitoramento *in vivo* de NO[•] ^[10,11]. Além disso, é um método caro, a preparação da amostra é demorada, necessita de atmosfera isenta de oxigênio, além das interferências com oxidantes.

Outra técnica é a detecção óptica através da reação com corantes ou moléculas ^[10,11]. Por exemplo, o NO[•] pode ser determinado por medidas espectrofotométricas por meio de sua reação com a oxihemoglobina (HbO₂) onde são produzidos metemoglobina e nitrato. A formação de metemoglobina pode ser monitorada pela medida do aumento da absorbância em 401 nm. Esse método é apropriado para medidas *in vitro* em amostras biológicas ^[10,11]. Suas desvantagens são relacionadas à seletividade e à especificidade dos componentes químicos que muitas vezes são insuficientes. As medidas colorimétricas indiretas dos íons nitrito e

nitrito com o Reagente de Griess também são uma alternativa ^[6,10,11]. O reagente de Griess que consiste de sulfanilamida e N-dicloridrato de etilenodiamina ^[6,10,11] é adicionado ao NO[•]. A mistura ácida promove a formação de um azo corante com absorção máxima no comprimento de onda 540 nm. Esse método é conveniente para medir o nitrito em concentrações na ordem de micromolar. Os métodos espectrofotométricos para a determinação do NO[•] são realizados por instrumentação comum e procedimentos bem estabelecidos. Estes métodos são reprodutíveis, porém oferecem um baixo limite de detecção variando de 0,1 a 1 mmol L⁻¹ de NO[•] ^[10,11].

O desafio de quantificar *in situ* concentrações muito pequenas de NO[•] (na faixa de concentração de nanomolares), fez com que a eletroquímica ampliasse seus conhecimentos nessa área de pesquisa por meio dos microssensores ^[5-7]. Um dos desafios no desenvolvimento de microssensores é a necessidade de ter ferramentas simples, sensíveis, seletivas, de fácil manuseio e que ofereçam um tempo de resposta rápido e uma boa estabilidade ^[5,6,10]. Hoje, sabe-se que os métodos eletroquímicos podem ajudar na determinação de NO[•] em amostras biológicas, devido ao tamanho dos eletrodos, das propriedades não destrutivas, sensibilidade, simplicidade e principalmente baixo custo. O avanço no desenvolvimento de ultramicrossensores de alta sofisticação e com pequenas dimensões, estimula a aplicação da eletroquímica na determinação direta do NO[•], promovendo a ascensão da bioeletroquímica ^[5,6].

O primeiro sensor eletroquímico de NO[•] foi publicado por Shibuki em 1989, com base na oxidação direta do NO[•] sobre um eletrodo de platina ^[12], usando um eletrodo do tipo Clark em miniatura. O eletrodo foi construído por meio da introdução de um fio de platina dentro de uma micropipeta de vidro selado com uma membrana de gás permeável, preenchida com uma solução aquosa de 30 mmol L⁻¹ NaCl e 0,3 mmol L⁻¹ HCl (pH 3,5). As medidas amperométricas em +0,9 V vs Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ mostraram uma relação linear entre a

medida de oxidação e a concentração do $\text{NO}^\bullet$ *in vitro* entre 1,0 a 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Embora o sensor oferecesse um limite de detecção de 10 nmol L^{-1} , ele atendia uma faixa de concentração muito estreita, além da não reprodutibilidade, saturação da membrana e fragilidade.

Desde então diversos grupos eletroquímicos vem desenvolvendo novas alternativas de sensores de $\text{NO}^\bullet$ para atender necessidades como sensibilidade e seletividade. Sabe-se que a modificação da superfície do eletrodo é necessária para tornar o sensor mais seletivo para a detecção do $\text{NO}^\bullet$. Sabendo disso, a modificação da superfície do sensor utilizando camadas auto-organizadas é muito atraente e pode oferecer uma nova estratégia para essa detecção. A modificação química da superfície do eletrodo com polieletrólitos e complexos metálicos-filmes poliméricos ampliou a aplicação desses novos sensores e as opções para sua utilização em diferentes condições experimentais. Além das aplicações eletrocatalíticas ^[13], tais eletrodos são uma grande promessa para eletroanalítica ^[13]. Na verdade, eletroanalítica com eletrodos revestidos com polímeros pode beneficiar as propriedades catalíticas e de transporte de carga ^[14]. Um aumento na seletividade, sensibilidade, versatilidade e reprodutibilidade pode ser alcançado com as camadas auto-organizadas. Mas antes de planejar o desenvolvimento de um sensor para $\text{NO}^\bullet$ é necessário saber algumas características físico-químicas da molécula.

2.1.1 Reatividade do $\text{NO}^\bullet$: um aliado à eletroquímica

Em condições normais de temperatura e pressão o $\text{NO}^\bullet$ é um gás incolor, de massa molecular 30,01 g mol^{-1} e uma densidade de $1,3 \times 10^3 \text{ kg m}^{-3}$. Com ponto de fusão de $-163,6^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição de $-151,7^\circ\text{C}$. A solubilidade do $\text{NO}^\bullet$ é de 1,9 mM em solução aquosa a 1 atm de pressão e 25°C . É uma molécula paramagnética, de estrutura molecular linear e

altamente tóxica. De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, a ordem de ligação é de 2,5 $\text{\AA}$, condizente com o comprimento de ligação entre o N (1,06 $\text{\AA}$) e O (1,18 $\text{\AA}$). O orbital molecular ocupado é um orbital antiligante π^* , sendo assim um radical estável ^[15].

O $\text{NO}^\bullet$ reage com O_2 na fase gasosa para formar dióxido de nitrogênio (NO_2) como produto final (equação 1). Sua reação com o O_2 em solução aquosa é um processo biológico muito importante que controla sua difusão no ambiente fisiológico aeróbico ^[16]. Após a formação de NO_2 , ocorre uma rápida hidrólise seguida da produção de nitrito (equação 2).

O óxido nítrico possui uma boa reatividade com centros metálicos. Essa reatividade é essencial para entender o comportamento biorregulatório do $\text{NO}^\bullet$, e o metal pode servir como um agente de sinalização. A reação do $\text{NO}^\bullet$ com alguns complexos de metais de transição resulta na formação de nitrosilos complexos. Por exemplo, o $\text{NO}^\bullet$ pode reagir com o íon ferroso para formar o complexo ferro-nitrosila. Quando ocorre a formação do complexo NO-metal, o comportamento do ligante $\text{NO}^\bullet$ varia de um cátion nitrosila (NO^+) para um ânion nitrosila (NO^-). Consequentemente, o ângulo de ligação do NO-metal passa de aproximadamente 180° , para um ângulo de ligação próximo a 120° ^[15]. A figura 2.2 ilustra os dois modos da ligação do $\text{NO}^\bullet$ com um centro metálico, por exemplo, de uma metaloporfirina.

Figura 2.2. Ligação do $\text{NO}^\bullet$ ao sítio ativo da molécula de metaloporfirina, (a) o cátion nitrosil, NO^+ e (b) o ânion nitroxil, NO^- [15].

Durante a oxidação do $\text{NO}^\bullet$ na molécula de metaloporfirina, uma certa quantidade de carga é transferida da molécula de $\text{NO}^\bullet$ para o centro do metal (figura 2.2A), enquanto que, durante a redução (figura 2.2B), a transferência de carga é na direção oposta. A descrição da interação metal-NO foi relatada há vários anos por Enemark e Feltham [17], quando a fórmula $[\text{MNO}]^n$ foi proposta. Nesse caso, n é a soma dos elétrons d do metal e os elétrons π^* do nitrosil. Segundo esse estudo, o ângulo M-N-O foi previsto para ser linear quando $n \leq 6$ e angular quando $n > 6$. Muitos centros metálicos reagem com o $\text{NO}^\bullet$ para formar complexos. Nesse caso é importante observar que a capacidade de formar um complexo estável de $\text{NO}^\bullet$ depende muitas vezes do estado de oxidação do centro metálico [6,15,17]. Esses estudos de sítios de ligação são de grande valia para o desenvolvimento de técnicas eletroquímicas utilizando metaloporfirinas ou ftalocianinas para sensores de $\text{NO}^\bullet$ [15-18].

Malinski e Taha foram os primeiros a desenvolver e aplicar em ambiente biológico um sensor utilizando porfirinas [18]. O sensor era composto de fibra de carbono modificado pela eletrodeposição de porfirina de níquel (II) tetraquis (3-metoxi-4-hidroxifenil) - (NiTMHPhP). Essa modificação visava eletrocatalisar a oxidação do $\text{NO}^\bullet$ para diminuir seu potencial de oxidação e melhorar a oxidação dos sensores da época. O eletrodo eletropolimerizado foi revestido com um filme de Nafion® para melhorar a seletividade contra os interferentes nitrito e nitrato. Durante a oxidação do $\text{NO}^\bullet$ a NO^+ , um elétron é perdido para o eletrodo, o

que causa um aumento na corrente de oxidação e, conseqüentemente, um sinal eletroquímico próximo a 0,8 V vs SCE (equação 3). Em seguida, ocorre a etapa de formação de HNO₂, que é favorecida quando as concentrações de prótons são altas (equação 4). A reação global que acontece no eletrodo é descrita pela equação 5, que leva a oxidação anódica do NO[•] em tampão de fosfato.

Desde então, diversos trabalhos demonstram a aplicabilidade de eletrodos modificados com metaloporfirinas e ftalocianinas na detecção de NO[•] [14,15,18,19]. Isik e Schuhmann [19] desenvolveram um sensor de NO[•] altamente sensível e seletivo utilizando um microeletrodo de fibra de carbono revestido com platina. O revestimento com platina aumentou significativamente a área de superfície do microeletrodo no formato disco, um pré-requisito para uma maior sensibilidade. Em seguida, uma camada de ftalocianina de níquel tetrassulfonada foi polimerizada na superfície do microeletrodo por meio da voltametria cíclica entre os potenciais de 0 a 1,2 V. Uma membrana de Nafion[®] seletiva foi adsorvida sobre o filme de ftalocianina para melhorar a seletividade do sensor. O Nafion[®] repele interferentes de carga negativa como o NO₂⁻ e, simultaneamente, estabiliza compostos carregados positivamente, tais como NO⁺ (o primeiro produto de oxidação do NO[•]). Para avaliar o sensor os pesquisadores utilizaram as técnicas de voltametria de pulso diferencial e microscopia eletroquímica, SECM. Os valores de corrente das medidas *in situ* de uma única célula variaram entre 5,7 e 13,9 pA, enquanto a concentração de NO[•] variou entre 1,4 fmol e 10 fmol [19].

Há um grande interesse no desenvolvimento de sensores de $\text{NO}^\bullet$ capazes de quantificar diretamente a liberação do $\text{NO}^\bullet$ em diferentes tecidos. No entanto, apesar da facilidade e confiabilidade para a detecção eletroquímica direta do $\text{NO}^\bullet$, a sua quantificação em muitos sistemas biológicos ainda é um desafio ^[6]. Uma provável causa para isso é a reatividade cruzada de alguns eletrodos com componentes biológicos ativos da amostra ^[20]. Apesar das técnicas eletroquímicas beneficiarem a simplicidade ^[21,22], tempo de resposta, medidas em tempo real e excelente sensibilidade, em alguns casos sua seletividade ainda é insatisfatória ^[6,11,14]. Além disso, a seletividade de muitos sensores descritos na literatura seria insuficiente para discriminar níveis muito baixos de $\text{NO}^\bullet$ e interferentes típicos sob reais condições fisiológicas ^[6,11,14].

A especificidade do sensor para detecção do $\text{NO}^\bullet$ deve-se ao potencial em que é oxidado ^[6,14]. Outras espécies biológicas e químicas, por exemplo, nitrito, nitrato, dopamina e peróxido de hidrogênio, também são oxidados em potenciais semelhantes. A fim de reduzir essa interferência, os eletrodos são frequentemente revestidos com membranas seletivas, como Nafion[®], o que reduz interferências de substâncias catiônicas devido à interceptação eletrostática, além de atuar como uma membrana impermeável contra interferentes carregados negativamente ^[4,23]. Groppe e colaboradores ^[20] desenvolveram um eletrodo de platina modificado com porfirina de níquel por meio de polimerização eletroquímica. O estudo comparou a eficácia do Nafion[®], fenol, eugenol e do ácido 3-hidroxifenilacético contra interferentes. Eletroquimicamente polimerizado, o eugenol mostrou ser o mais adequado para a proteção contra interferências. A sensibilidade também foi melhor quando fenóis polimerizados ou eugenol foram usados para proteger as camadas. No entanto, a seletividade na concentração estudada não é suficiente para o bloqueio da dopamina, que deu um sinal particularmente elevado em comparação aos outros interferentes testados. É importante

menção que a membrana de Nafion[®] não apresentou proteção significativa contra a oxidação direta de dopamina em comparação com o eugenol^[20].

As alterações morfológicas na camada de detecção podem influenciar fortemente no desempenho do sensor. Assim, a fabricação de filmes nanoestruturados na forma de camadas sobre a superfície de um eletrodo pode ser uma estratégia prática para aumentar a sua sensibilidade e seletividade através da disponibilização de mais sítios ativos na superfície. Neste trabalho de doutoramento, o dendrímero poliamidoamina (PAMAM) foi utilizado para essa finalidade, o que permitiu um melhor desempenho decorrente da utilização de nanomateriais. Devido à sua estrutura organizada, facilidade de modificação e comportamento de adsorção forte para uma variedade de substratos, o dendrímero PAMAM pode ser utilizado para produzir camadas de filme. Além disso, o tamanho molecular uniforme do dendrímero permite sua utilização em filmes finos organizados^[24]. A seletividade analítica dos sensores de NO[•] é determinada principalmente pela permeabilidade seletiva e espessura do filme. No entanto, isto é uma vantagem e uma desvantagem, pois ao mesmo tempo em que o aumento da camada do dendrímero tende a aumentar a seletividade de NO[•], ele pode prejudicar o tempo de resposta e a sensibilidade do NO[•] em fluidos biológicos^[25].

Para que as características dos filmes automontados não sejam uma desvantagem, vamos discutir a seguir as características da técnica de *layer-by-layer* (LbL) e os nanomateriais utilizados nessa tese.

2.1.2 A auto-organização pela técnica *layer-by-layer*

O primeiro trabalho a utilizar a técnica de automontagem (LbL, do inglês *layer-by-layer*), foi relatado em 1966 por Iler, que descreve a fabricação de multicamadas, alternando a deposição de partículas coloidais positiva e negativamente carregadas^[26]. Porém, esse

importante trabalho não teve repercussão, até que Decher e colaboradores redescobriram e apresentaram de maneira clara a técnica, como ilustrado na figura 2.3.

Como descrito por Decher e colaboradores, a construção dos filmes automontados pela técnica LbL é feita por meio de etapas.

Figura 2.3. Esquema da construção do filme LbL com espécies aniônicas e catiônicas proposto por Decher e Hong ^[27].

Na etapa I, um substrato com superfície de carga positiva é imerso em uma solução de moléculas de carga negativa. Ocorre a adsorção de uma monocamada com carga negativa à superfície do substrato. Em seguida, o substrato com a primeira camada é lavado em água com mesmo pH para remover as moléculas fracamente adsorvidas. Na etapa II, o substrato é novamente imerso em uma solução contendo um polieletrólito com carga positiva, o que resulta na formação de uma segunda camada, mas agora de carga superficial positiva. Após uma nova lavagem com água o processo pode ser repetido inúmeras vezes até a produção de várias camadas ^[28].

A técnica LbL demonstra vantagens sobre outros métodos na fabricação de filmes com multicamadas, principalmente devido as interações eletrostáticas serem a principal força na construção das camadas ^[29]. A primeira vantagem está relacionada ao método simples e de

fácil manipulação, isto é, não necessita de instrumentações elaboradas. Outra vantagem é a versatilidade do método: dependendo das características das moléculas utilizadas, o método permite diferentes interações moleculares, além das interações eletrostáticas. O método também possibilita a incorporação de diferentes materiais junto às camadas, como as nanopartículas, de tal forma que a arquitetura do filme seja controlada pelas estruturas e propriedades de cada molécula do sistema ^[25,29]. Mais uma vantagem do método, que é de grande importância no desenvolvimento de sensores para NO[•], é que a deposição dos filmes independe do tamanho ou formato do substrato ^[26]. Isso significa que a técnica LbL pode ser realizada não apenas em substratos planos, mas também em substratos com diferentes formas e tamanhos, como eletrodos ou ultramicroeletrodos de fibra de carbono ^[25-29].

Muitos são os nanomateriais utilizados para a construção de filmes LbL, entre eles as moléculas de ftalocianinas e porfirinas ^[6,9,14,18-23], como descrito anteriormente, e também os dendrímeros ^[24]. Dendrímeros são macromoléculas com arquitetura altamente ramificada em três dimensões, cujos elementos estruturais podem ser ajustados para alterar tanto a superfície quanto as propriedades internas da macromolécula ^[30]. Os dendrímeros são caracterizados pelas suas gerações, isto é, a medida que aumenta o número de ramificações aumenta a geração do dendrímero. A estrutura dos dendrímeros pode ser dividida em três componentes principais: o núcleo, o interior e a casca, como ilustra a figura 2.4.

O núcleo define a forma em 3D do dendrímero. O interior define as propriedades que chamamos de *host-guest* do dendrímero, por exemplo, a interação de fármacos em sistemas de entrega controlada de medicamento ^[32]. A superfície do dendrímero pode ser polimerizada ou modificada com grupos funcionais periféricos.

Figura 2.4. Estruturas dos dendrímeros da geração zero (sem nenhuma ramificação além da estrutura original) para a geração dois (com duas ramificações além da estrutura original). A segunda geração é dividida em núcleo, interior e casca, como as setas indicam ^[31].

Tanto o núcleo quanto o tipo de ramificação interior alteram a morfologia do dendrímero, pois o diâmetro do dendrímero aumenta linearmente, enquanto o número de grupos de superfície aumenta exponencialmente a cada geração. Nesse caso, dendrímeros com gerações baixas geralmente são mais flexíveis e porosos, enquanto dendrímeros de gerações mais alta possuem formas mais densas e tridimensionais ^[33]. O aumento das gerações dos dendrímeros afeta a rigidez, solubilidade e reatividade dos grupos terminais da estrutura externa. Por isso, a maioria dos dendrímeros utilizados em aplicações biomédicas são de quarta geração ou superior, devido às vantagens do comportamento físico-químico dessas estruturas ^[30].

Um exemplo da utilização de dendrímeros em medicina é no desenvolvimento de sistemas de entrega de $\text{NO}^\bullet$ para fins terapêuticos em aplicações biomédicas ^[30-34]. Os dendrímeros atuam no transporte e liberação de $\text{NO}^\bullet$ de maneira controlada. O desenvolvimento de veículos de liberação de $\text{NO}^\bullet$ tem melhorado muito nos últimos anos, devido à combinação entre nanotecnologia e sistemas de entrega, o que vem permitindo

ultrapassar muitos dos desafios de transporte e liberação de $\text{NO}^\bullet$ em terapia ^[34]. Um dos maiores desafios a serem vencidos é o controle da quantidade e do tempo de liberação de $\text{NO}^\bullet$ no local de destino. A liberação controlada com o tempo não é a única vantagem do uso de dendrímeros aplicados a entrega de medicamentos. Outra vantagem é o fato de que a superfície externa do dendrímero pode ser funcionalizada para melhorar a solubilidade do material para uma função específica ^[30-34]. Esta última vantagem é importante desde que a modificação química da superfície do material permita a entrega de $\text{NO}^\bullet$ seletivamente. O controle do $\text{NO}^\bullet$ é extremamente importante para as aplicações desses materiais biológicos, especialmente na área cardiovascular ^[34].

Conhecendo as propriedades e a necessidade de novas metodologias para a detecção de óxido nítrico, essa primeira parte da tese de doutoramento apresenta um novo sensor de $\text{NO}^\bullet$ de alta seletividade com base na técnica de automontagem LbL. Para isso, os materiais ftalocianina de níquel tetrassulfonada (NiTsPc) e o dendrímero policatiônico poliamidoamina (PAMAM) foram alternados para obter filmes nanoestruturados. Esses filmes foram utilizados na modificação de ultramicroeletrodos de fibra de carbono, utilizados como sensores eletroquímicos para a detecção eletroquímica de $\text{NO}^\bullet$. Nossa justificativa para a escolha de um dendrímero policatiônico é devido à sua elevada carga positiva, de maneira que possa agir como uma membrana seletiva de ânions, deixando passar espécies neutras, repelindo interferentes catiônicos e possibilitando a estabilidade das moléculas de $\text{NO}^\bullet$ nos poros dos dendrímeros. Além disso, as propriedades físico-químicas e eletroquímicas do filme em questão foram analisadas, bem como a sua capacidade para melhorar a detecção de $\text{NO}^\bullet$ e a seletividade contra interferentes, tais como o nitrato, nitrito, peróxido de hidrogênio, dopamina, noradrenalina, adrenalina e ácido ascórbico.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 Reagentes e soluções

Os reagentes para a fabricação dos filmes LbL, ftalocianina de níquel tetrassulfonada (NiTsPc) e dendrímero poliamidoamina (PAMAM) de quarta geração foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para a deposição dos filmes na superfície dos ultramicroeletrodos de fibra de carbono foram preparadas soluções aquosas pH 4 de NiTsPc e PAMAM nas concentrações $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. O pH das soluções de PAMAM e NiTsPc foram ajustados utilizando uma solução $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 .

Para a construção dos ultramicroeletrodos de fibra de carbono (UME) foram utilizados fio de cobre da Goodfellow (Alemanha) e fibras de carbono de procedência SGL Technik GmbH (Alemanha). Foram também utilizados capilares de vidro de borossilicato da Hilgenberg GmbH (Alemanha), com tamanho de 100 mm, diâmetro externo de 1,50 mm e diâmetro interno de 0,375 mm. A cola de carbono condutora LEIT-C da Neubauer Chemikalien (Alemanha), o elastômero de silicone 184 e agente de cura 184 da Sylgard® (Alemanha) foram preparados 30 minutos antes do uso na razão em massa de 10 partes do elastômero para 1 parte do agente. Resina acrílica de eletrodeposição adquirida da BASF (Alemanha) também foi utilizada na construção dos UMEs. Para a determinação da área eletroativa do UME foi utilizada uma solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de hexaaminrutênio III, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$, de procedência ABCR GmbH (Alemanha).

O reagente Griess da Sigma-Aldrich (Alemanha) foi utilizado como ensaio colorimétrico na determinação da concentração de $\text{NO}^\bullet$ após cada síntese. Para isso, foram misturados volumes iguais da solução de $\text{NO}^\bullet$ ao reagente Griess. Após 15 minutos monitorou-se a absorbância no comprimento de onda $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Para os testes de interferência foram utilizados Dopamina (DA) (hidroclorato de 3-hidroxitiramina, $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$), Norepinefrina (NEp) ((*R*)-4-(2-amino-1-hidroxietil)-1,2-benzenodiol), Epinefrina (Ep) (álcool (*R*)-(-)-3,4-dihidroxi- α -(metilaminometil)benzil) adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha), ácido ascórbico (AA) ($C_6H_8O_6$), nitrato de sódio ($NaNO_3$) e peróxido de nitrogênio (H_2O_2) da J.T. Baker (Holanda) e nitrito de sódio ($NaNO_2$) da Normapur (Alemanha), nas concentrações entre $1 \mu mol L^{-1}$ a $500 \mu mol L^{-1}$, preparadas em solução tampão fosfato salino (PBS). Para o preparo da solução fosfato salino (PBS) $0,1 mol L^{-1}$ foram utilizados $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ e NaCl adquiridos da J.T. Baker (Holanda), e ajustado o pH para 7,4 com uma solução $0,1 mol L^{-1}$ de NaOH.

2.2.2 Fabricação do ultramicroeletrodo de fibra de carbono

Para a construção dos ultramicroeletrodos foram utilizadas fibras de carbono de 7 a 9 μm de diâmetro. Para isso, as fibras foram expostas à acetona por 24 horas para que a capa protetora fosse removida. Em seguida, a fibra de carbono foi conectada a um fio de cobre com o auxílio de cola de carbono condutora. Após secagem a $25 ^\circ C$, o fio de cobre com a fibra de carbono foi introduzido em um tubo capilar de vidro. A extremidade oposta à fibra foi isolada com silicone, seguida de secagem em estufa a $190 ^\circ C$ por 15 minutos. Após secagem, a fibra de carbono foi selada no capilar de vidro por meio de um extrator capilar, ilustrado na figura 2.5. O capilar foi posicionado na bobina sobre a junção entre o fio de cobre e a fibra de carbono, como aparece na figura 2.5A. Ao aplicar uma corrente de 17,3 ampéres, os 3 discos de peso promovem a fusão vidro-fibra (figura 2.5B). Dessa forma ocorre uma junção perfeita da fibra de carbono no vidro, com uma parte da fibra de carbono exposta.

Figura 2.5. Extrator capilar: (a) posição do parafuso micrométrico capilar na bobina de aquecimento, (b) tubo de vácuo, (c) capilar, (d) bobina de aquecimento e (e) peso.

Em seguida, a superfície exposta da fibra de carbono no eletrodo é isolada por eletrodeposição anódica. A fibra de carbono é imersa em uma solução de resina acrílica e aplica-se um potencial em torno de 3,5-4,0 V durante 3 minutos. Após essa etapa os eletrodos são secos em estufa a 190 °C por 15 minutos. A última etapa é o corte da ponta da fibra de carbono isolada para obter um eletrodo com geometria de disco com área conhecida. O corte deve ser de maneira perpendicular ao eixo longitudinal usando uma lâmina de bisturi com o auxílio de um microscópio ^[35,36].

A área eletroativa de vários ultramicroeletrodos de fibra de carbono construídos foi verificada por voltametria cíclica em 5,0 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆Cl₃] em solução de KCl 0,1 mmol L⁻¹ como observa-se na figura 2.6 ^[37]. A área eletroativa obtida nos ultramicroeletrodos de fibra de carbono foi de 6,6 ± 0,3 (n=10).

Figura 2.6. Voltamograma cíclico do ultramicroeletrodo de fibra de carbono em $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de hexaaminrutênio III, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$, em solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl. Velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} .

Observa-se na figura 2.7 as microscopias dos UMEs realizadas em Microscópio Olympus System modelo BX41 (Alemanha), para avaliar a junção vidro-fibra.

Figura 2.7. Microscopias dos UMEs fabricados para avaliação da junção vidro-fibra (A) e o diâmetro da fibra de carbono utilizado (B).

Observa-se na figura 2.7A a perfeita junção vidro-fibra pela técnica empregada. A figura 2.7B apresenta a medida exata da fibra de carbono utilizada na construção dos ultramicroeletrodos.

2.2.3 Fabricação dos filmes LbL

Filmes automontados foram fabricados pela imersão de ultramicroeletrodos de fibra de carbono na solução policatiônica do dendrímero PAMAM por 5 minutos, seguida da imersão em solução polianiônica de NiTsPc por mais 5 minutos. Após deposição de cada camada, os filmes eram imersos em solução aquosa de lavagem pH 4, solução ajustada com H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, seguida de secagem por 10 minutos. A figura 2.8 mostra uma representação esquemática da deposição de uma bicamada de dendrímero e ftalocianina na superfície do ultramicroeletrodo de fibra de carbono, CF-(PAMAM/NiTsPc).

Figura 2.8. Esquema da fabricação de filmes automontados pela técnica de LbL com dendrímero e ftalocianina de níquel tetrassulfonada em superfície de ultramicroeletrodo de fibra de carbono.

Diferentes arquiteturas, CF-(NiTsPc/PAMAM), CF-(PAMAM/NiTsPc), CF-PAMAM e CF-NiTsPc, foram testadas a fim de verificar qual era o melhor para a detecção do NO[•]. Para isso foram realizadas medidas de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial com 80 µmol L⁻¹ de NO[•] em PBS pH 7,4. Para avaliar a difusão e a modificação da superfície dos UMEs com os filmes LbL foram realizados voltamogramas cíclicos com 5,0 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆Cl₃] em solução KCl 0,1 mmol L⁻¹ dos eletrodos modificados com 1, 3, 5, 10, 15 e 20 bicamadas na arquitetura CF-(PAMAM/NiTsPc).

2.2.4 Técnicas de caracterização

Os filmes LbL na superfície dos UMEs foram caracterizados por medidas eletroquímicas de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. Uma cela eletroquímica devidamente selada foi usada para controle do O₂ livre durante as medidas. Os UMEs com e sem modificação foram utilizados como eletrodos de trabalho. Um eletrodo de Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ foi utilizado como referência. A voltametria de pulso diferencial (DPV) foi utilizada para estudar as propriedades eletroquímicas do sensor de NO[•] com os parâmetros: altura do pulso de 2 mV, tamanho do pulso de 50 mV e tempo do pulso de 0,05 s. Foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) no potencial de 0,80 V com 5 mV de amplitude de onda. A frequência foi medida entre 0,1 Hz a 10 kHz, com solução 80 µmol L⁻¹ de NO[•]. Para a curva analítica de calibração foram utilizadas concentrações entre 8 µmol L⁻¹ a 80 µmol L⁻¹. As medidas de DPV e EIE foram realizadas com potenciostato/galvanostato/FRA Gamry[®] (Gamry Instruments, Warminster, DA).

Para o monitoramento da concentração de NO[•] foi utilizado um espectrofotômetro UV-vis Specord S 100 da Analytik Jena (Alemanha) com caminho ótico da cela de 10 mm.

2.2.5 Solução padrão de NO•

A configuração para a preparação da solução padrão de NO• no laboratório é mostrada na figura 2.9. A produção de NO• segue as seguintes equações:

Figura 2.9. Esquema da produção da solução saturada padrão de NO• a partir das soluções de NaNO₂ e H₂SO₄, utilizando sistema a vácuo e controle de temperatura.

Um balão volumétrico de fundo redondo com três entradas foi preenchido com uma solução saturada de NaNO₂. Um funil de adição com equalizador de pressão foi preenchido com solução 10% (v/v) de H₂SO₄ e conectado ao balão volumétrico contendo NaNO₂ a partir do topo. A solução 10% de H₂SO₄ foi adicionada lentamente ao balão volumétrico contendo

NaNO₂, levando a uma reação vigorosa. A taxa com que a solução de H₂SO₄ atinge o balão com NaNO₂ determina a pressão do sistema e o tempo da reação. A fim de assegurar uma reação longa e estável para a produção de uma solução saturada de NO[•] no frasco da outra extremidade do sistema, a taxa de queda da solução de H₂SO₄ deve ser lenta e constante. O monitoramento na produção de NO[•] é essencial para equalizar a pressão interna do sistema. O NO[•] produzido passou por duas soluções de lavagem contendo solução supersaturada de KOH para remover produtos indesejados como nitratos ou impurezas.

O NO[•] puro foi coletado em um frasco pequeno contendo 25 mL de solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,4 a 4 °C desgaseificado. A reação que leva à produção de NO[•] continua por cerca de 15-20 minutos. Uma vez que a solubilidade do NO em PBS é altamente dependente da temperatura, o frasco de coleta do NO[•] foi continuamente resfriado em banho de gelo para manter a temperatura baixa. Todo o sistema foi purgado com argônio por pelo menos 30 minutos antes do início do procedimento para exclusão completa de oxigênio. A solução padrão de NO[•] foi mantida a 4 °C em um balão volumétrico de vidro com uma entrada lacrada por um septo de silicone (Wheaton, Millville, EUA). Para a retirada da solução de NO[•] foi utilizada uma seringa descartável de 1 µL. A concentração final da solução padrão de NO[•] foi determinada por meio do teste colorimétrico de Griess ^[38].

2.2.6 Determinação da concentração de NO[•] por meio do teste de Griess.

Para a determinação da concentração de NO[•] na solução padrão, adicionou-se 100 mL da solução padrão com auxílio de uma seringa em 100 mL de PBS pH 7,4 contendo oxigênio em um frasco com septo. Após 12 horas ocorre a conversão total do NO[•] em nitrito (NO₂⁻). Para a curva analítica de calibração foi utilizada a solução de nitrito e o reagente Griess em razões iguais, isto é, misturou-se os mesmos volumes da solução do reagente Griess e

amostra, entre as concentrações de 0,43 a 65 mmol L⁻¹ NO₂⁻. Após 15 minutos o NO[•] foi monitorado a partir do NO₂⁻ formado pela reação com a sulfilamida do reagente de Griess, conforme a reação a seguir:

Sequência da reação:

Nessa reação ocorre a formação de um azo corante de cor magenta, o qual pode ser monitorado colorimetricamente medindo-se sua absorvância em $\lambda = 540 \text{ nm}$ [39]. A partir dessa reação foi possível construir uma curva analítica de calibração como mostra a figura 2.10.

Figura 2.10. (A) Curva analítica de calibração de NO₂⁻, para o monitoramento de NO[•] pela reação de NO₂⁻ com o reagente Griess nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 10; 15; 20 e 25 μmol L⁻¹. (B) Regressão linear dos máximos de absorvância de NO₂⁻ por meio da técnica colorimétrica nas concentrações da curva analítica de calibração do gráfico A.

Para a determinação da concentração de $\text{NO}^\bullet$ a cada síntese, utilizou-se a curva de calibração $y = -0,0495 + 0,0137x$ obtida pelos resultados apresentados na figura 2.10. Uma perspectiva das concentrações obtidas a partir de 8 sínteses diferentes de $\text{NO}^\bullet$ é plotada na figura 2.11.

Figura 2.11. Valores médios das concentrações de $\text{NO}^\bullet$ após cada síntese utilizando a técnica colorimétrica com a reação de Griess.

O valor médio das concentrações da solução padrão de $\text{NO}^\bullet$ a 4 °C foi de $3,90 \text{ mM} \pm 0,42$ (n=8).

2.2.7 Detecção de $\text{NO}^\bullet$

Os sensores de $\text{NO}^\bullet$ com filmes LbL das diferentes arquiteturas [CF/PAMAM; CF/NiTsPc; CF-(PAMAM/NiTsPc) e CF-(NiTsPc/PAMAM)] foram testados para avaliar suas propriedades catalíticas. Para as curvas analíticas de calibração com o sensor de $\text{NO}^\bullet$, alíquotas da solução padrão de $\text{NO}^\bullet$ foram adicionadas dentro de uma cela eletroquímica nas concentrações entre 10 a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas de EIE foram usadas para avaliar a influência da arquitetura do filme nanoestruturado na velocidade de difusão do $\text{NO}^\bullet$ e a relação entre a concentração e a resistência a transferência eletrônica.

2.2.8 Detecção dos interferentes

A capacidade dos filmes nanoestruturados na superfície do UME em discriminar interferentes foi medida por voltametria de pulso diferencial utilizando uma solução eletrolítica contendo $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$ e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada interferente. O sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) foi testado para avaliar suas propriedades de seletividade contra interferentes como NO_2^- , NO_3^- , H_2O_2 , dopamina, noradrenalina, adrenalina e ácido ascórbico.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ultramicroeletrodos de fibra de carbono (UMEs) são utilizados para o desenvolvimento de novos sensores de $\text{NO}^\bullet$ por possuir dimensões micrométricas. Além disso, a modificação da superfície do eletrodo no desenvolvimento de sensores para $\text{NO}^\bullet$ é fundamental. Atualmente, a técnica mais empregada nessa modificação é a eletropolimerização de porfirina ^[18,19]. Sabendo da importância de modificar a superfície do UME para a detecção de $\text{NO}^\bullet$, a técnica de modificação LbL foi empregada como uma alternativa aos métodos clássicos de modificação de superfícies de UMEs utilizando diferentes arquiteturas para o desenvolvimento de sensor de $\text{NO}^\bullet$. Essa modificação usando a automontagem LbL raramente é usada nesse tipo de superfície.

A primeira etapa na modificação dos UMEs pela técnica de LbL foi definir uma arquitetura molecular da superfície do UME que facilitasse a transferência eletrônica e consequentemente a detecção do $\text{NO}^\bullet$. A capacidade de ligação dos centros metálicos das metaloftalocianinas pode ser estimada através da análise do pKa dos ligantes livres e dos compostos de coordenação. Nesse caso, para a molécula de NiTsPc, é esperado um processo

de ionização em pH acima de 2,5, uma unidade acima do pKa. Dessa forma, os quatro grupos sulfônicos estarão ionizados ^[40]. Tais condições asseguram que todos os grupos sulfônicos podem interagir com os grupos amina do PAMAM e formar pontes de hidrogênio como ilustrado na figura 2.12.

Figura 2.12. Esquema da ligação entre os grupos amina da molécula do dendrímero PAMAM com os grupos sulfônicos da molécula de ftalocianina de níquel tetrassulfonada. (*representação de 1/6 da estrutura da molécula de PAMAM).

Além disso, a carga negativa dos anéis de ftalocianina deve impedir a agregação inter ou intramolecular ^[40,44], indicando que essas moléculas são passíveis de utilização na automontagem LbL. Uma característica fundamental da formação dos filmes com a técnica LbL é a capacidade de produzir estruturas supramoleculares cujas propriedades podem diferir das propriedades dos materiais utilizados ^[40,41]. A arquitetura do sensor de NO[•] foi investigada por meio da voltametria de pulso diferencial, a fim de contornar os problemas com correntes capacitivas provocadas pela modificação da superfície de eletrodo.

Os resultados da dependência da corrente de pico em função da concentração por meio da voltametria de pulso diferencial dos sensores de $\text{NO}^\bullet$ com diferentes arquiteturas são apresentados na figura 2.13.

Figura 2.13. (A) Voltamogramas de pulso diferencial dos sensores de $\text{NO}^\bullet$ nas arquiteturas CF-PAMAM ($\square$), CF-NiTsPc ($\bullet$), CF-(NiTsPc/PAMAM) ($\triangle$) e CF-(PAMAM/NiTsPc) ($\circ$) na concentração de NO de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curvas analíticas de calibração para as quatro arquiteturas empregadas no gráfico A, nas concentrações 0, 16, 24, 32, 40, 48, 60, 80 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$ em solução tampão PBS pH 7,4 desoxigenada.

Como observamos na figura 2.13A, o sinal de $\text{NO}^\bullet$ foi melhor definido quando NiTsPc e PAMAM estavam juntos na automontagem. A ausência de um dos compostos proporcionou correntes menores e voltamogramas menos definidos. A deposição de filmes CF-(PAMAM/NiTsPc) foi mais eficiente do que filmes com arquitetura CF-(NiTsPc/PAMAM). Tal resultado pode estar relacionado a uma organização estrutural favorável dos grupos do PAMAM e NiTsPc na superfície do UME. Por outro lado, é possível que a carga positiva do PAMAM na interface-solução altere a difusão do $\text{NO}^\bullet$ para a superfície do eletrodo. A influência das diferentes arquiteturas na sensibilidade do sensor à detecção de $\text{NO}^\bullet$ é observada a partir da inclinação das curvas analíticas de calibração na

figura 2.13B. A inclinação da curva no sensor com arquitetura CF-(PAMAM/NiTsPc) é maior, neste caso, três vezes maior comparada com a do sensor CF-(NiTsPc/PAMAM).

Sabendo que o PAMAM não é eletroativo, qualquer processo eletroquímico dos filmes CF-(PAMAM/NiTsPc) deve-se a interação NO-Ni da metaloftalocianina, semelhante ao que ocorre com as metaloporfirinas. As metaloporfirinas são conhecidas por serem capazes de incluir ligantes adicionais em sua esfera de coordenação formando uma ligação octaédrica distorcida com o metal central ^[42]. Nesse caso, o NO[•] liga-se ao Ni da ftalocianina formando um aduto. Para que ocorra a oxidação do NO[•], o produto da reação de oxidação NO⁺ é estabilizado pelas moléculas de dendrímero PAMAM, que, por sua vez, auxiliam nesse processo como relatado por Seabra e colaboradores ^[34], que utilizam o PAMAM para estabilizar o NO⁺ em sistemas de entrega de medicamento. A interação entre o metal do filme e o NO[•] é necessária para facilitar a oxidação eletrocatalítica do NO[•] no eletrodo modificado ^[6].

A combinação da técnica de EIE com os ultramicroeletrodos é uma excelente ferramenta que pode ser utilizada para entender diversos sistemas eletroquímicos. Porém, antes de discutir os resultados obtidos por essas técnicas, é necessário compreender as características e propriedades da impedância dos UMEs. A técnica de EIE fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, sendo de grande interesse na eletroquímica fundamental. A pequena dimensão dos UMEs contribui para a difusão das espécies eletroativas na superfície do UME. Essa característica é de grande importância em estudos de processos de transferência eletrônica, onde é essencial maximizar o transporte de massa, a fim de permitir uma velocidade constante ^[43].

Devido aos diferentes formatos que a superfície do UME pode exibir, alguns autores derivaram equações apropriadas de impedância *ac* em UME com superfície em formato disco. Fleischmann e Pons ^[43] foram os pesquisadores que melhor desenvolveram essa derivação. Considerando uma reação eletroquímica de um elétron e as equações da segunda lei de Fick, que descreve as mudanças de concentração das espécies oxidadas com o tempo, e a equação de Butler-Volmer, os autores derivaram duas equações para os componentes imaginário e real de uma impedância difusional em um microdisco. As equações são:

$$Z' = (4RT/\pi n^2 F^2 D^{1/2} \omega^{1/2} a^2 c) \Phi_4 (a^2 \omega/D) \quad (\text{equação 8})$$

$$Z'' = (4RT/\pi n^2 F^2 D^{1/2} \omega^{1/2} a^2 c) \Phi_5 (a^2 \omega/D) \quad (\text{equação 9})$$

Sendo Φ_4 e Φ_5 funções da frequência não-dimensional $a^2 \omega/D$, os símbolos R, T e F tem seus significados usuais, e $n=1$ para a transferência de um elétron^[43].

O circuito equivalente proposto por Fleischmann e Pons ^[43] para um UME em microdisco é mostrado na figura 2.14. O circuito contém uma resistência do eletrólito R_u , uma resistência de transferência de carga, R_{ct} , um capacitor referente a dupla camada C_{dl} e uma componente difusional M dada pelas equações 8 e 9. Esse circuito é muito próximo ao circuito de Randles, utilizado para eletrodos convencionais, porém difere nas componentes real e imaginária, referentes a difusão.

Figura 2.14. Circuito equivalente proposto por Fleischmann e Pons para ultramicroeletrodos com superfície em formato de microdisco ^[43].

Nos UMEs, a resistência da solução é muito pequena comparada aos outros componentes. Em altas frequências a resposta é dominada pela resistência de transferência de carga e pela capacitância da dupla camada. Como consequência, um semicírculo é observado no plano complexo. Nas altas frequências, geralmente a difusão é linear e semi-infinita correspondendo a componente Warburg (Z_w). Em baixas frequências, diferente dos eletrodos convencionais, a difusão torna-se esférica e o fluxo se aproxima de um valor constante. Quando R_{ct} é grande, o semicírculo em alta frequência aumenta, isto é o processo é dominado pela cinética de transferência de carga, que em grande parte controla a resposta eletroquímica. Quando R_{ct} é pequeno, o semicírculo é menor e a impedância difusional domina. A principal vantagem de usar ultramicroeletrodos em conjunto com espectroscopia de impedância eletroquímica *ac* é que a impedância difusional é reduzida significativamente quando comparada com a de eletrodos normais e, portanto, torna-se possível caracterizar reações eletroquímicas para as quais a constante de velocidade heterogênea é relativamente alta ^[43].

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi realizada para inferir as propriedades de transferência de elétrons através das diferentes arquiteturas empregadas na superfície do UME. A figura 2.15 mostra diagramas de Nyquist obtidos em 0,80 V em solução tampão degaseificada (PBS pH 7,4) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$. Os resultados mostram diferenças significativas na resistência à transferência eletrônica para todos os filmes comparados ao UME sem modificação.

Observa-se que a resistência de transferência de carga pode ser correlacionada com os resultados do DPV da figura 2.15. O sensor CF-PAMAM tem uma maior resistência à transferência de elétrons em comparação com os outros sensores, além de apresentar um maior comportamento capacitivo. Isso pode estar relacionado à natureza altamente carregada da estrutura do PAMAM. O valor máximo da parte imaginária da impedância, $-Z_{\text{imag}}$ do sensor CF-PAMAM foi cerca de $3 \times 10^8 \Omega$, pelo menos seis vezes maior do que para o UME

sem modificação, que tinha um valor próximo a $5 \times 10^7 \Omega$. O valor da resistência de transferência de carga para CF-(PAMAM/NiTsPc) foi menor comparado ao do sensor CF-PAMAM. Isso significa que alguma forma de interação entre o PAMAM e NiTsPc, provavelmente de natureza eletrostática, cause uma neutralização significativa da carga do PAMAM e, assim, observa-se uma diminuição no comportamento capacitivo do filme e na resistência à transferência de elétrons através do filme.

Figura 2.15. Diagramas de Nyquist obtidos para o UME de fibra de carbono sem modificação (■) e com as bicamadas (□) PAMAM, (●) NiTsPc, (△) NiTsPc/PAMAM e (○) PAMAM/NiTsPc. Eletrólito composto por solução tampão desgaseificada (PBS pH 7,4) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$. Potencial de 0,80 V, faixa de frequência de 0,1 Hz a 10 kHz e 5 mV de amplitude de pulso.

Quando a arquitetura do filme é alterada para CF-(NiTsPc/PAMAM), com a interface PAMAM entre o eletrólito e o eletrodo, a resistência à transferência de carga aumenta em relação ao caso anterior. O PAMAM na parte interna do filme interage eletrostaticamente melhor com o NiTsPc neutralizando suas cargas, enquanto a outra superfície exposta ao eletrólito não é afetada. Mais uma vez, o aumento no comportamento capacitivo do filme surge devido à carga superficial. A resistência de transferência de carga, no entanto, é

reduzida em comparação ao filme CF-PAMAM, devido à neutralização parcial da carga positiva no PAMAM por NiTsPc. Por outro lado, PAMAM pode atuar como uma camada de inibição para a difusão de $\text{NO}^\bullet$. Isso explica as baixas correntes voltamétricas observadas na figura 2.13 para o UME modificado apenas com o PAMAM. A arquitetura CF-(PAMAM/NiTsPc), portanto, é mais eficiente como sensor de $\text{NO}^\bullet$, facilitando a transferência de elétrons em comparação com as outras arquiteturas.

Após a identificação da melhor arquitetura para o desenvolvimento do sensor de $\text{NO}^\bullet$, foi investigado o número ideal de camadas de CF-(PAMAM/NiTsPc) para detecção de $\text{NO}^\bullet$. Este parâmetro é essencial, especialmente porque a taxa de difusão do $\text{NO}^\bullet$ através das camadas do filme LbL é crucial para sua detecção. Inicialmente, o número de bicamadas sobre a resposta do UME foi avaliado por meio de voltamogramas cíclicos do sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) com uma solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ em KCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ como mostra a figura 2.16A.

Figura 2.16. (A) Voltamogramas cíclicos do UME de fibra de carbono (a) com 5 (b), 10 (c), 15 (d) e 20 (e) bicamadas de CF-(PAMAM/NiTsPc)_n em solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ em KCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Resposta linear decrescente da corrente em função do número de bicamadas de PAMAM/NiTsPc na superfície do UME de fibra de carbono no potencial $-0,296 \text{ V}$.

O aumento do número de bicamadas na superfície do UME é caracterizado pela diminuição dos valores das correntes de redução. Observa-se uma grande diminuição das correntes até a passivação total da superfície. Isso ocorre devido à pequena área geométrica que o UME possui, dificultando a difusão das espécies para a superfície do eletrodo. Na figura 2.16B observa-se uma relação linear do aumento do número de bicamadas com a diminuição da corrente de redução do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]^-$, até a perda total de corrente quando atinge-se 15 bicamadas. Sabendo que as moléculas de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3]$ e $\text{NO}^\bullet$ apresentam velocidades de difusão diferentes, e que essa característica deve ser levada em conta no desenvolvimento de sensores de $\text{NO}^\bullet$, foram realizados novos estudos do número de bicamadas para que não ocorressem interferências no processo de difusão devido ao aumento do número de bicamadas. Medidas de impedância eletroquímica e voltametrias de pulso diferencial foram realizadas com $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$, agora com 1, 2 e 3 bicamadas, como observado na figura 2.17.

Figura 2.17. (A) Diagramas de Nyquist e (B) voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o UME de fibra de carbono sem modificação e modificado com 1, 2 e 3 bicamadas de PAMAM/NiTsPc. Para EIE, foi utilizado potencial de 0,80 V e faixa de frequência de 0,1 Hz a 10 kHz, 5mV de amplitude de pulso. Para DPV, foi utilizada velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} ; amplitude de pulso: 25 mV; largura de pulso: 50 ms. Eletrólito composto por solução tampão desoxigenada (PBS pH 7,4) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$.

Os resultado do diagrama de Nyquist e dos voltamogramas de pulso diferencial, mostraram que o sensor com 1 bicamada apresenta melhor desempenho à resistência de transferência eletrônica e corrente em relação aos sensores com mais de 2 bicamadas. Como esperado, o aumento da espessura do filme CF-(PAMAM/NiTsPc) aumenta sua resistência à transferência de elétrons e consequentemente, diminui a corrente de oxidação do $\text{NO}^\bullet$. Sabendo que o dendrímero PAMAM não é eletroativo, a espessura desses filmes afeta a taxa de difusão do $\text{NO}^\bullet$ através deles. De acordo com Siqueira Jr. e colaboradores ^[44], o aumento da espessura com o número de camadas de filmes LbL PAMAM/NiTsPc muda de 1,46 a 6,21 nm, quando passa de 1 bicamada para 3 bicamadas. Esse pequeno aumento provoca uma grande diferença na difusão do $\text{NO}^\bullet$ para a superfície do eletrodo.

Estabelecida a arquitetura e o número de bicamadas na construção do sensor de $\text{NO}^\bullet$, curvas analíticas de calibração utilizando impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial foram construídas como mostra a figura 2.18. Todas as medidas foram realizadas com total exclusão de oxigênio.

Figura 2.18. (A) Curva analítica de calibração de $\text{NO}^\bullet$ com o sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) nas concentrações crescentes de 8, 16, 24, 32, 40, 48, 60 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtida por DPV (velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} ; amplitude de pulso: 25 mV; largura de pulso: 50 ms). (B) Gráfico de Nyquist para a curva analítica de calibração de $\text{NO}^\bullet$ nas mesmas concentrações da curva analítica por DPV.

A curva de calibração foi obtida a 25 °C para o $\text{NO}^\bullet$ por meio da DPV nas concentrações entre $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$ como mostra a figura 2.18A. A sensibilidade foi determinada a partir da inclinação da linha de regressão $I = 3,14 \times 10^{-6} [\text{NO}^\bullet] - 0,61$ (I em nA e $[\text{NO}^\bullet]$ em $\mu\text{mol L}^{-1}$) ($r = 0,9732$). A curva analítica mostra um limite de detecção de $5,48 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o $\text{NO}^\bullet$. O limite de detecção foi calculado a partir de 3 vezes o valor do sinal ruído do branco. Os sensores mostraram uma reprodutibilidade satisfatória com desvio padrão de $5,74 \times 10^{-12}$. O sensor apresenta uma desvantagem em termos de resistência mecânica, devido à exposição da fibra de carbono e do fino capilar de vidro utilizado na construção.

Também foram obtidas medidas de impedância eletroquímica em função da concentração, como mostra a figura 2.18B. A transferência eletrônica com o aumento da concentração apresentou-se de maneira linear. Nesse caso, a resistência à transferência eletrônica decresce com o aumento da concentração como mostra os semicírculos no diagrama de Nyquist. Apesar da resistência de transferência eletrônica diminuir com o aumento da concentração, nenhuma componente difusional é observada para esse sistema. Essa característica é devido à adsorção do $\text{NO}^\bullet$ na superfície do eletrodo, isto é, uma reação química seguida de uma reação eletroquímica. Como discutido anteriormente, o $\text{NO}^\bullet$ liga-se ao centro metálico da ftalocianina para a formação de um aduto (reação química). Em seguida, ocorre a reação eletroquímica para a geração do produto NO^+ que será oxidado na superfície do eletrodo. Essa propriedade acontece em diferentes sistemas que apresentam uma reação química seguida de uma etapa eletroquímica. Além disso, o diâmetro do UME pode alterar as características difusionais do próprio eletrodo, diferente do esperado para um eletrodo convencional.

Em relação ao aumento da concentração observa-se que a resistência de transferência de carga diminui. Nesse caso, um aumento na concentração de $\text{NO}^\bullet$ faz com que mais

moléculas cheguem à superfície do eletrodo para a formação do aduto NO-Ni seguida da oxidação em NO^+ . Essa característica faz com que a resistência de transferência de carga torne-se mais rápida sendo evidenciada pela diminuição do semicírculo.

A utilização de softwares para o ajuste dos resultados de impedância não foi adotada nesse trabalho. Apesar de saber que há uma contribuição capacitiva e uma resistiva, optou-se por não realizar esse processo porque o circuito equivalente seria muito complexo, pois o sistema em questão apresenta uma etapa química seguida de uma etapa eletroquímica. Vários parâmetros teriam que ser levados em conta na proposta do circuito equivalente, entre eles o tamanho do eletrodo, as modificações da superfície, até a reação entre analito e a superfície do eletrodo. Se fosse proposto um circuito equivalente, este seria diferente do circuito equivalente proposto por Fleischmann e Pons ^[43], onde eles sugerem um circuito para o UME sem modificação e com analitos que não adsorvem na superfície do eletrodo.

2.3.1 Estudo com interferentes

A aplicação da técnica LbL na construção de sensores para $\text{NO}^\bullet$ utilizando o dendrímero PAMAM como possível camada protetora foi investigada por sua capacidade de impedir que substâncias interferentes acessem a superfície do eletrodo. Dentre os interferentes o nitrito (NO_2^-) foi escolhido porque é o principal produto da reação do $\text{NO}^\bullet$ com o oxigênio em solução aquosa, assim como o nitrato (NO_3^-). Já o peróxido de hidrogênio foi escolhido porque os radicais de peróxido muitas vezes são gerados em situações patológicas. Além disso, ele pode ser facilmente oxidado, mostrando uma forte interferência na determinação de $\text{NO}^\bullet$ ^[19,22]. As respostas eletroquímicas das diferentes substâncias interferentes obtidas como o sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) são apresentadas na figura 2.19.

Figura 2.19. Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) (A) e do UME (B) de $\text{NO}^\bullet$ (■) na concentração $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença dos interferentes nitrito (NO_2^-) (□), nitrato (NO_3^-) (○) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (▼) na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Observa-se claramente que as correntes de oxidação e o perfil dos voltamogramas dos eletrodos com e sem a modificação são diferentes. Para o sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) nenhuma contribuição significativa dos interferentes é observada, com sinais de corrente de oxidação 3 vezes maior que o nitrito. No entanto, o UME sem a modificação apresentou contribuições significativas da presença dos interferentes. Nesse caso, os interferentes apresentaram corrente de oxidação no potencial de oxidação do $\text{NO}^\bullet$. No caso do eletrodo com a camada de PAMAM a concentração $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos interferentes utilizada nesse experimento observa-se que ocorre apenas a contribuição na concentração de $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet$ utilizado nesse experimento, próxima à concentração fisiológica.

A camada de PAMAM agiu como uma capa protetora contra tais interferentes. Na presença do dendrímero PAMAM as espécies interferentes negativamente carregadas não interfere na corrente de oxidação do $\text{NO}^\bullet$. Essa característica pode estar relacionada a alta densidade de carga positiva do dendrímero. Nesse caso, os interferentes aniônicos ficariam adsorvidos na capa protetora de PAMAM, não conseguindo difundir até a superfície do

eletrodo para que a reação ocorresse. A molécula de $\text{NO}^\bullet$ consegue difundir pela camada de PAMAM, atingindo o centro metálico da molécula de ftalocianina para a formação do aduto e assim gerar o sinal analítico.

Na presença de outros interferentes na concentração aplicada nesse experimento, a dopamina, a epinefrina e a norepinefrina apresentaram sinais característicos para o UME com e sem a modificação. Apenas o ácido ascórbico não apresentou sinal analítico. Os resultados são apresentados na figura 2.20.

Figura 2.20. Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) (A) e do UME (B) de $\text{NO}^\bullet$ na concentração $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença dos interferentes dopamina (■), epinefrina (○), norepinefrina (□) e ácido ascórbico (◇) na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Assim como o Nafion[®], o PAMAM não mostrou uma proteção significativa contra esses interferentes. Estudos mostram que o Nafion[®] não é adequado se substâncias interferentes como a dopamina e outros neurotransmissores estejam presentes, como no caso de medidas de $\text{NO}^\bullet$ no sistema nervoso. De acordo com estudos realizados por Groppe e colaboradores ^[20], as camadas de Nafion[®] mostraram excelentes propriedades de bloqueio para nitrito, ácido úrico e ácido ascórbico, mas não para a dopamina. No caso do PAMAM aplicado à camada protetora, os potenciais de oxidação dos interferentes dopamina,

epinefrina e norepinefrina é cerca de 0,60 V de diferença do potencial de oxidação do $\text{NO}^\bullet$. Dessa forma, espera-se que esses interferentes não contribuam com a corrente de oxidação do $\text{NO}^\bullet$ gerado pelo sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) utilizando a técnica de pulso diferencial. Além disso, as concentrações dos neurotransmissores utilizados nesse estudos são acima dos níveis fisiológicos, talvez para aplicações *in vivo* a maior contribuição será do $\text{NO}^\bullet$.

2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo, abordou-se o desenvolvimento e a otimização um sensor para $\text{NO}^\bullet$ utilizando camadas automontadas em ultramicroeletrodos de fibra de carbono. A caracterização do sensor foi por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados das duas técnicas revelaram que a difusão de $\text{NO}^\bullet$ é dependente do número de bicamadas empregadas e da disposição das moléculas no filme. Para a detecção nas concentrações empregadas nesse trabalho o sensor CF-(PAMAM/NiTsPc) com uma bicamada apresentou o melhor sinal analítico. Por último, determinou-se a capacidade do PAMAM bloquear interferentes. Dentre os interferentes testados, os melhores resultados foram para o bloqueio de nitrito, nitrato, peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico. A modificação dos UMEs não foi eficiente para bloquear interferentes como a dopamina, a epinefrina e a norepinefrina. Os resultados no desenvolvimento de um sensor de $\text{NO}^\bullet$ utilizando a técnica LbL foram satisfatórios, principalmente em termos de seletividade, onde o dendrímero PAMAM apresentou-se como uma boa camada protetora. Porém, no que se trata de sensibilidade, o sensor ainda não é adequado, por isso não foi possível aplicar em sistemas celulares como se esperava. Trabalhos futuros deveram ser realizados para que essa característica seja solucionada.

2.5 BIBLIOGRAFIA

- [1] ELSEVIER. Disponível em: <<http://www.scopus.com/nitricoxide>>. Acesso em: 16 jun. 2011.
- [2] THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. L1005-1028, 2000.
- [3] PERSSON, P.B. Where we stand. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, p. R489-R490, 2006.
- [4] HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? **Nitric Oxide**, v. 21, p. 92–103, 2009.
- [5] BEDIOUI, F.; VILLENEUVE, N. Electrochemical nitric oxide sensors for biological samples-principle, selected examples and applications. **Electroanalysis**, v. 15, p. 5-18, 2003.
- [6] BORGMANN, S. Electrochemical quantification of reactive oxygen and nitrogen: challenges and opportunities. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 95-105, 2009.
- [7] KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide syntheses in mammals. **Biochemical Journal**, v. 298, p. 249–58, 1994.
- [8] MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–42, 1991.
- [9] MOSHAGE H. Nitric oxide determinations: much ado about NO[•]-thing? [Editorial]. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 553–556, 1997.
- [10] TAHA, Z.H. Nitric oxide measurements in biological samples. **Talanta**, v. 61, p. 3-10, 2003.
- [11] YAO, D.; VLESSIDIS, A.G.; EVMIRIDIS, N.P. Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchimica Acta**, v. 147, p. 1-20, 2004.
- [12] SHIBUKI, K. Calcium-dependent and ouabain-resistant oxygen consumption in the rat neurohypophysis. **Brain Research**, v. 487, p. 96-104, 1989.

- [13] AMATORE, C.; ARBAULT, S.; BOUTON, C.; COFFI, K.; DRAPIER, J.; GHANDOUR, H.; TONG, Y. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. **ChemBioChem**, v. 7, p. 653 – 661, 2006.
- [14] PONTIÉ, M.; BÉDIOUI, F. Design of electrochemical microsensors to monitor nitric oxide production in biological systems: a global compilation. **Analisis**, v. 28, p. 465-469, 2000.
- [15] FORD, P.C.; LORKOVIC, I.M. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 993-1017, 2002.
- [16] LEWIS, R.S.; DEEN, W.M. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solution. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, p. 568-574, 1994.
- [17] ENEMARK, J.H.; FELTHAM, R.D. Stereochemical control of valence. II. The behavior of the (M-NO) (metal-Mononitrosyl) group in ligand fields. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, p. 5002-5004, 1974.
- [18] MALINSKI, T.; TAHA, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in-situ by a porphyrinic-based microsensor. **Nature**, v. 358, p. 676-678, 1992.
- [19] SONNUR, I.; SCHUHMANN, W. Detection of nitric oxide release from single cells by using constant-distance-mode scanning electrochemical microscopy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 7451 –7454, 2006.
- [20] GROPE, M.; THANOS, S.; SCHUHMANN, W.; HEIDUSCHKA, P. Measurement of nitric oxide production by the lesioned rat retina with a sensitive nitric oxide electrode. **Analytica and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 797-807, 2003.
- [21] BRUNERT, D.; KURTENBACH, S.; ISIK, S.; BENECKE, H.; GISSELMANN, G.; SCHUHMANN, W.; HATT, H.; WETZEL, C.H. Odorant-dependent generation of nitric oxide in mammalian olfactory sensory neurons. **PLoS ONE**, v. 4, p. e5499, 2009.
- [22] AMATORE, C.; ARBAULT, S.; GUILLE, M.; LEMAITRE, F. Electrochemical monitoring of single cell secretion: vesicular exocytosis and oxidative stress. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2585–2621, 2008.
- [23] SANTOS, R.M.; LOURENCO, C.F.; PIEDADE, A.P.; ANDREWS, R.; POMERLEAU, F.; HUETTL, P.; GERHARDT, G.A.; LARANJINHA, J.; BARBOSA, R.M. A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 704–709, 2008.

- [24] STASKO, N. A.; SCHOENFISCH, M. H. Dendrimers as a scaffold for nitric oxide release. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 8265-8271, 2006.
- [25] WADSWORTH, R.; STANKEVICIUS, E.; SIMONSEN, U. Physiologically relevant measurements of nitric oxide in cardiovascular research using electrochemical microsensors. **Journal of Vascular Research**, v. 43, p. 70–85, 2006.
- [26] ZHANG, X.; CHEN, H.; ZHANG, H. Layer-by-layer assembly: from conventional to unconventional methods. **Chemical Communications**, v.14, p. 1395-1405, 2007.
- [27] DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210-211, pte. 2, p. 831-835, 1992.
- [28] DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, p. 1232-1237, 1997.
- [29] SIQUEIRA JR., J.R.; CASELI, L.; CRESPILOHO, F.N.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA JR., O.N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p.1254–1263, 2010.
- [30] MINTZER, M.A.; GRINSTAFF, M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 173-190, 2011.
- [31] PAMAM dendrimer structures. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=9539880>>. Acesso em: 16 jun. 2011.
- [32] DE GENNES, P.G.; HERVET, H. Statistics of “starburst” polymers. **Journal of Physique Letters**, v. 44, p. 351-360, 1983.
- [33] BOSMAN, A.W.; JANSSEN, H.M.; MEIJER, E.W. About dendrimers: structure, physical properties and applications. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 1665-1688, 1999.
- [34] SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 1624-1637, 2010.
- [35] SCHULTE, A.; CHOW, R. H. A simple for insulating microelectrodes using anodic electrophoretic deposition of paint. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3054 – 3058, 1996.
- [36] HENGSTENBERG, A. Spatially resolved detection of neurotransmitter secretion from individual cells by means of scanning electrochemical microscopy. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 40, p. 905-908, 2001.

[37] MARKEN, F.; EKLUND, J.C.; COMPTON, R.G. Voltammetry in the presence of ultrasound – can ultrasound modify heterogeneous electron-transfer kinetics. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 395, p. 335-339, 1995.

[38] BORGMANN, S.; RADTKE, I.; ERICHSEN, T.; BLÖCHL, A.; HEUMANN, R.; SCHUHMANN, W. Electrochemical high-content screening of nitric oxide release from endothelial cells. **ChemBioChem**, v. 7, p. 662–668, 2006.

[39] MISKO, T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p.11-16, 1993.

[40] ALENCAR, W.S.; CRESPILO, F.N.; SANTOS, M.R.M.C.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JR., O.N.; SILVA, W.C. Influence of film architecture on the charge-transfer reactions of metallophthalocyanine Layer-by-Layer films. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 12817-12821, 2007.

[41] FERREIRA, M.; ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Layer-by-Layer and Langmuir-Blodgett films from nanoparticles and complexes. In: NALWA, H. S. (Ed.). **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**. Los Angeles: American Scientific Publishers, 2003; p 441-465.

[42] BIESAGA, M.; PYRZYN'SKA, K.; TROJANOWICZ, M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. **Talanta**, v. 51, p. 209–224, 2000.

[43] BRUCE, P.G.; LISOWSKA-OLEKSIK, A.; LOS P.; VINCENT, C.A. Electrochemical impedance spectroscopy at an ultramicroelectrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 367, p. 219-283, 1994.

[44] SIQUEIRA, JR., J.R.; GASPAROTTO, L. H. S.; OLIVEIRA, JR. O. N.; ZUCOLOTTO, V. Processing of electroactive nanostructured films incorporating carbon nanotubes and phthalocyanines for sensing. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 24, p. 9050–9055, 2008.

CAPÍTULO III – MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA MISTA PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os avanços provenientes da nanociência e nanotecnologia em estudos para aplicação em medicina e áreas correlatas promoveram mudanças em diversas áreas da pesquisa, entre elas a eletroquímica. Surge um novo campo para pesquisas: a *bioeletroquímica*, que se preocupa em estudar processos de transferência de carga entre biomoléculas e transdutores, útil para o desenvolvimento de biossensores e biocélulas combustíveis, por exemplo. No entanto, o maior desafio é conseguir reproduzir efeitos biológicos de biomoléculas fora do seu ambiente natural, sem que afetem propriedades importantes como: sítios catalíticos, estrutura molecular e atividade enzimática ^[1]. Várias enzimas têm sido imobilizadas em diferentes transdutores para aplicações como biossensores, sendo responsáveis por catalisar reações químicas que geram substâncias que podem ser estudadas por processos de redução e oxidação na superfície de eletrodos ^[2,3].

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), define-se biossensor como um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica específica das reações bioquímicas de enzimas e de outras biomoléculas, por meio um elemento transdutor que pode produzir sinais elétricos, térmicos ou ópticos ^[4]. No caso do biossensor enzimático, o componente biológico faz o reconhecimento da substância procurada por meio de uma reação química, gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa e, por exemplo, uma mudança de estado de oxidação. O transdutor converte esse sinal em uma resposta mensurável como corrente, potencial e variação de temperatura. Em princípio, qualquer

componente biológico pode ser combinado com algum transdutor para produzir um biossensor.

Geralmente, os biossensores podem ser classificados conforme a natureza do transdutor: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, piezoelétrico, óptico ou térmico. Os biossensores amperométricos são os mais utilizados, uma vez que são mais rápidos, sensíveis e precisos. Os biossensores também são classificados em gerações quanto ao mecanismo utilizado na transferência eletrônica. Existem atualmente três gerações de biossensores amperométricos. Os biossensores de primeira geração, conhecidos como os eletrodos de oxigênio desenvolvidos por Clark e Lyons, onde o sinal é gerado pela redução do O_2 . Além disso, alguns biossensores de primeira geração utilizam mediadores redox naturais como o FADH. Os biossensores de segunda geração utilizam mediadores redox sintéticos como o tetratíafulvaleno (TTF), os nanotubos de carbono, ou as nanopartículas (livres em solução ou imobilizadas com a enzima) para diminuir o potencial de detecção e consequentemente reduzindo a interferência causada por outros compostos. Por fim, os biossensores de terceira geração atuam por meio de transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo (transdutor) e o centro ativo da enzima ^[1,2,4]. A figura 3.1 mostra um esquema da transferência eletrônica para as três gerações de biossensores.

Figura 3.1. Esquema de transferência de elétrons em diferentes gerações de biossensores amperométricos: (a) primeira geração, mediadores redox naturais, (b) segunda geração, mediadores redox sintéticos; (c) terceira geração, transferência eletrônica direta ^[5] (S= substrato enzimático, P= produto da reação enzimática e M= mediador de elétrons).

Para obter um biossensor com sensibilidade e estabilidade satisfatórias, a enzima deve estar adequadamente ligada ao suporte para facilitar a transferência de elétrons. Portanto, a imobilização da enzima sobre o transdutor é uma das etapas mais importantes na preparação de um biossensor. Atualmente existem diferentes métodos de imobilização de enzimas. Um deles é por adsorção, onde a imobilização é realizada por interações de van der Waals ou ligação de hidrogênio entre o suporte e a enzima ^[1,2]. Um outro exemplo é o aprisionamento físico por uma membrana, nesse caso a imobilização acontece durante o processo de reticulação de um polímero fazendo com que a enzima fique livre dentro de orifícios da rede polimérica^[1,2]. Outro caso é a ligação covalente entre grupos funcionais da enzima e do suporte, muito parecido com a ligação da enzima à superfície funcionalizada por SAM ^[1,2]. A ligação covalente cruzada utiliza reagentes funcionais como o glutaraldeído. E, por fim, o aprisionamento em matriz polimérica, onde a enzima é confinada em uma membrana permeável ao analito ^[1,2].

Diante de novas tecnologias para o desenvolvimento de transdutores para aplicação em biossensores, Vargo e colaboradores ^[6] investigaram a dependência da distância entre o analito em solução até a superfície do eletrodo, e da cinética na transferência eletrônica para a reação redox da proteína *azurin*, adsorvida em eletrodos modificados com um filme de nanopartículas de ouro. O filme era composto por clusters de nanopartículas ligadas covalentemente em formato de rede com ditióis. Essa montagem foi desenvolvida como uma plataforma alternativa aos métodos tradicionais de formação das SAMs ^[1] para o emprego em biossensores. Os resultados sugeriram que as plataformas de clusters de nanopartículas de ouro com ditióis podem ser usadas como plataforma de adsorção para análises em eletroquímica. A arquitetura pode acomodar maior quantidade de proteínas e aumentar o sinal faradaico do sensor ^[6]. Porém, apesar de parecer uma ótima alternativa aos métodos de

análise, a técnica é muito trabalhosa e demorada, dificultando uma possível aplicação para sistemas comerciais.

É possível obter um biossensor com sensibilidade e estabilidade satisfatórias utilizando as monocamadas auto-organizadas SAMs (do inglês *self-assembled monolayers*), que auxiliam no entendimento dos processos de transferência eletrônica em escalas nanométricas. Algumas vantagens dessa modificação são: caráter dielétrico, formação rápida e reprodutível, difícil desorção em soluções, e principalmente a flexibilidade dos grupos funcionais dos alcanotíóis utilizados. Outra vantagem das SAMs é a possibilidade de obtenção de superfícies hidrofóbicas ou hidrofílicas, além da estabilidade por longos períodos, permitindo uma grande quantidade de medidas confiáveis ^[7]. Porém, a utilização das SAMs é sempre aliada ao uso de mediadores de elétrons para facilitar o transporte de carga do seio da solução para a superfície do eletrodo (denominado um biossensor de segunda geração). Além disso, o uso de agentes reticulantes químicos como o glutaraldeído é amplamente empregado, tanto para a imobilização como para a estabilidade da enzima sobre a superfície modificada. No entanto, a reprodutibilidade associada ao uso do glutaraldeído é pobre, e em muitos casos ocorre perda significativa da atividade da enzima ^[7,8].

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos transdutores para biossensores eletroquímicos podem fornecer um meio de melhorar a robustez do sensor sem sacrificar a transferência eletrônica ou seu desempenho. Um estudo desenvolvido por Phares e colaboradores ^[9], verificaram a influência do tamanho de três alcanotíóis no desenvolvimento de um genossensor sem perda significativa da transferência eletrônica. Nesse estudo, os pesquisadores compararam o sinal e a estabilidade dos biossensores de DNA fabricados usando um alcanotiol de seis carbonos e outros dois alcanotíóis com estrutura molecular em formato de âncora, os trihexiltiol (um do tipo rígido e outro flexível). Os resultados mostraram que os alcanotíóis em formato de âncora apresentaram uma transferência

eletrônica mais eficiente. E, para os três casos, houve um aumento de especificidade e seletividade no biossensor. Da mesma forma, os biossensores apresentaram excelente estabilidade de temperatura e robustez para as detecções eletroquímicas ^[9].

Com o objetivo de estabelecer uma nova arquitetura na construção de biossensores visando contornar os problemas existentes ao uso de mediadores e reticulantes, utilizamos nesse trabalho de doutorado uma nova plataforma à base de monocamadas mistas de alcanotióis, que ainda não havia sido aplicada à biossensores. A propriedade estrutural promovida pela mistura de dois alcanotióis de diferentes tamanhos faz com que a estrutura em formato de ilhas seja um condutor eficiente ^[7]. Nesse caso, o alcanotiol de cadeia carbônica curta atua como intermediário da transferência eletrônica entre a molécula da enzima e a superfície do eletrodo, enquanto o alcanotiol de cadeia carbônica longa atua como suporte enzimático.

Para que a nova arquitetura pudesse ser aplicada, a escolha da enzima modelo foi realizada de acordo com suas propriedades físico-químicas. A enzima acetilcolinesterase (AChE) foi escolhida devido às suas características de carga. Além disso, a AChE é muito utilizada no desenvolvimento de biossensores amperométricos com base no modelo de inibição da atividade da enzima para determinação de pesticidas da classe dos carbamatos e dos organofosforados. O pesticida acopla-se ao sítio ativo da enzima AChE inibindo a entrada do substrato enzimático, acetilcolina no sítio ativo da enzima, para que ocorra a reação enzimática. Os biossensores de inibição da AChE mostram alta sensibilidade na detecção de pesticidas, onde a diminuição da atividade enzimática é uma medida quantitativa do pesticida. No caso dos biossensores de inibição, a escolha da enzima é feita com base no mecanismo do efeito tóxico dos pesticidas nos seres vivos. As colinesterases promovem a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, conforme reação 1:

Os efeitos tóxicos da exposição aos pesticidas se manifestam devido à inibição de colinesterases presentes nos sistemas nervosos. Como consequência, há um acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, desencadeando uma síndrome com sinais e sintomas gerados pela estimulação excessiva dos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos ^[10].

A estrutura espacial da enzima é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de biossensores, pois em muitos casos, a estrutura enzimática apresenta uma densa carga ao redor do próprio sítio ativo ^[11]. De acordo com Sussman e colaboradores ^[11], a estrutura da AChE está diretamente relacionada com as funções das interações superficiais. Nesse estudo, sugere-se que o polo existente na AChE atrai as cargas positivas do substrato para dentro do sítio ativo. Em termos gerais, a superfície aromática das redondezas do sítio ativo serve como uma espécie de rota de afinidades fracas, na qual o substrato pode passar e mover-se até se alojar no sítio ativo via interação catiônica. A estrutura cristalográfica da enzima AChE pode ser observada na figura 3.2. Shafferman e colaboradores ^[11,12] mostraram que os resíduos de aminoácidos ao redor da entrada do sítio ativo da AChE tem a maior contribuição de carga para o dipolo produzido na enzima. Em outras palavras, enquanto o lado do sítio ativo da AChE facilita interações catiônicas, o lado oposto promove interações aniônicas. A protonação e desprotonação do lado oposto da enzima afetam os grupos amino que podem interagir com os grupos carboxílicos da superfície do eletrodo desenvolvidos nesse trabalho.

Figura 3.2. (A) Estrutura cristalográfica da enzima Acetilcolinesterase tipo VI-S ^[11,13]. (B) As linhas do campo (em amarelo) são originadas a partir da região de potencial negativo, no fundo do sítio ativo. Átomos em azul destacam a entrada do sítio ativo ^[14].

Em nossa nova abordagem, um arranjo de ultramicroeletrodos formados pela mistura de dois alcanotióis foi utilizado para aumentar a transferência eletrônica através dos alcanotióis de cadeia menor enquanto os alcanotióis de cadeia maior promoviam suporte para a estrutura enzimática ^[7,14]. O método é baseado na combinação das cargas que os grupos da superfície do eletrodo e da estrutura enzimática possuem ^[11]. Essa abordagem foi possível devido ao polo positivo dos grupos amino na região do sítio ativo da enzima, enquanto o lado oposto oferece um polo negativo que facilita as interações com os grupos carboxílicos das moléculas do alcanotiol ácido 11-mercaptoundecanóico (11-AMU), especialmente quando a AChE é solubilizada em pH 6,5, abaixo do seu ponto isoelétrico (pI), que é 7,0.

A interação eletrostática entre a enzima e a monocamada tornou possível a construção do biossensor utilizando apenas as cargas envolvidas em cada grupo funcional exposto à solução, sem a utilização de agentes reticulantes para promover as ligações. O procedimento utilizado na construção do biossensor é a interação dipolar. Devido às propriedades físico-químicas da enzima e dos grupos funcionais das moléculas de 11-AMU, a nova plataforma

para biossensores foi aplicada nesse sistema, a fim de avaliar a nova abordagem na construção de biossensores sem o uso de mediadores e/ou reticulantes químicos.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes e Soluções

Os alcanotióis ácido 11-mercaptoundecanóico (11-AMU) e 2-mercaptoetanol (C_2OH), a enzima acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7, tipo VI-S, 425,94 U mg^{-1}) tipo *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) e o substrato iodeto de acetiltiocolina (ATI) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O pesticida Carbaril com 99% de pureza foi obtido da Bayer. Álcool etílico absoluto anidro (etanol) 99,9% e hexacianoferrato de potássio (II) são da Merck e Sigma-Aldrich, respectivamente. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18 M Ω cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

Soluções do substrato iodeto de acetiltiocolina (ATI) utilizadas nas medidas eletroquímicas foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS) pH=6,5. Soluções de ATI 3,0 mmol L^{-1} foram preparadas diretamente na cela eletroquímica em 20 mL de PBS. As soluções de substrato e a solução da enzima para o recobrimento do eletrodo não foram armazenadas, sendo preparadas na hora de serem utilizadas, principalmente do substrato, devido à sua hidrólise espontânea por ação da luz e temperatura ^[10].

Soluções estoque do pesticida carbaril 0,1 mmol L^{-1} foram preparadas em acetonitrila. Estudos preliminares ^[10] demonstraram que a quantidade de acetonitrila utilizada nas células de incubação deve ser inferior a 15% do volume total, a fim de não interferir na resposta do biossensor. Soluções de carbaril nas concentrações de 0 a 1,75 $\mu mol L^{-1}$ em PBS pH=6,5

foram preparadas a partir da solução estoque $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para a construção da curva analítica.

3.2.2 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato PGSTAT da Autolab[®] (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands) equipado com software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands). Utilizou-se uma cela eletroquímica convencional de vidro borossilicato, com compartimento único de 25 mL, com tampa de PTFE contendo orifícios de encaixe para três eletrodos e um quarto orifício para a entrada e saída de $\text{N}_2(\text{g})$, com o objetivo de desaerar a solução. Um disco de ouro (2 mm de diâmetro) embutido em PTFE foi utilizado como eletrodo de trabalho, com $0,03 \text{ cm}^2$ de área geométrica e fator de rugosidade de 4,0, determinado pela carga do pico voltamétrico da redução do AuO em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ [15]. Foi utilizado um contra-eletrodo de platina de 2 cm^2 de área geométrica e um eletrodo de $\text{Ag/AgCl/KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrodo de referência. As medidas foram realizadas a 25°C . Antes de cada análise, as soluções foram desaeradas borbulhando-se $\text{N}_2(\text{g})$ da AGA por cerca de 15 minutos.

3.2.3 Pré-tratamento do Eletrodo

Inicialmente as superfícies dos eletrodos de ouro sofreram um tratamento químico, pela imersão dos eletrodos em uma solução “piranha” ($1:3 \text{ H}_2\text{O}_2\text{-H}_2\text{SO}_4 \text{ conc.}$), por 5 minutos. Posteriormente, os eletrodos foram extensamente enxaguados com água ultrapura. Após o tratamento químico, as superfícies de ouro passaram por uma limpeza mecânica consistindo de polimento em lixa d’água com granulometria 2000, seguida de um polimento em politriz,

até que as superfícies apresentassem um aspecto espelhado e, então, os eletrodos foram enxaguados e sonicados em etanol por 5 minutos para remoção de partículas residuais. Finalmente, após lavagem com água ultrapura, os eletrodos de ouro foram limpos eletroquimicamente em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, entre os potenciais $-0,1$ a $1,7 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl/KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) durante 100 ciclos a 500 mV s^{-1} , seguido de mais 100 ciclos a 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos obtidos após cada limpeza eram comparados aos voltamogramas obtidos após a primeira limpeza de cada eletrodo, para assegurar a eficiência da limpeza superficial e reprodutibilidade da área eletroativa do eletrodo. Esse procedimento de limpeza da superfície foi o mais apropriado para obter uma superfície limpa, organizada e altamente reprodutível ^[7,16].

3.2.4 Preparação das SAMs e SAMs mistas na superfície de ouro

Após a limpeza eletroquímica, os eletrodos de trabalho foram imersos em solução etanólica $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do alcanotiol por 2 horas. Os eletrodos modificados foram submetidos à lavagem com etanol para remover as moléculas fracamente adsorvidas. Em seguida, os eletrodos foram utilizados nos experimentos eletroquímicos e/ou submetidos à segunda etapa de modificação. A modificação da superfície de ouro com a SAM_{mix} foi conduzida pela imersão por 2 horas do eletrodo de ouro em solução etanólica contendo uma mistura dos alcanotióis nas concentrações $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ 11-AMU e $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ C_2OH . Após 2 horas os eletrodos modificados foram lavados com etanol e água ultrapura. As caracterizações dos eletrodos modificados com as SAMs de um único componente e da SAM_{mix} foram realizadas em solução tampão BR pH 3 contendo o par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

3.2.5 Preparação do biossensor Au/SAM_{mix}/AChE

Após a formação das SAMs, os eletrodos foram imersos em solução 1,0 mg mL⁻¹ da enzima AChE deixando a adsorção da enzima ocorrer por aproximadamente 12 horas. Em seguida, os eletrodos foram armazenados em solução tampão pH=6,5 antes da sua utilização. Os estudos de inibição foram realizados pelo método de incubação. A resposta do biossensor foi determinada em PBS pH=6,5, para chegar a um sinal de estado estacionário. Então, o substrato da enzima ATI foi adicionado à solução tampão na concentração 3,0 mmol L⁻¹ (após estudos preliminares de otimização) ^[10]. As medidas amperométricas foram realizadas no potencial de 310 mV por 200 s.

3.2.6 Determinação Amperométrica do pesticida

O desempenho do biossensor foi avaliado pelo método de inibição frente ao pesticida carbaril. Para isso, diferentes concentrações do pesticida foram utilizadas na incubação do biossensor em uma cela de incubação. Uma solução estoque de carbaril em acetonitrila com concentração 10 mmol L⁻¹ foi utilizada nas adições na cela de incubação de 10 mL em PBS pH 6,5. Os experimentos amperométricos foram conduzidos em cela eletroquímica contendo solução 3,0 mmol L⁻¹ de ATI preparado diretamente em 10 mL de PBS pH 6,5. O biossensor Au/SAM_{mix}/AChE foi testado pela curva amperométrica i-t em potencial de 310 mV (versus Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹). Para isso, o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE foi imerso em solução de ATI e a corrente de pico foi observada como I₀. As medidas amperométricas foram realizadas no potencial de 310 mV por 200 s. Posteriormente, o biossensor foi lavado para remover o substrato da camada enzimática e imerso em soluções tampão contendo o inibidor, o pesticida carbaril, em diversas concentrações. De acordo com experimentos anteriores sobre a

investigação do tempo de incubação para a resposta amperométrica, foi observado que os melhores resultados foram alcançados após 10 minutos de incubação no pesticida. Após este tempo, o biossensor foi lavado e novamente foi determinada a resposta amperométrica da ATI em solução ^[10,17].

As porcentagens de inibição foram calculadas por meio da equação 1 pela corrente do amperograma obtida no tempo de 180 segundos:

$$I\% = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100\% \quad (1)$$

Onde I_0 é a corrente de pico do ATI no biossensor Au/SAM_{mix}/AChE, e I_1 é a corrente de pico do ATI no biossensor Au/SAM_{mix}/AChE com a inibição do pesticida (i_0 e i_1 são as respectivas correntes medidas antes e após a inibição). Para a curva analítica variou-se a concentração de carbaril entre 0 a 1,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados usando as equações 2 e 3, respectivamente:

$$LD = \frac{3 \times S_B}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_B}{b} \quad (3)$$

Onde S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes de 10 brancos, obtidas de cronoamperogramas em 310 mV, e b é o coeficiente angular da curva analítica ^[18].

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando o comportamento das diferentes SAMs frente a uma espécie redox foram obtidas informações sobre a estrutura e as propriedades das monocamadas formadas sobre a superfície de ouro policristalino. Esse comportamento é muito importante, pois nesse caso, a enzima irá interagir diretamente com os grupos funcionais da modificação, e quanto melhor o recobrimento da superfície de ouro com o alcanotiol, melhor a interação e orientação da enzima sobre este. É importante lembrar que o grau de interação de uma determinada molécula redox com a superfície modificada do eletrodo é controlado por propriedades químicas e físicas dessa espécie e pelas características relacionadas à organização e presença de irregularidades na SAM ^[19,20]. Para as caracterizações, optou-se por trabalhar com a espécie redox $K_4[Fe(CN)_6]$ em pH 3 para assegurar que as interações eletrostáticas não interferissem no entendimento da transferência eletrônica das moléculas na monocamada. De acordo com resultados de estudos preliminares, a espécie $K_4[Fe(CN)_6]$ apresenta-se carregada negativamente em pH 3, e ao entrar em contato com uma SAM composta por moléculas que contenham grupos carboxílicos e hidroxilas protonados, o seu processo de difusão não sofrerá interferências devido às repulsões entre as cargas das duas espécies, mesmo se as SAMs forem densas e bem empacotadas ^[7].

Foram realizadas medidas de voltametria cíclica do eletrodo de ouro sem a monocamada e também após ser modificado pelas SAMs, em solução tampão contendo $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[Fe(CN)_6]^{4-}$, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os resultados estão apresentados na figura 3.3.

Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ouro (■) sem modificação e modificado com as SAMs de: C₂OH (○), 11-AMU (Δ) nas concentrações 1,0 mmol L⁻¹ e a mistura 1,0 mmol L⁻¹ de 11-AMU + 0,12 mmol L⁻¹ de C₂OH (◇). Eletrólito composto por 4,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]⁴⁻ em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3, e velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

Na figura 3.3, observa-se que não há diferenças significativas nos valores de corrente para a SAM de C₂OH, comparada ao eletrodo de ouro, apenas uma pequena mudança nos potenciais de oxidação e redução. Estudos preliminares evidenciam que os elétrons passam através da monocamada de alcanotóis com 2 carbonos, diferentemente das monocamadas de alcanotóis com 11 carbonos por exemplo, onde observa-se um bloqueio total nos processos redox da espécie. Mais detalhes sobre esse estudo podem ser encontrados nos estudos de Cancino ^[7].

Um comportamento diferente é observado quando há a mistura entre o alcanotiol C₂OH com 11-AMU. Nesse caso, observa-se que as propriedades isolantes da monocamada de 11-AMU já não são as mesmas e observa-se uma tendência do voltamograma adotar um perfil sigmóide típico de um ultramicroeletrodo. Neste caso, a única explicação para o comportamento dos voltamogramas obtidos é de que ocorre a formação de “ilhas” de

moléculas de C₂OH envoltas por uma camada isolante de 11-AMU, isto é, sugere-se aqui a formação de uma monocamada composta por moléculas de C₂OH e por moléculas de 11-AMU. A formação de uma monocamada mista com essa característica facilita a transferência eletrônica através das moléculas de C₂OH, por isso foi adotada como um novo transdutor nesse trabalho.

A fim de confirmar os resultados obtidos pelos voltamogramas cíclicos, foram realizados estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica com os eletrodos acima. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Valores de resistência de solução, R_s , capacitância, C e resistência de transferência de carga, R_{ct} , por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos modificados com os alcanotiois*. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 MHz.

Alcanotiol	$R_s / \Omega \text{ cm}^2$	$C / \text{F cm}^{-2}$	$R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$
Au	265	$6,88 \times 10^{-6}$	428
C ₂ OH	268	$1,30 \times 10^{-7}$	766
11-AMU	265	$1,59 \times 10^{-7}$	130229
11-AMU+C ₂ OH**	260	$3,98 \times 10^{-7}$	15638

*concentração 1 mmol L⁻¹ e **concentração 1 mmol L⁻¹ de 11AMU + 0,12 mmol L⁻¹ de C₂OH.

Observa-se que o valor da resistência de transferência eletrônica do eletrodo modificado com 11-AMU é o mais elevado, fato relacionado ao bloqueio total da superfície do eletrodo de ouro, confirmando o resultado obtido pela técnica de voltametria cíclica descrito na figura 3.3. Os valores obtidos por meio da impedância eletroquímica para a SAM de 11-AMU mostram claramente que o transporte de íons através dessa monocamada não ocorre na escala de tempo do experimento, consequentemente, a SAM de 11-AMU apresenta características de um isolante iônico ^[21]. O valor de capacitância de $1,59 \times 10^{-7} \text{ F cm}^{-2}$ para a

monocamada de 11-AMU sugere que a superfície do eletrodo modificado com 11-AMU aproxima-se de um capacitor ideal, quando comparado com o valor de capacitância do eletrodo de ouro sem a monocamada.

No caso do eletrodo modificado com a SAM_{mix} de 11-AMU+C₂OH tem-se um valor de resistência de transferência eletrônica alto quando comparado à modificação com C₂OH, também de acordo com os dados da voltametria da figura 3.3, onde observa-se uma maior inibição dos picos do processo redox da espécie [Fe(CN)₆]⁴⁻, sugerindo uma maior resistência à transferência eletrônica através da monocamada. Já para a SAM do C₂OH, os valores de resistência de transferência eletrônica variam muito pouco em relação ao ouro liso. Assim, pode-se supor que essas variações não são significativas a ponto de indicar uma inibição da transferência eletrônica através da monocamada.

Após os estudos de caracterização, o comportamento eletroquímico do novo transdutor para biossensor foi investigado por voltametria cíclica com os eletrodos de Au, Au/SAM_{mix} e Au/SAM_{mix}/AChE. A figura 3.4 mostra as respostas eletroquímicas dos eletrodos de Au, Au-SAM_{mix} e Au/SAM_{mix}/AChE em solução de ATI 3,0 mmol L⁻¹ em tampão PBS pH 6,5 por meio de voltametrias cíclicas. Pela análise dos voltamogramas são observados um par de picos em E_{pa}= 510 mV e E_{pc}= 430 mV para os três casos. Esse processo eletroquímico é consequência da oxidação do iodeto na superfície do eletrodo. O iodeto está presente como contra íon na molécula de acetiltiocolina (iodeto de acetiltiocolina). Vale ressaltar que muitos artigos já publicados atribuem esse par de picos à hidrólise da acetiltiocolina, porém essa espécie não é eletroativa. Experimentos de adição de iodeto em solução (dados não mostrados) de ATI 3,0 mmol L⁻¹ em tampão PBS pH 6,5 mostram claramente o aumento dos picos de oxidação e redução referentes ao iodeto.

Figura 3.4. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de Au (■), Au/SAM_{mix} (○) e Au/SAM_{mix}/AChE (Δ) em solução de ATI 3,0 mmol L⁻¹. Eletrólito: PBS pH=6,5. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Além do processo redox do iodeto, é observado um processo anódico em 310 mV, no voltamograma referente ao biossensor Au/SAM_{mix}/AChE, diferentemente das outras arquiteturas. Nesse caso, o pico anódico em 310 mV corresponde à oxidação de tiocolina, a qual é produzida durante a reação enzimática entre o substrato ATI presente na solução e a enzima AChE imobilizada ^[22]. Foram construídos os biossensores Au/AMU/AChE, com uma monocamada do alcanotiol 11-AMU e o biossensor Au/C₂OH/AChE com uma monocamada do alcanotiol C₂OH, isto é, biossensores com SAMs de um componente. Isso foi necessário para confirmar que o pico anódico em 310 mV corresponde à oxidação da tiocolina promovida pelo biossensor Au/SAM_{mix}/AChE, e que o processo de transferência eletrônica é facilitado pela presença dos microeletrodos formados pelos alcanotiois.

A figura 3.5 mostra a diferença no comportamento das três arquiteturas. O voltamograma em vermelho mostra o pico de oxidação da tiocolina, produto da hidrólise do ATI, catalisada pela enzima AChE imobilizada sob Au/SAM_{mix}. A corrente de pico, $1,23 \times 10^{-5}$

A é cerca de 10 vezes maior se comparada à corrente dos biossensores construídos com um alcanotiol. Além disso, o potencial de oxidação para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE desloca-se negativamente comparado aos potenciais dos outros biossensores. Esse comportamento é relacionado à presença dos arranjos de microeletrodos que a mistura dos alcanotóis promove. Esse resultado mostra uma plataforma altamente sensível para a transferência eletrônica, porém, não muito catalítica para promover a reação em potencial mais baixo do que as estruturas simples.

A diferença nos valores de corrente da oxidação da tiocolina pode estar relacionada com a transferência de massa por difusão esférica semi-infinita, característica de microeletrodos ^[7], assim como a orientação da enzima quando adsorvida em uma plataforma de alcanotóis de cadeia carbônica longa. Já para a superfície totalmente recoberta com alcanotóis de cadeia curta, normalmente a enzima fica pouco orientada devido à baixa compatibilidade geométrica com a monocamada. Essa característica é bem discutida na literatura ^[23,24].

Figura 3.5. (A) Voltamogramas cíclicos dos biossensores Au/SAM_{mix}/AChE, Au/C₂OH/AChE e Au/11AMU/AChE em ATI 3,0 mmol L⁻¹ em PBS pH=6,5. (B) Voltamogramas cíclicos da parte selecionada em (A) dos biossensores Au/SAM_{mix}/AChE, Au/C₂OH/AChE e Au/11AMU/AChE nas mesmas condições anteriores. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Na figura 3.5B, observa-se que a oxidação da tiocolina no biossensor de C_2OH apresenta corrente de pico menor quando comparado às correntes do biossensor com uma plataforma de SAM_{mix} . No entanto, para a resposta de um biossensor construído com o alcanotiol 11-AMU, ocorre uma inibição da resposta da enzima, isto é, a monocamada com onze carbonos dificulta a transferência eletrônica do processo eletroativo do substrato ATI, para uma mesma faixa de potencial. Portanto, podemos comprovar que a nova plataforma se comporta como um excelente transdutor, facilitando a transferência eletrônica e aumentando a corrente quando comparada a monocamadas de um único alcanotiol. Atribui-se o comportamento altamente sensível da SAM_{mix} às ilhas formadas pelas moléculas de alcanotiois de cadeia carbônica longas e curtas na superfície do eletrodo.

Figura 3.6. Esquema da funcionalidade da SAM_{mix} na construção de um biossensor.

A proposta de transferência eletrônica para o transdutor de SAM_{mix} , é ilustrada na figura 3.6. Nesse caso, as moléculas do alcanotiol de cadeia carbônica maior ancoram a enzima, enquanto as moléculas de alcanotiois menores auxiliam no processo de transferência eletrônica. Acredita-se que esse transdutor possa ser aplicado para diversas enzimas e/ou anticorpos com o mesmo princípio de transferência eletrônica. Vale ressaltar que nesse caso, as SAM_{mix} não apresentaram um caráter catalítico, isto é, não houve uma grande diminuição

do potencial de oxidação da tiocolina. Contudo, observou-se um grande aumento na sensibilidade da corrente de oxidação.

Para verificar o comportamento da saturação enzimática, foram feitas variações na concentração do substrato ATI em função da corrente de oxidação da tiocolina.

Figura 3.7. Variação da corrente de oxidação da tiocolina obtida em função da concentração de ATI utilizando o eletrodo de Au/SAM_{mix}/AChE. A linha vermelha mostra o cálculo da constante de Michaelis-Menten e da corrente máxima da reação da enzima AChE por meio do ajuste não linear da corrente de oxidação da tiocolina em função da concentração de ATI para o biossensor de Au/SAM_{mix}/AChE. $K_M^{app} = 0,46 \text{ mmol L}^{-1}$ e $I_{máx} = 4,38 \text{ nA}$. Eletrólito: PBS pH=6,5.

Observa-se na figura 3.7 que a curva possui comportamento do tipo Michaelis-Menten, ou seja, típica de sistemas enzimáticos com o efeito da concentração de ATI na taxa de uma reação catalisada. Em concentrações muito baixas de ATI, a velocidade inicial de reação é quase proporcional à sua concentração e a reação é de primeira ordem. Entretanto, à medida que a concentração de ATI aumenta, a taxa inicial cresce menos, não sendo mais proporcional à concentração do substrato. Nessa região, as ordens das reações estão

misturadas. Com o posterior aumento na concentração de ATI, a taxa de reação torna-se essencialmente independente da concentração do substrato e aproxima-se de uma taxa constante. Nesses valores de concentrações a reação é de ordem zero e a enzima é tida como saturada. A saturação estabelece a hipótese de que AChE e a ATI reagem reversivelmente para formar um complexo, passo essencial na catálise da reação ^[17,22,23].

Para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) por meio de análise estatística de ajuste não linear pelo software *Origin*, como mostra a linha vermelha da figura 3.7. Essa constante é um parâmetro importante, que fornece informações sobre a cinética enzimática. Para isso, considerou-se a seguinte reação na superfície do eletrodo:

Segundo a equação de Michaelis-Menten, a cinética enzimática da reação acima pode ser descrita em princípio por:

$$V = K_2 [AChE][ATI]/K_M^{app} + [ATI] \quad (1)$$

Segundo a literatura ^[25], biossensores com alta sensibilidade possuem baixo valor de K_M^{app} e V elevado, o que representa que, quanto menor K_M^{app} , maior a atividade biocatalítica. A evolução da reação é representada pela cinética hiperbólica, de acordo com a figura 3.7. Quando a concentração de tiocolina é baixa a velocidade da reação é proporcional a sua concentração, representada por uma equação de primeira ordem, a equação 1 ^[25-27].

De acordo com o ajuste não linear, encontrou-se um valor de $K_M^{app} = 0,46 \text{ mmol L}^{-1}$ para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE, mostrando uma alta afinidade pelo transdutor. Esse valor de K_M^{app} é relativamente baixo quando comparado a $1,74 \text{ mmol L}^{-1}$ de um biossensor desenvolvido por Sem e colaboradores [28], que utilizaram como transdutor um eletrodo de platina modificado com perclorato de polivinilferroceno. Isso implica que o biossensor desenvolvido com um transdutor de SAM_{mix} apresenta uma configuração ideal para que a enzima catalise eficientemente a hidrólise da ATI, isto é, a enzima está operando em alta capacidade catalítica. A imobilização da enzima AChE no eletrodo modificado pela mistura binária de alcanotóis exibiu uma excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação da tiocolina sem adição de mediadores de elétrons. A resposta catalítica mostrou dependência linear para ATI entre as concentrações 0 a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

3.3.1 Inibição da enzima AChE com o pesticida carbaril

O pesticida carbaril é conhecido por inibir a reação entre a enzima AChE e o substrato acetiltiocolina através da ligação entre a hidroxila do resíduo de serina da enzima e o carbono do grupo amida da molécula do pesticida. Portanto, os pesticidas carbamatos têm sido amplamente utilizados como referência tóxica para testar biossensores de AChE [22]. As medidas de inibição foram realizadas de acordo com condições de saturação da enzima com o substrato. Em condições de saturação, a diminuição da resposta do biossensor após o contato com a solução de pesticida está relacionada apenas à enzima, sendo que a interação do inibidor não depende da transferência de massa do substrato e do inibidor da enzima [10,22]. Isso permite que seja determinada a sensibilidade máxima do biossensor à inibição do pesticida. De acordo com as condições especificadas acima, foi realizado um estudo sobre a

inibição da resposta do biossensor na presença do pesticida da classe dos carbamatos, carbaril, em solução de pesticida nas concentrações entre 0 a $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O tempo de incubação e a reativação são parâmetros chaves na aplicação do biossensor. Estudos preliminares realizados por Razzino ^[10], consideram 10 minutos o tempo suficiente com a melhor combinação entre sinal e tempo de incubação, considerando o tempo analítico e a sensibilidade das medidas amperométricas. Assim, foram determinadas curvas analíticas. A figura 3.8A apresenta os cronoamperogramas obtidos para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE em diferentes concentrações de carbaril. Enquanto a figura 3.8B apresenta a relação entre a porcentagem de inibição e a concentração do pesticida com variação entre 0 a $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 3.8. (A) Respostas amperométricas do biossensor Au/SAM_{mix}/AChE para diferentes concentrações de carbaril em PBS, pH = 6,5. Concentrações em ordem crescente (indicada pela seta) de carbaril: 0; 0,25; 0,75; 1,10; 1,2; 1,5 e $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica da inibição da AChE frente o pesticida carbaril em concentrações de 0,25 a $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS pH = 6,5. O valor de corrente foi coletado com um tempo de 180 s, onde o processo de difusão das espécies é constante.

As respostas de corrente em função do tempo para os cronoamperogramas da figura 3.8A mostraram-se dependentes da concentração do pesticida. Observa-se que a concentração

do pesticida e a inibição da resposta enzimática aumentam de maneira linear, com as porcentagens de inibição variando de 12,4% a 97,3%. A curva linear correspondente é $y = 5,73 \cdot 10^{-7}x - 3,62$ com coeficiente de correlação de 0,9678. O limite de detecção foi determinado considerando a variação padrão de 10 medidas amperométricas da solução do branco (S_B) e a inclinação da curva analítica como $LD = 3S_B/b$, de acordo com as normas da IUPAQ^[18]. O desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos foi de $S_B = 6,59 \times 10^{-9}$ A. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de $LD = 3,45 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $LQ = 1,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ ($b = 57,3 \mu A \mu mol^{-1} L$) respectivamente. Os valores encontrados para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE são menores se comparados aos descritos na literatura, indicando que a nova arquitetura proposta neste trabalho é eficaz.

A tabela 3.2 apresenta uma comparação entre os biossensores de AChE aplicados à inibição de carbaril encontrados na literatura.

Tabela 3.2. Comparação dos biossensores de AChE aplicados à detecção de carbaril

Biossensor	LD (mol L ⁻¹)	$\Delta[]$ (mol L ⁻¹)	Ref
Au/SAM _{mix} /AChE	$3,45 \times 10^{-10}$	0,25 a $1,75 \times 10^{-6}$	este trabalho
GC/[(PDDA-SWCNT)/AChE] ₅	$4,97 \times 10^{-15}$	$4,98 \times 10^{-14}$ a 10^{-9}	29
Au/SAM(C ₆ H ₁₃ SH)/MWCNT/AChE	$2,98 \times 10^{-9}$	$4,97 \times 10^{-9}$ a 10^{-6} $9,94 \times 10^{-6}$ a 10^{-5}	30
Au/3MPA/EDC/AChE-Glu	$4,47 \times 10^{-8}$	-	31
Au/AChE-CHIT	$1,49 \times 10^{-8}$	$2,48 \times 10^{-8}$ a $4,97 \times 10^{-7}$ $2,48 \times 10^{-6}$ a 10^{-5}	32
Grafite/TCNQ _{mediador} /PVA-SbQ/AChE	$4,00 \times 10^{-9}$	5×10^{-9} a 10^{-7} 2×10^{-7} a 10^{-4}	33
GC/CHIT/G/CdS/AChE	$3,48 \times 10^{-9}$	$9,94 \times 10^{-9}$ a 10^{-6}	34
(Pasta carbono+CoTsPc+oil)/Glu/AChE	$1,6 \times 10^{-8}$	0,8 a $10,0 \times 10^{-5}$	17

Os biossensores apresentados na tabela 3.2 apresentaram bons limites de detecção variando principalmente entre 10^{-8} e 10^{-9} mol L⁻¹. Porém, em muitos casos, uma corrente capacitiva grande é observada devido às várias camadas necessárias à construção do biossensor. O valor de limite de detecção baixo encontrado para o biossensor desenvolvido nesse trabalho é comparável ao obtido pelo biossensor eletroquímico a base de nanotubos de carbono [29] utilizando a técnica *layer-by-layer* e outros eletrodos com diferentes transdutores.

Contudo, no caso dos biossensores a base de nanotubos, a construção por meio dessa técnica é muito trabalhosa quando comparada ao desenvolvido nesse trabalho. E essa característica é levada em conta quando o biossensor desenvolvido é aplicado como dispositivo comercial, onde rapidez no processo de fabricação é um requisito fundamental. Um total de 50 medidas foi realizado em um período de 15 dias. O biossensor foi preservado em tampão PBS pH 6,5 e estocado em geladeira a 4 °C. A resposta do biossensor apresentou valor máximo nos primeiros dias, com posterior queda no valor. Após 15 dias o biossensor trabalhava com 75% do seu desempenho inicial.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O biossensor construído por meio da adsorção da enzima na superfície modificada com a SAM_{mix}, (Au/SAM_{mix}/AChE) apresentou bons resultados para detectar a hidrólise da tiocolina. A tiocolina pode ser detectada a 310 mV (Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹), em PBS pH 6,5, com um valor da constante de Michaelis-Menten aparente de $K_M^{app} = 0,46$ mmol L⁻¹. O valor baixo da constante sugere que a arquitetura empregada nesse trabalho oferece um ambiente favorável para a enzima operar com alta atividade catalítica. O que chamou mais atenção nesse trabalho foram os valores de LD = $3,45 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e LQ = $1,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para a determinação do pesticida carbaril, representando a alta sensibilidade que o transdutor oferece

para a reação enzimática. Assim, a principal contribuição desse trabalho foi desenvolver uma nova plataforma nanoestruturada, tendo em vista o entendimento dos processos de transporte de carga em SAMs mistas e sistemas biológicos.

3.5 BIBLIOGRAFIA

- [1] EGGINS, B. **Biosensors**: an introduction. New York: Wiley-Teubner, 1996. 212 p.
- [2] MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Bioinorganic Chemistry**, v. 10, p. 177-184, 2002.
- [3] CRESPILO, F. N. **Membranas eletroativas nanoestruturadas: estudo de transporte de carga e imobilização enzimática**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências: Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [4] NAGEL, B.; DELLWEG, H.; GIERASCH, L.M. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). **Pure Applied Chemistry**, v. 64, p. 143-168, 1992.
- [5] NEUGEBAUER, S. **Nanoporelektrodensysteme für signalverstärkte elektrochemische DNA-Sensoren und Immunoassays**. 2007. 214 f. Dissertação Mestrado - Ruhr Universität, Bochum, Alemanha, 2007.
- [6] VARGO, M.L.; GULKA, C.P.; GERIG, J.K.; MANIERI, C.M.; DATTELBAUM, J.D.; MARKS, C.B.; LAWRENCE, N.T.; TRAWICK, M.L.; LEOPOLD, C.M. Distance dependence of electron transfer kinetics for azurin protein adsorbed to monolayer protected nanoparticle film assemblies. **Langmuir**, v. 26, p. 560–569, 2010.
- [7] CANCELO, J.C. **Eletrodos modificados com camadas auto-organizadas de alcanotóis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [8] CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 441-456, 2002.
- [9] PHARES, N.; WHITE, R.J.; PLAXCO, K.W. Improving the stability and sensing of electrochemical biosensors by employing trithiol-anchoring groups in a six-carbon self-assembled monolayer. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 1095–1100, 2009.

- [10] RAZZINO, C.A. **Desenvolvimento, caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para a determinação de carbaril**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [11] SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 3–10, 2008.
- [12] SHAFFERMAN, A.; ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; BER, R.; BINO, T.; ARIEL, N.; OSMAN, R.; VELAN, B. Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. **EMBO Journal**, v.13, n.15, p. 3448–3455, 1994
- [13] PROTEIN data bank. Disponível em: < <http://www.pdb.org>>. Acesso em: 20 mar. 2011.
- [14] GILSON, M.K.; STRAATSMA, T.P.; MCCAMMON, J.A.; RIPOLL, D.R.; FAERMAN, C.H.; AXELSEN, P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. **Science**, v. 263, p. 1276–1278, 1994.
- [15] TRASATTI, S.; PETRII, O.A. Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, p. 711-734, 1991.
- [16] ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- [17] CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S. Determination of carbaryl in tomato "in natura" using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 40–46, 2008.
- [18] IUPAQ, A statistical overview of standard (IUPAC AND ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, p. 297-328, 1997.
- [19] MOLINERO, V.; CALVO, E. J. Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 445, p. 17-25, 1998.
- [20] JUN, Y. Y.; BENG, K. S. Electrochemical study of monolayers of heterocyclic thiols self-assembled on polycrystalline gold electrode: the effect of solution pH on redox kinetics. **Electrochemical Communication**, v. 6, p. 87-90, 2004.

- [21] JANEK, R. P.; FAWCETT, W. R.; ULMAN, A. Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au (111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes. **Langmuir**, v. 14, p. 3011-3018, 1998.
- [22] DEL CARLO, M.; COMPAGNONE, D. Recent strategies for the biological sensing of pesticides: from the design to the application in real samples. **Bioanalytica Reviews**, v. 1, p.159–176, 2010.
- [23] KOMERSOV´A, A.; KOMERS, K.; ZDRA´ZILOV´A, P. Kinetics of hydrolysis of acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 157-158, p. 353-434, 2005.
- [24] ION, A.C.; ION, I.; CULETU, A.; GHERASE, D.; MOLDOVAN, C.A.; IOSUB, R.; DINESCU, A. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructurechitosan composite material for organophosphate pesticides. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 817–821, 2010.
- [25] MOLINERO, V.; CALVO, E. J. Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 445, n. 1-2, p. 17-25, 1998.
- [26] FINKLEA, H. O. Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes. In: BARD, A. J.; RUBINSTEIN, I. (Eds.). **Electroanalytical Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 109-335.
- [27] BARTLETT, P.N. **Bioelectrochemistry**: fundamentals, experimental techniques and applications. New York: Wiley, 2008. p. 478.
- [28] SEN, S.; GÜLCE, A.; GÜLCE, H. Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 1261–1268, 2004.
- [29] FIRDOZ, S.; MA, F.; YUE, X.; DAÍ, Z.; KUMAR, A.; JIANG, B. A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water. **Talanta**, v. 83, p. 269–273, 2010.
- [30] DU, D.; WANG, M.; CAI, J.; TAO, Y.; TU, H.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing. **Analyst**, v. 133, p. 1790-1795, 2008.
- [31] PEDROSA, V.A.; CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S.; FREIRE, R.S.; BERTOTTI, M. Acetylcholinesterase Immobilization on 3-Mercaptopropionic Acid Self Assembled Monolayer for Determination of Pesticides. **Electroanalysis**, v. 19, p. 1415-1420, 2007.

[32] DU, D.; DING, J.; CAI, J.; ZHANG, A. Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, p. 145–150, 2007.

[33] NUNES, G.S.; JEANTY, G.; MARTY, J.L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 107–115, 2004.

[34] WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS–decorated graphene nanocomposite. **Analytica Chimica Acta**, v. 695, p. 84–88, 2011.

CAPÍTULO IV - MODELO DE MEMBRANA: ESTUDO DE NANOTOXICIDADE

4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O rápido progresso da nanomedicina, especialmente em áreas relacionadas à aplicações *in vivo*, tais como entrega controlada de medicamentos, imagens e diagnósticos, tem motivado o desenvolvimento de novos nanomateriais e sistemas que podem ser combinados com vários materiais biológicos para aplicações específicas ^[1-3]. No entanto, várias pesquisas relatam sobre a toxicidade de nanomateriais ^[4-6]. Estudos toxicológicos sugerem que os nanomateriais podem causar efeitos adversos à saúde, mas a fundamental relação causa-efeito ainda é indefinida. Muitos nanomateriais são capazes de interagir com componentes celulares, interrompendo ou alterando funções específicas, ou até mesmo causando a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como abordado no capítulo 2 ^[7,8].

As interações de nanomateriais com núcleos de células mitocondriais foram consideradas as principais fontes de citotoxicidade. De acordo com Unfried e colaboradores ^[9], nanomateriais como nanopartículas de prata revestidas com fulerenos, micelas, copolímeros em bloco e nanotubos de carbono são capazes de interagir com a mitocôndria induzindo a apoptose ou causando danos ao DNA. Devido à complexidade dos mecanismos envolvidos nas interações de nanomateriais e amostras biológicas, aspectos biofísicos são difíceis de serem investigados, principalmente em amostras naturais e em tempo real ^[6-9].

Apesar dos estudos por meio de cultura de células fornecerem informações de biologia molecular, essas não consistem em dados importantes sobre a caracterização química

estrutural e as interações no nível molecular desses sistemas com nanomateriais. O uso de biomoléculas como estruturas elementares no desenvolvimento de modelos de membrana tem recebido considerável atenção. A habilidade de biomoléculas anfifílicas se auto-organizarem possibilita a mimetização de estruturas de membrana celular para o desenvolvimento de modelos de membrana biomiméticas ^[10]. Dentro de aspectos físicos, a biomembrana representa uma estrutura anisotrópica e não-homogênea. Por apresentar essas características, o estudo de propriedades biofísicas de biomembranas é difícil. Por essa razão, diversos modelos de membrana biomimética têm sido desenvolvidos de forma artificial para esses estudos, o que inclui micelas, monocamadas, bicamadas de lipídios, lipossomos e filmes finos de lipídios produzidos por meio de fosfolipídios ^[10-12].

Nesse contexto, modelos de membrana construídos a partir de lipossomos, vesículas e filmes lipídicos são utilizados para estudar o mecanismo de interação de moléculas com proteínas, polímeros e fármacos com a superfície de uma membrana biomimética. Além disso, é possível simular fenômenos de transporte de materiais através da membrana e carreamento de moléculas em estruturas como os lipossomos. Atualmente, os modelos de membrana com filmes de Langmuir são muito utilizados para estudos de investigação no nível molecular ^[13-15]. Apesar dos filmes de Langmuir não mimetizarem a membrana celular como um todo, mas apenas sua metade, esse tipo de sistema possui vantagens como: o controle da composição da membrana, o controle do estado de compactação e da estrutura da monocamada, além de uma superfície plana, diferentemente de lipossomos que apresentam uma superfície com curvatura, o que facilita a criação de modelos para simulação ^[10,13-16].

As membranas biomiméticas são utilizadas como parte de sistemas modelo para estudar as interações entre os nanomateriais e sistemas biológicos, porque muitos parâmetros biofísicos podem ser avaliados experimentalmente. Por exemplo, o uso das monocamadas de Langmuir ^[13,16], onde tanto a composição lipídica quanto a subfase podem ser configuradas

para simular as condições biológicas necessárias e prever as possíveis interações *in vitro* ou *in vivo* que as membranas celulares podem sofrer na presença de nanomateriais ^[8]. A auto-organização de moléculas em duas dimensões é uma das propostas das monocamadas de Langmuir com moléculas de lipídios, as quais são utilizadas como modelo para o entendimento da organização de uma membrana biológica ^[16], além de adquirir informações sobre os processos de reconhecimento molecular ^[11,16].

Para entender como esse processo de reconhecimento ocorre, o princípio da técnica de auto-organização por monocamadas de Langmuir deve ser bem compreendido. Um dos parâmetros chave na análise dos resultados da técnica é a medida da pressão superficial pela área molecular da molécula anfifílica. A definição de pressão de superfície é a diferença entre a tensão superficial (γ) de um líquido puro, geralmente a água, que possui γ igual a $72,8 \text{ mN m}^{-1}$, a 25°C , e a tensão superficial do mesmo líquido contendo moléculas de caráter anfifílico na superfície:

$$\pi = \gamma_o - \gamma_m$$

onde γ_o representa a tensão superficial do líquido puro e γ_m é a medida da tensão superficial após a deposição de moléculas anfifílicas na superfície do líquido ^[11].

A pressão superficial pode ser medida de diversas formas, porém, a mais usual é pelo método de placa de Wilhelmy, que determina a força devido à tensão de superfície sobre a placa suspensa parcialmente imersa na subfase. Após o espalhamento das moléculas na superfície e a formação do filme, a tensão superficial tende a diminuir enquanto a pressão de superfície aumenta. Utilizando uma cuba de Langmuir é possível acompanhar a variação da pressão de superfície à medida que as barreiras movimentam-se, no sentido da redução da área compreendida entre elas. Quando a temperatura é mantida constante ao longo do processo, obtém-se uma isoterma de compressão *versus* a área molecular, como mostra a

figura 4.1. Para muitas moléculas anfifílicas como fosfolipídios e ácidos graxos, diferentes regiões da isoterma de pressão de superfície podem ser associadas a diferentes estágios de compactação do filme. A figura 4.1 apresenta uma isoterma típica do fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), com uma dupla cadeia carbônica hidrofóbica. Nesse caso, a pressão superficial está representada como uma função da área ocupada por molécula no filme.

Figura 4.1. Isotherma de π -A para o fosfolipídio DPPC com ilustrações da estrutura das moléculas nos diferentes estágios de compressão: gasoso, líquido-expandido (LE), líquido-condensado (LC) e sólido ^[16].

A análise dos resultados das isotermas de pressão superficial versus área molecular (π -A) fornece informações sobre a reorientação das moléculas no sistema bidimensional, sobre a existência de transição de fases (gasoso, LE, LC e sólido), além de informações das transformações conformacionais e sobre a estabilidade da monocamada na interface ar-água. O formato da isoterma depende da temperatura, da molécula anfifílica utilizada e da presença de compostos na subfase. Inicialmente as moléculas estão dispersas na interface, sem

interação uma com as outras, caracterizado como fase gasosa. Durante a compressão as moléculas começam a interagir, atingindo a fase líquida. Conforme a densidade de moléculas na superfície da subfase aumenta, ocorre a formação de arranjos regulares no filme, resultando em uma estrutura compacta na fase sólida. Quando utilizam-se filmes de fosfolipídios, a fase sólida é dividida em duas outras fases, a fase líquido-expandido (LE) e a fase líquido-condensado (LC). Outra característica das isothermas de lipídios é a existência de uma região de coexistência das fases LE e LC, dependendo da temperatura de trabalho. Diante dessas características observadas nas isothermas π -A, pode-se estudar interações moleculares e estados de agregação de materiais por meio da análise das curvas de pressão ^[13].

Devido à quantidade limitada de informações acerca da toxicidade de nanomateriais, a comunidade científica está cada vez mais apostando em novas metodologias de análise ^[17-19]. Os nanotubos de carbono (CNTs) ganham destaque pela capacidade de transporte combinada com a modificação adequada da superfície, o que pode levar ao desenvolvimento de um novo nanomaterial com aplicações terapêuticas, por exemplo, para o câncer ^[20]. No entanto, estudos realizados em ratos relatam o acúmulo de nanotubos de carbono em órgãos importantes, como fígado, pulmão e baço, o que pode causar efeitos nocivos à saúde ^[21]. Além disso, a toxicidade dos nanotubos de carbono pode depender de muitos fatores, como a concentração, a forma física e o grau de funcionalização da superfície.

Além dos nanotubos de carbono, os dendrímeros vem ganhando destaque desde a descoberta dos primeiros trabalhos abordando seu uso potencial em nanomedicina, incluindo nanossensores, sensores implantáveis e sistemas de entrega da droga. No entanto, a toxicidade *in vitro* da combinação de dendrímeros e nanotubos de carbono não tem sido sistematicamente investigada. Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* mostram a influência da carga dos nanomateriais na interação com membranas celulares. Por exemplo, Mecke e

colaboradores ^[22], demonstraram que alguns polieletrólitos catiônicos podem criar poros nas membranas celulares, resultando na eliminação do conteúdo citoplasmático e consequentemente a morte celular ^[22]. Com relação aos CNTs, pesquisas apontam que os nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) podem ser mais tóxicos do que os nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT) ^[23]. Essa característica deve-se ao diâmetro menor que o SWCNTs possui, o que poderia resultar em menor agregação e aumento da captação celular ^[23].

Magrez e colaboradores realizaram estudos sobre a toxicidade de nanomateriais à base de carbono como: nanotubos de carbono de multi-paredes, nanofibras de carbono, e nanopartículas de carbono, em função do raio e da superfície química desses materiais. A toxicidade foi testada *in vivo* por meio de cultura de células de linhagem tumoral. Os resultados mostraram que esses materiais são tóxicos em doses dependentes. Além disso, a citotoxicidade é aumentada quando a superfície desses nanomateriais é funcionalizada depois de tratamentos ácidos ^[24]. Miyawaki e colaboradores ^[25] estudaram a toxicidade *in vivo* e *in vitro* de nanotubos de carbono de paredes simples e nanotubos contendo um metal. Diferentemente dos estudos realizados por Magrez, os resultados apresentaram negativos a nanotoxicidade de SWCNT. Esses materiais foram inoculados em peles primárias e submetidas a testes de irritação conjuntiva e de sensibilidade. Resultados negativos de metagênese sugeriram que os SWCNT não são carcinogênicos. Além disso, doses letais para os hamsters submetidos aos testes foram de 2000 mg/kg de peso corporal, isto é, superdosagens jamais utilizadas para aplicações de nanomedicina ^[25]. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo de nanomateriais para que as aplicações destes em sistemas biológicos não acarretem em danos à membrana celular.

Poucos trabalhos relatam o entendimento das interações de nanomateriais com modelos de membrana. Um trabalho recente desenvolvido por Lin e colaboradores ^[26]

estudaram as interações entre nanopartículas de ouro (AuNp) em modelos de membranas por meio de bicamadas lipídicas de carga negativa e por simulações de dinâmica molecular. Os autores verificaram que as AuNp funcionalizadas com ligantes catiônicos penetraram as membranas negativas, gerando perturbações significativas nas bicamadas. Os lipídios em torno das nanopartículas foram desordenados e a superfície da bicamada apresentou algumas áreas com defeito. Além disso, foi observado um poro na bicamada, com um raio de aproximadamente 5,5 nm, o que poderia transportar as moléculas de água através da membrana. Os autores sugerem alguns fatores que podem eliminar a formação de buraco na bicamada, como a diminuição de ligantes catiônicos na AuNp, a redução de lipídios negativos na bicamada, a diminuição da tensão superficial e da temperatura, e a adição de uma alta concentração de sal ^[26].

Até o momento, não há muitas informações disponíveis sobre os efeitos de nanotubos complexados com dendrímeros poliaminoamida (PAMAM), que devem ser usados como nanocarreadores) em termos de sua toxicidade e sua interação com membranas celulares. Tais informações podem ser úteis para melhorar a aplicabilidade dos nanomateriais em biomedicina e reduzir a toxicidade resultante das interações biofísicas desses nanocomplexos com células e tecidos^[8]. Portanto, identificar as principais características físico-químicas que determinam a toxicidade do nanocomplexo SWCNT/dendrímero é relevante para melhor caracterizar, e possivelmente, controlar o seu potencial tóxico. Além disso, há a necessidade de explorar as interações entre os SWCNT e os componentes da membrana celular, como o fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

Esse capítulo tem como objetivo explorar e descrever as interações moleculares entre um modelo de membrana do fosfolipídio DPPC obtido pela técnica de Langmuir e o nanocomplexo de SWCNT-PAMAM. As interações entre a membrana e o nanocomplexo foram estudadas com diferentes técnicas, seguindo a metodologia e interpretação teórica de

trabalhos de colaboradores sobre compostos semelhantes. Para isso foram utilizadas a técnica de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e medidas simultâneas de cinética de absorção e pressão de superfície. Dessa forma, esse trabalho visa contribuir com estudos de nanotoxicidade de nanomateriais por meio de sistemas modelos utilizando monocamadas lipídicas que mimetizam membranas biológicas, avaliando suas interações e possíveis danos a saúde humana.

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Reagentes e Soluções

Foram obtidos pela Sigma-Aldrich os nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com ácido carboxílico (SWCNT-COOH) e os dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) das gerações 2, 4 e 6. O lipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) com 99% de pureza foi obtido da Avanti. Álcool etílico absoluto anidro (etanol) 99,9% e clorofórmio são da Merck e Sigma-Aldrich, respectivamente. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, etc), passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas medidas. Para isso, foi utilizada uma solução sulfonítrica [$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$ 1:1 (v/v)] com posterior lavagem exaustiva com água destilada, deixando ferver por 1 hora também em água destilada. Para as diluições foram utilizadas pipetas automáticas de 100-1000 µL e 20-200 µL (Huawei), todas com ponteiros volumétricos descartáveis de polietileno.

Foram preparadas soluções de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em clorofórmio e as demais soluções foram preparadas por diluição. As soluções eram preparadas a cada dia de trabalho. Foram preparadas soluções de PAMAM gerações 2, 4 e 6 com concentração 1 mmol L^{-1} em água ultrapura ou tampão PBS, dependendo do meio onde eram realizadas as medidas. Dispersões de nanotubo de carbono (SWCNT) 2 mg mL^{-1} foram preparadas em água ultrapura ou em tampão PBS.

Os nanocomplexos SWCNT-PAMAM de três gerações utilizados na concentração 2 mg mL^{-1} foram preparados pela agitação do SWCNT com solução de PAMAM por 1 hora. Um esquema do nanocomplexo é mostrado na figura 4.2. Em seguida, as soluções foram centrifugadas retirando o sobrenadante, e resuspendidas em PBS ou água ultrapura, dependendo do meio onde eram feitas as medidas.

Figura 4.2. Esquema da formação do nanocomplexo SWCNT com o dendrímero PAMAM de segunda geração.

4.1.2 Instrumentação e Metodologia

4.1.2.1 Formação das monocamadas de Langmuir

A técnica de Langmuir é baseada no espalhamento de uma substância anfifílica na interface ar-água. Essa substância deve apresentar as características de ser insolúvel, e apresentar um coeficiente de espalhamento favorável à ocorrência desse processo, ou seja, deve se orientar nessa interface de forma a minimizar sua energia livre. Além disso, a técnica

permite não apenas a análise de interações entre a substância formadora da monocamada, mas também com outras moléculas que se encontram na subfase ^[13,27,28]. A figura 4.3 mostra uma cuba de Langmuir típica.

Figura 4.3. Foto de cuba de Langmuir utilizada nos experimentos de modelo de membrana da KSV Instruments Ltda.

Para a realização dos experimentos, o fosfolípido DPPC foi dissolvido em clorofórmio, a uma concentração de 1 mmol L^{-1} . As variações de pressão superficial foram registradas em função da área disponível por molécula para a construção das isotermas de superfície em uma cuba de Langmuir – KSV. Os experimentos foram realizados à temperatura de $21 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para obter as isotermas de área-pressão superficial (π -A), foram espalhados $25 \text{ }\mu\text{L}$ do lipídio DPPC na superfície do tampão por meio de uma microseringa Hamilton. Após 10 minutos de evaporação do solvente orgânico, as barreiras foram comprimidas a uma velocidade de 10 mm/min até o colapso da membrana ^[13,28,29].

4.1.2.2 Efeito das nanopartículas nas isotermas de π -A

Para os estudos de cinética e obtenção das isotermas π -A das interações entre os nanocomplexos e os lipídios, concentrações dos nanocomplexos foram adicionadas à solução tampão presente na cuba. Em seguida, o lipídio foi injetado junto à interface como descrito anteriormente. O tempo para a cinética de adsorção das nanopartículas na monocamada foi considerado como 40 minutos, seguido da compressão da monocamada até seu colapso.

4.1.2.3 Medidas no BAM

Outra técnica que permite observar a morfologia de monocamadas e não necessita a adição de sonda é a microscopia no ângulo de Brewster. O procedimento experimental baseia-se na técnica de Langmuir, uma vez que o microscópio para as medidas no ângulo de Brewster fica acoplado a uma cuba. A figura 4.4 ilustra o equipamento utilizado. As microscopias no ângulo de Brewster (BAM) foram obtidas com um sistema BAM 2 Plus Nanofilm Technologies da NFT (Alemanha), utilizando os mesmos procedimentos experimentais descritos por Dos Santos Jr ^[13,30-32]. O princípio do BAM tem base no fato de que, para um feixe de luz p-polarizada incidindo sobre a superfície da água, no ângulo de Brewster, nenhuma luz é refletida. Portanto, nenhuma luz chega em uma câmera colocada na direção do feixe refletido. O ângulo de Brewster utilizado nos experimentos foi de 53°.

O ângulo de Brewster é determinado pelo índice de refração dos dois meios na interface. Por exemplo, a água e o ar formam uma superfície limpa ^[30-32]. Se um filme de Langmuir é formado na interface, o índice de refração local será ligeiramente alterado.

Figura 4.4. Foto da cuba de Langmuir com o microscópio no ângulo de Brewster (BAM) utilizado nos experimentos.

Posteriormente, alguma reflexão será produzida e a luz chegará à câmera. Uma imagem da estrutura da monocamada interfacial será formada por causa do contraste entre as regiões sem filme (regiões escuras - sem reflexão) e nos pontos onde a superfície da água é coberta com moléculas de filme (regiões brilhantes - reflexivo).

4.1.2.4 Medidas de potencial zeta das nanopartículas

Soluções de concentração $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de PAMAM e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de nanotubo de carbono foram preparadas pela diluição em água para as medidas de potencial zeta, utilizando equipamento Zetasizer Nano da Malvern, de laser vermelho no comprimento de onda de 633 nm.

4.1.2.5 Medidas de tensão e elasticidade dilatacional superficial por meio da técnica da gota pendente

A tensão superficial pode ser determinada baseada no formato de uma gota pendente. O formato da gota é determinado por uma combinação de efeitos da tensão superficial e gravidade, de modo que forças superficiais tendem a formar gotas esféricas, enquanto a gravidade tende a alongar a gota pendente. As vantagens deste método são inúmeras, uma vez que utiliza pequenas quantidades de amostra, além de a técnica cobrir um intervalo de tempo que pode variar de segundos até horas ou dias, sendo que processos bastante lentos também podem ser acompanhados ^[28].

A cinética de adsorção para diferentes empacotamentos dos lipídios foi determinada pelo método da gota pendente, empregando o método da análise do perfil eixossimétrico da gota (ADSA), usando um tensiômetro automático, modelo OCA-20, Dataphysics (Alemanha). Para os experimentos de elasticidade dilatacional, uma gota de 10^{-4} mol L⁻¹ de solução DPPC em clorofórmio foi formada com o auxílio de uma microseringa Hamilton tocando levemente a superfície da uma gota pendente de solução tampão PBS com ou sem os nanomateriais em uma concentração de 47 µg mL⁻¹. O volume da gota pendente era controlado para produzir diferentes pressões superficiais quando necessário. As mudanças das pressões de superfície devido à adsorção dos nanomateriais foram plotadas contra o tempo. Foram investigados três empacotamentos diferentes de lipídios: 10, 20 e 30 mN m⁻¹. De acordo com Marsh, o valor de 30 mN m⁻¹ corresponde ao empacotamento de uma biomembrana natural de lipídios ^[29].

Para as medidas de elasticidade dilatacional superficial, o mesmo aparato foi utilizado (OCA-20, Dataphysics), com o adicional de um sistema de oscilação de frequência e um software adequado para a aquisição dos dados. Os dados de elasticidade dinâmica da superfície foram obtidos utilizando uma oscilação periódica com uma amplitude de 0,1 mm (variação de área em relação $\Delta A/A$ foi de 5,5%) e uma frequência de 1,0 Hz após a tensão superficial atingir o equilíbrio. O efeito viscoso (elasticidade imaginária) para a elasticidade da superfície foi estimada a partir do ângulo de fase. Foi estabelecido como equilíbrio o

sistema que apresentava variação de tensão superficial menor que $0,5 \text{ mN m}^{-1}$ durante um intervalo de tempo de 20 minutos ^[28].

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Estudos de monocamadas de Langmuir com COOH-SWCNT e seus nanocomplexos com o dendrímero PAMAM

Inicialmente foram sintetizados os nanocomplexos de COOH-SWCNTs com dendrímeros PAMAM de três gerações, os quais geraram uma grande quantidade de grupos amida, amino e carboxila na superfície dos nanocomplexos ^[33]. Os resultados de medidas de potencial zeta mostraram que a densidade de carga dos nanocomplexos formados aumenta com a geração do dendrímero, como mostra os valores de potencial zeta na tabela 4.1. Os valores indicaram que o COOH-SWCNT puro tem um potencial zeta negativo de -38,1 mV. Porém, quando são formados os complexos entre COOH-SWCNT e PAMAM ocorre uma inversão nos valores de potencial zeta para valores positivos, isso provavelmente se deve a complexação dos grupos amina do dendrímero com os grupos carboxílicos do CNT. O complexo formado com o dendrímero PAMAM-G2 e COOH-SWCNTs apresenta um valor de potencial zeta de 87,4 mV, significativamente maior quando comparado ao valor de potencial zeta do COOH-SWCNT puro. Os complexos formados com os dendrímeros PAMAM-G4 e PAMAM-G6 têm potencial zeta ainda maior, de 368 mV e 451 mV, respectivamente. Esse aumento nos valores de potencial zeta ocorreu por causa do uso das diferentes gerações de dendrímero, o que fez aumentar o tamanho e a quantidade de cargas positivas nos nanocomplexos provenientes dos grupos amina da extremidade da molécula do dendrímero.

Tabela 4.1. Valores de potencial zeta (ξ) e a estimativa média do tamanho dos nanocomplexos de SWCNT e SWCNT-PAMAM em suspensão a 25 °C.

Sistema	Potencial zeta (mV)	Tamanho do nanocomplexo (Å)
SWCNT	-38,1	-
SWCNT- PAMAM G2	87,4	29
SWCNT- PAMAM G4	368	45
SWCNT- PAMAM G6	451	67

A análise do potencial zeta sugere que os grupos carboxílicos do COOH-SWCNTs foram convertidos em grupos amida, devido a complexação dos grupos amina dos dendrímeros PAMAM com os grupos carboxílicos do COOH-SWCNTs ^[34]. A solução de dispersão dos nanocomplexos exibiu excelente estabilidade na água devido à presença de grupos amina na superfície dos nanocomplexos SWCNT-PAMAM. Sabe-se que o tamanho, forma e a solubilidade dos nanotubos de carbono podem ser controlados por meio da síntese com dendrímeros de estrutura e composição predeterminadas. Muitos trabalhos utilizando essa abordagem, principalmente aplicados a carreamento de medicamentos, já foram publicados comprovando essa modificação ^[35,36].

Após a caracterização dos nanocomplexos, foram obtidas monocamadas de Langmuir com o lipídio DPPC na presença dos nanocomplexos de SWCNT-PAMAM na subfase. O lipídio DPPC foi escolhido como um componente do modelo de membrana, porque pertence a classe mais abundante de lipídios na membrana celular (fosfatidilcolinas zwitteriônico) de mamíferos. O uso desse tipo de lipídio para o estudo irá fornecer resultados importantes sobre a toxicidade desses materiais. A figura 4.5 mostra as isotermas de pressão superficial para o DPPC puro (em solução de PBS) e os efeitos de interação dos nanocomplexos SWCNT-PAMAM dispersos na subfase contendo o lipídio. As curvas de pressão superficial versus área molecular (πA) do DPPC puro em PBS mostrou um patamar em cerca de 10 mN m⁻¹ e entre

60 e 80 Å², que corresponde a uma fase de coexistência líquido-expandido/líquido-condensado (LE-LC). Além disso, a área mínima molecular para a monocamada lipídica correspondeu à pressão máxima da superfície de compressão, com valor de 54 Å², de acordo com a literatura [37]. Para os sistemas contendo SWCNT dispersos na subfase, a cinética de adsorção foi monitorada durante um período de 40 minutos antes da compressão da monocamada.

Na isoterma de pressão superficial do DPPC na presença de SWCNT na concentração de 47 µg mL⁻¹, observou-se que a região LE-LC estava em áreas moleculares entre 80 e 96 Å², diferente do observado para o lipídio puro, indicando uma expansão da monocamada promovida pela presença do SWCNT. O valor 96 Å² indica que os SWCNTs afetam o empacotamento dos lipídios, e as moléculas ocupam áreas maiores. Curiosamente, além do fato de que a presença de SWCNTs deslocou a curva para áreas moleculares maiores, o perfil da isoterma π -A permaneceu semelhante do obtido para a DPPC puro. Isso indica que a expansão da monocamada está relacionada provavelmente a uma repulsão eletrostática entre os SWCNTs carboxilados e os lipídios nesse valor de pH. Nos sistemas SWCNT-PAMAM, a complexação do SWCNT com o dendrímero induz uma superfície catiônica para o nanomateriais. A Figura 5.4 mostra que o sistema SWCNT-PAMAM G2 na subfase também mudou a isoterma π -A para maiores áreas moleculares em comparação com a isoterma π -A do lipídio puro, com algumas diferenças. O patamar correspondente à região LE-LC não foi bem definido. Além disso, a pressão da superfície no colapso (pressão máxima de compressão) difere um pouco do que a observada para DPPC puro, sendo quase 4 mN m⁻¹ mais baixos. Esses resultados podem indicar a adsorção/incorporação desse nanocomplexo na interface.

Figura 4.5. Isotermas de pressão superficial pela área molecular de uma monocamada de DPPC e DPPC com os nanocomplexos. O DPPC foi espalhado sobre a solução dos nanocomplexos e a compressão foi realizada depois de 40 minutos. Subfase: PBS, pH 7,4, $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração dos nanocomplexos foram de $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. As barreiras foram comprimidas a uma taxa de velocidade de 10 mm min^{-1} até o colapso da membrana.

Para os nanocomplexos contendo SWCNT-PAMAM G4 e SWCNT-PAMAM G6, as curvas de pressão de superfície foram semelhantes ao DPPC puro. Para SWCNT-PAMAM G6 em particular, uma pequena condensação de $3\text{ }\text{\AA}^2$ foi observada em 30 mN m^{-1} (figura 4.5). Para entender melhor esses resultados, duas características devem ser consideradas: a atividade de superfície dos sistemas e suas dimensões físicas. Os nanocomplexos presentes na subfase apresentam um caráter anfifílico. Assim, as interações entre estes e a monocamada de DPPC devem ocorrer por meio de interações eletrostáticas, resultando em uma atividade de superfície induzida pelos nanocomplexos. Isso ocorre para o SWCNT-PAMAM G2, onde esse tipo de adsorção foi observada. É importante notar que a curva de π -A para o nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2 inicia com uma pressão de superfície superior a zero por causa da adsorção do nanocomplexo, mesmo com um empacotamento lipídico baixo,

devido à atividade de superfície induzida. Sabendo que a incorporação do nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2 foi mais pronunciada, decidiu-se explorar com mais detalhes o efeito de dendrímeros puros e do nanocomplexo com PAMAM G2. Os resultados são mostrados na figura 4.6.

Figura 4.6. (A) Isotermas de pressão superficial para os nanocomplexos adsorvidos na subfase depois de 40 minutos. A concentração dos nanocomplexos de SWCNT e SWCNT-PAMAM G2 foram de 47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, pH 7,4, $T = 21^\circ\text{C}$. (B) Módulo de elasticidade dilatacional superficial (C_s^{-1}) para o fluido de membrana para SWCNT e SWCNT-PAMAM G2 em monocamada de DPPC com uma pressão de superfície inicial de 0 mN m⁻¹.

A partir das curvas mostradas na figura 4.6A, pode-se notar que o uso de PAMAM G2 afetou a isoterma π -A e expandiu a monocamada lipídica. A região LE-LC foi mantida, mas agora apareceu em cerca de 2 mN m⁻¹, que foi abaixo do ponto observado para o DPPC. Também vale a pena mencionar o fato de que a região líquido-condensado para DPPC e DPPC/PAMAM G2 apresentam-se paralelas. Esse efeito de PAMAM-G2 no filme lipídico foi devido ao nanocomplexo de SWCNT-PAMAM G2. A incorporação dos nanomateriais afetou a fluidez da monocamada.

Como pode ser visto pelo equilíbrio do módulo de superfície compressional (C_s^{-1}) ou no plano-elasticidade, definido como $-A (\delta\pi / \delta A)$, existem diferenças na compressibilidade

de monocamadas DPPC e nanocomplexos na subfase. O módulo de elasticidade (de equilíbrio) de um determinado material relaciona-se com a sua rigidez, uma vez que é calculado a partir do coeficiente entre a tensão e a deformação no regime elástico. Da mesma forma, o módulo de elasticidade dilatacional superficial bidimensional de equilíbrio (C_s^{-1}) deve ser tanto maior quanto mais condensado ou rígido for o filme. Entretanto, esta propriedade pode sofrer influências de processos difusivos quando determinado por processos dinâmicos ^[38].

Dois cenários podem ser distinguidos após a análise: i) para áreas moleculares altas, os valores de C_s^{-1} para a monocamada na ausência ou presença do nanocomplexo não ultrapassaram de 50 mN m^{-1} , indicando que a monocamada estava no regime líquido expandido ^[38], e ii) para áreas moleculares inferior a $80 \text{ \AA}^2$, uma distinção marcante entre as curvas foi observada. O valor máximo de C_s^{-1} para a monocamada DPPC aumentou significativamente a partir de $\sim 220 \text{ mN m}^{-1}$ a 350 mN m^{-1} na presença de PAMAM G2 disperso na subfase. Além disso, a compressibilidade máxima ocorreu com valores distintos da área molecular, indicando que a região mais condensada da monocamada apresentou maiores áreas moleculares na presença do dendrímero PAMAM G2. Para o sistema do nanocomplexo SWCNT PAMAM-G2, o valor de C_s^{-1} não alterou significativamente em comparação com os valores obtidos para DPPC puro. O valor de C_s^{-1} foi o mesmo que o dendrímero PAMAM G2 (59 mN m^{-1}), indicando que esse complexo não afeta a fluidez da membrana.

Uma das características da interação entre uma molécula e uma monocamada lipídica é que essa depende do empacotamento da monocamada. Assim, um parâmetro muitas vezes avaliado é a pressão de exclusão da superfície, ou seja, a incorporação máxima de uma molécula em uma monocamada. Esse parâmetro determina o valor da pressão de superfície em que a molécula é capaz de absorver/penetrar a membrana e, conseqüentemente, o valor da

pressão de superfície acima do qual a molécula começa a ser expulsa da interface. Dessa forma, foram avaliados três empacotamentos diferentes de lipídios a 10 mN m^{-1} , 20 mN m^{-1} , e 30 mN m^{-1} . As mudanças na pressão superficial ($\Delta\pi$) foram registradas em função do tempo para todos os sistemas para cada empacotamento lipídico pela técnica da gota pendente, e os resultados são apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) com os nanocomplexos em diferentes pressões: 10, 20 and 30 mN m^{-1} . Subfase: PBS, pH 7,4, T = 21 °C. Tempo de cinética: 40 minutos.

	Pressão Superficial (mN m^{-1})		
	10	20	30
SWCNT	3,45	15,71	12,04
SWCNT-PAMAM G2	5,96	8,77	12,42
SWCNT-PAMAM G4	5,60	6,75	8,36
SWCNT-PAMAM G6	5,08	5,05	7,57

Para o SWCNTs, a variação da pressão superficial com o nanocomplexo foi maior para uma pressão de superfície de 20 mN m^{-1} em comparação com os valores de pressão superficial dos outros lipídios. Os nanocomplexos de SWCNT-PAMAM apresentaram um processo de adsorção similar, em que um aumento na pressão de superfície resultou em um maior grau de incorporação do filme lipídico. Esse efeito foi ainda mais acentuado para o nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2. A figura 4.7 ilustra a cinética de adsorção para os sistemas de 30 mN m^{-1} .

Figura 4.7. Efeito dos nanocomplexos SWCNT e SWCNT-PAMAM sobre a pressão da superfície da monocamada de DPPC. Subfase: PBS, pH 7,4 e $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Concentração dos nanocomplexos: $47\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

A incorporação de proteínas e/ou polímeros ^[39,40] em uma monocamada geralmente é mais fácil a pressões de superfície baixas (π) e pode ser completamente impedida sobre o aumento de π . Como explicado anteriormente, a variação da pressão de superfície é uma medida de quanto tempo uma substância pode ser incorporada no filme lipídico. Por meio desse parâmetro (π), é possível inferir se uma molécula pode penetrar na membrana ou não. Os resultados para os nanocomplexos indicam que quanto maior o empacotamento dos lipídios, maior a incorporação do nanomaterial na membrana. Uma vez que esses nanomateriais não apresentam atividade de superfície em uma interface simples, a atividade de superfície induzida na presença da monocamada lipídica indica que quando o filme é mais compacto, maior a interação entre as espécies.

A análise acima revela uma dependência de incorporação do nanomaterial sobre o tamanho do nanocomplexos de SWCNT-PAMAM. O alto nível de incorporação no sistema SWCNT-PAMAM G2 provavelmente ocorre devido ao seu tamanho relativamente pequeno

(ver tabela 4.1). Depois de alcançar o equilíbrio de adsorção, as amostras foram submetidas a ciclos sinusoidais de compressão-expansão para determinar a elasticidade da superfície dilatacional do filme.

Esse parâmetro é importante para verificar como esses nanomateriais podem afetar a resistência mecânica da monocamada e a fluidez do filme. Os resultados são apresentados na tabela 4.3. Pode-se observar na tabela que os SWCNT, sejam complexados ou não, apresentaram um efeito similar sobre a monocamada de lipídios. A diminuição nos valores da elasticidade de superfície foi muito abrupta sobre a incorporação dos sistemas de nanotubos, indicando uma grande perda de estruturação do filme.

Tabela 4.3. Elasticidade de superfície dinâmica para a superfície da gota de solução tampão (PBS, pH 7,4, T = 21 °C) com uma monocamada de DPPC, DPPC/SWCNT e com os nanocomplexos de DPPC/CNT-PAMAM. Pressão superficial: 30 mN m⁻¹. Frequência: 1,2 Hz. Amplitude: 0,1 mm. A concentração dos nanocomplexos corresponde aos valores da cuba (47 µg mL⁻¹).

Sistema	Elasticidade (mN m ⁻¹)
DPPC	220
SWCNT	31,0
SWCNT- PAMAM G2	32,8
SWCNT- PAMAM G4	36,3
SWCNT- PAMAM G6	37,2

Resultados semelhantes foram obtidos para os estudos sobre o peptídeo antimicrobiano plantaricin 149 (Pln 149) ^[41]. A partir dos dados de elasticidade de superfície dilatacional para Pln 149 e monocamadas de dipalmitoilfosfatidilglicina (DPPG), observou-se que a elasticidade (E) aumentou com a concentração de peptídeos Pln 149 e ultrapassou o valor de elasticidade do lipídio DPPG puro, indicando a formação de uma monocamada rígida. No entanto, na concentração de 2,5 mM, o peptídeo acumulado na monocamada causa

a ruptura do filme lipídico, e os valores de E diminuem drasticamente. Nessa concentração, o peptídeo começou a desenvolver sua atividade biológica.

Os resultados para os nanotubos de carbono e seus nanocomplexos com dendrímeros sugerem que seu efeito sobre as membranas celulares são semelhantes aos Pln 149^[41]. Apesar das diferenças no comportamento entre os nanocomplexos, esses sistemas apresentaram uma interação com o lipídio que envolve uma perturbação/ruptura da membrana. Considerando os dados a partir de elasticidade da superfície dilatacional, é possível inferir que nenhuma outra molécula biologicamente ativa afeta o empacotamento dos lipídios nesta extensão, como o nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2.

4.2.2 Estudos da interação de monocamadas de Langmuir com nanomateriais por microscopia no ângulo de Brewster

Um estudo morfológico das membranas de DPPC foi realizado utilizando a microscopia no ângulo de Brewster (BAM). As micrografias foram obtidas nas mesmas condições das isotermas de Langmuir. Os sistemas estudados foram: DPPC puro, DPPC na presença de SWCNT, DPPC na presença de PAMAM G2 e do DPPC na presença do nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2. Os resultados da análise morfológica das monocamadas de DPPC sobre a subfase de tampão PBS são apresentados na figura 4.8.

Os filmes de DPPC exibiram uma característica morfológica bem definida, com domínios característicos que aparecem quando o filme passa da transição de fase líquido-expandido (LE) para líquido-condensado (LC). No início da compressão, a monocamada estava na fase de LE, e a imagem de BAM da figura 4.8A, mostra um filme completamente homogêneo.

Figura 4.8. Imagens de BAM de monocamada de Langmuir de DPPC em subfase de tampão PBS (pH 7,4). As imagens foram obtidas em diferentes pontos do filme sob compressão: (A) $0,5 \text{ mN m}^{-1}$, (B) $6,5 \text{ mN m}^{-1}$, (C) $10,6 \text{ mN m}^{-1}$, e (D) 19 mN m^{-1} . Concentração de DPPC = $1 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ e $T = 21 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A direção horizontal da imagem corresponde a 953 mm, e a direção vertical corresponde a 768 mm.

Com a compressão da monocamada, observa-se a formação de pequenos domínios (a uma pressão de superfície de $6,5 \text{ mN m}^{-1}$) que foram consistentes com as fases de coexistência LE-LC (figura 4.8B). Com o aumento das pressões de superfície os domínios começaram a coalescer (figuras 4.8C e 4.8D), e o filme tornou-se homogêneo na fase líquido-condensado. Esses resultados estão de acordo com resultados descritos na literatura ^[13,38]. A

adição da suspensão de SWCNT na subfase causou mudanças no comportamento morfológico das monocamadas de DPPC, como mostram as imagens na figura 4.9.

Figura 4.9. Imagens de BAM da interação entre DPPC-SWCNT monocamada de Langmuir formada por um tampão PBS subfase (pH 7,4) contendo $47 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SWCNT. Imagens foram tiradas em diferentes pontos do filme sob compressão: (A) 3 mN m^{-1} , (B) $7,1 \text{ mN m}^{-1}$, (C) $9,7 \text{ mN m}^{-1}$, (D) $10,4 \text{ mN m}^{-1}$ e (E) 19 mN m^{-1} . $T = 21 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A direção horizontal da imagem corresponde a 953 mm, e a direção vertical corresponde a 768 mm.

Na figura 4.9A observa-se que os domínios começam a nuclear-se em uma pressão superficial de 3 mN m^{-1} , semelhante ao caso de DPPC na subfase de PBS. Com o aumento da pressão superficial para 7 mN m^{-1} , aumentou também a densidade de domínios em diferentes

formas e tamanhos, menores em comparação com DPPC no tampão PBS com a mesma pressão superficial. Aumentando a pressão superficial para $9,7 \text{ mN m}^{-1}$, modificam-se os domínios, que eram característicos de monocamadas DPPC puro da figura 4.9A. É importante observar as formas circulares e estruturas menores que aparecem nos domínios lipídicos das micrografias. Estas estruturas são provavelmente aglomerados de SWCNT, pois foram melhor visualizadas nos domínios dos lipídios em pressões superficiais crescentes (figura 4.9D). Para a monocamada comprimida a 19 mN m^{-1} (figura 4.9E), os domínios da fase lipídica líquido-condensado começaram a coalescer. No entanto, os pequenos domínios devido aos SWCNTs permanecem no filme.

Com base nesses resultados, foram propostos dois diferentes tipos de interação entre a membrana e o nanocomplexo, como mostra a figura 4.10.

Figura 4.10. Esquema do modelo da membrana para o efeito de nanocomplexos de SWCNT PAMAM na pressão superficial da monocamada de DPPC. Dois tipos de interações podem ocorrer nesse sistema: (a) processo de adsorção por interação eletrostática e (b) incorporação através da membrana.

Em primeiro lugar, a interação pode ocorrer através de uma adsorção física do nanocomplexo sobre a membrana (a). Em outra possível interação, os agregados são incorporados através da membrana, formando uma estrutura no formato de poros, ligando os

ambientes extra e intracelular, alterando a permeabilidade da membrana (b). É importante notar que o segundo caso pode apresentar interessantes implicações biológicas, pois o conhecimento e controle do tipo de interação pode levar à formação, por exemplo, de canais iônicos ^[42], que são importantes para projetar potentes agentes bactericidas ^[43].

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Demonstramos que os nanotubos de carbono e seus nanocomplexos com dendrímeros PAMAM absorvem em filmes Langmuir de DPPC, formando interações locais estáveis. Uma expansão da monocamada promovida pela presença dos SWCNTs foi indicativa de que SWCNTs afetam o empacotamento dos lipídios. Além disso, a pressão de superfície de colapso dos nanocomplexos difere ligeiramente das observadas para o DPPC puro. Esses resultados indicam a adsorção/incorporação desse nanocomplexo na interface. Os resultados de elasticidade de superfície dilatacional indicaram que a presença de grupos carboxílicos no nanocomplexo afetam as interações com a membrana, causando uma diminuição na pressão de elasticidade e de superfície, indicando uma grande perda de estrutura de filme. As imagens de BAM indicaram que os nanomateriais são incorporados em toda a monocamada, sugerindo a formação de poros. A avaliação dessa interação no nível molecular pode abrir novas possibilidades em relação ao uso de nanomateriais em sistemas modelo de membrana. A compreensão da interação entre SWCNT-PAMAM e o modelo de membrana pode ser útil para a construção de poros como nanoestruturas em diferentes dimensões.

4.4 BIBLIOGRAFIA

[1] WILKINSON, J. M. Nanotechnology applications in medicine. **Medical Device Technology**, v. 14, p. 29-31, 2003.

- [2] DAVIS, S. S. Biomedical applications of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy. **Trends Biotechnology**, v. 15, p. 217-224, 1997.
- [3] KAWASAKI, E. S.; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, p. 101-109, 2005.
- [4] SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.
- [5] HOET, P. H.; BRUSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles- known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, p. 12-27, 2004.
- [6] WILLIAMS, D. The risks of nanotechnology. **Medical Device Technology**, v. 16, p. 9-10, 2005.
- [7] MAHMOOD, M.; CASCIANO, D. A.; MOCAN, T.; IANCU, C.; XU, Y.; MOCAN, L.; IANCU, D. T.; DERVISHI, E.; LI, Z.; ABDALMUHSEN, M.; BIRIS, A. R.; ALI, N.; HOWARD, P.; BIRIS, A. S. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 74-83, 2010.
- [8] FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion Biotechnology**, v. 18, p. 565-571, 2007.
- [9] UNFRIED, K.; ALBRECHT, C.; KLOTZ, L.; VON MIKECZ, A.; GRETHNER-BECK, S.; SCHINS, R. P. F. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. **Nanotoxicology**, v. 1, p. 52-71, 2007.
- [10] PEETLA, C.; LABHASETWAR, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, p. 1264-1276, 2009.
- [11] TRAKHTENBERG, S. Organized organic thin films: structure, phase transitions and chemical reactions. In *Thin films and nanostructures*, v. 34, p. 639-664, 2007.
- [12] GIRARD-EGROT, A.P., GODOY, S., BLUM, L.J. Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. 116, p. 205-225, 2005.

- [13] PAVINATTO, FELIPPE J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- [14] S. HONG, P. R. LEROUÉIL, E. K. JANUS, J. L. PETERS, M. M. KOBER, M. T. ISLAM, B. G. ORR, J. R. BAKER, M. M. BANASZAK HOLL. The interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, p. 728–734, 2006.
- [15] Y. ROITER, M. ORNATSKA, A.R. RAMMOHAN, J. BALAKRISHNAN, D.R. HEINE, S. MINKO. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces, **Langmuir**, v. 25, p. 6287–6299, 2009.
- [16] VOLLHARDT, D. Supramolecular organisation in monolayers at the air/water interface. **Mater Science Engineering C**. v. 22, p. 121-127, 2002.
- [17] GUO, L.; VON DEM BUSSCHE, A.; BUECHNER, M.; YAN, A.; KANE, A.B.; HURT, R.H. Nanotubes and its implications for nanotoxicity testing. **Small**, v. 4, p. 721–727, 2008.
- [18] FIRME, C.P.; BANDARU, P.R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, p. 245-256, 2010.
- [19] JI, S.; LIU, C.; ZHANG, B.; YANG, F.; XU, J.; LONG, J.; JIN, C.; FU, D.; NI, Q.; YU, X. Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1806, p. 29-35, 2010.
- [20] SINGH, S.; NALWA, H. S. Nanotechnology and health safety toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 3048–3070, 2007.
- [21] CHOU, C.C.; HSIAO, H.Y.; HONG, Q.S.; CHEN, C.H.; PENG, Y.W.; CHEN, H.W.; YANG, P.C. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. **Nano Letters**, v. 8, p. 437–445, 2008.
- [22] MECKE, A.; MAJOROS, I. J.; PATRI, A. K.; BAKER, J. R.; BANASZAK-HOLL, M. M.; ORR, B. G. Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: the roles of size and chemical functional group. **Langmuir**, v. 21, p. 10348–10354, 2005.
- [23] FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, p. 183-200, 2008.

- [24] MAGREZ, A., KASAS, S., SALICIO, V., PASQUIER, N., SEO, J.W., CELIO, M., CATSICAS, S., SCHWALLER, B., FORRO, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. **Nano Letters**, v. 6, p. 1121-1125, 2006.
- [25] MIYAWAKI, J., YUDASAKA, M., AZAMI, T., KUBO, Y., IJIMA, S. Toxicity of single-walled carbon nanohorns. **ACS Nano**, v. 2, p. 213-226, 2008.
- [26] LIN, J.; ZHENG, Y.; ZHANG, H.; CHEN, Z. A stimulation study on nanoscale holes generated by gold nanoparticles on negative lipid bilayers. **Langmuir**, v. 27, p. 8323–8332, 2011.
- [27] NOBRE, T.M., WONG, K., ZANIQUELLI, M.E.D. Equilibrium and dynamic aspects of dodecyltrimethylammonium bromide adsorption at the air/water interface in presence of [λ]-carrageenan. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 305, p. 142-149, 2007.
- [28] NOBRE, T. M. **Estudo da interação entre polissacarídeos sulfatados e substâncias anfifílicas**. 2007. 142 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- [29] MARSH, D. Thermodynamics of the interaction of proteins with lipid membranes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1286, p. 183–223, 1996.
- [30] DOS SANTOS JR, D.S.; PAVINATTO, F.J.; BALOGH, D.T.; MISOGUTI, L.; OLIVEIRA JR, O.N.; MENDONÇA, C.R. In situ UV–vis absorbance measurements for Langmuir films of poly[4'–[[2-(methacryloyloxy)-ethyl]ethylamino]-2-chloro-4-nitroazobenzene](HPDR13) azopolymer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 138–142, 2004.
- [31] HÖNING, D.; MÖBIUS, D.J. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 4590–4592, 1991.
- [32] HÉNON, S.; MEUNIER, J. Microscope at the Brewster angle: direct observation of first-order phase transition. **Review of Scientific Instruments**, v. 62, p. 936–939, 1991.
- [33] BOAS, U.; CHRISTENSEN, J. B.; HEEGAARD, P. M. H. **Dendrimers in Medicine and Biotechnology**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006. 182 p.
- [34] KIM, B.; SIGMUND, W. M. Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites. **Langmuir**, v. 20, p. 8239–8242, 2004.

- [35] KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 361–373, 2011.
- [36] ZENG, Y.L.; HUANG, Y.F.; JIANG, J.H.; ZHANG, X.B.; TANG, C.R.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly(amidoamine) dendrimer for mediator-free glucose biosensor. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 185-190, 2007.
- [37] COLHONE, M.C.; NOBRE, T.M.; ZANIQUELLI, M.E.D.; STABELI, R.G.; CIANCAGLINI, P. Incorporation of antigenic GPI-proteins from *Leishmania amazonensis* to membrane mimetic systems: Influence of DPPC/cholesterol ratio. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, p. 373-379, 2009.
- [38] DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K. **Interfacial phenomena**. 2nd ed., (Ed.) New York: Academic Press, 1963, p. 70.
- [39] NOBRE, T.M.; PAVINATTO, F.J.; COMINETTI, M.R.; SELISTRE DE-ARAÚJO, H.S.; ZANIQUELLI, M.E.D.; BELTRAMINI, L.M. The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1798, p. 1547-1555, 2010.
- [40] CASELI, L.; CRESPILO, F.N.; NOBRE, T.M.; ZANIQUELLI, M.E.D.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA, O.N. Using phospholipid Langmuir and Langmuir Blodgett films as matrix for urease immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p. 100-108, 2008.
- [41] LOPES, J.L.; NOBRE, T.M.; SIANO, A.; HUMPOLA, V.; BOSSOLAN, N.R.; ZANIQUELLI, M.E.D.; TONARELLI, G.; BELTRAMINI, L.M. Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* by Plantaricin 149 and investigation of its mechanism of action with biomembrane model systems. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1788, p. 2252-2258, 2009.
- [42] GHADIRI, M.R.; GRANJA, J.R.; BUEHLER, L. Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes. **Nature**, v. 369, p. 301-304, 1994.
- [43] FERNANDEZ-LOPEZ, S.; KIM, H.-S.; CHOI, E.C.; DELGADO, M.; GRANJA, J.R.; KHASANOV, A.; KRAEHNBUHL, K.; LONG, G.; WEINBERGER, D.A.; WILCOXEN, K.M.; GHADIRI, M.R. Antibacterial agents based on the cyclic D,L- α -peptide architecture. **Nature**, v. 412, p. 452-455, 2001.

5.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Se o desafio é aplicar as novas ferramentas de terapia e sistemas diagnósticos utilizando os nanomateriais em nanomedicina, devemos ter um olhar crítico de como o corpo humano irá processar esses nanomateriais, uma vez que essas nanopartículas serão sentidas como um corpo estranho. Espera-se que as reações contra esses nanomateriais não sejam iguais às produzidas contra vírus ou bactérias, pois nesse caso não temos enzimas ou anticorpos específicos contra esses agentes ^[1]. Os nanomateriais representam algo desconhecido para o corpo humano, mas quando estão dentro da circulação sanguínea (a primeira via de acesso em sistema de carreamento de medicamentos) são imediatamente sentidos, e rapidamente interagem com os componentes do sangue através de processos físicos, químicos e biológicos ^[2].

Essa interação pode ter efeitos sistêmicos negativos depois de certo tempo. Em muitos casos, os nanomateriais têm um tamanho que é aproximadamente o mesmo que o de uma proteína na forma tridimensional ^[2]. Dessa forma, a fixação de um nanomaterial com uma proteína, seja essa por adesão física ou atração eletrostática, pode causar: um alongamento de ligações químicas, uma alteração da morfologia da proteína e a desnaturação da estrutura proteica ^[2]. Essas interações podem causar o não reconhecimento de um composto legítimo pertencente ao organismo, o que pode ser o começo de uma doença imunológica.

Como mencionado, o termo *Nanotoxicologia* surge como um ramo importante da nanotecnologia, referindo-se ao estudo da interação de nanoestruturas com sistemas biológicos. A ênfase está nas relações entre as propriedades físicas e químicas, como

tamanho, forma, química de superfície, composição e agregação de nanomateriais na alteração das respostas biológicas ^[3,4]. Nos últimos cinco anos, as pesquisas em nanotoxicidade têm se concentrado em sistemas de cultura celular e ensaios com animais ^[2-5]. No entanto, os dados desses estudos ainda são pouco conclusivos, sendo necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o entendimento de tais efeitos ^[3-7]. Em sistemas *in vivo*, as interações das nanoestruturas com componentes biológicos são extremamente complexas devido à grande diversidade de fluidos biológicos, como as proteínas e lipossomos ^[2-7]. A compreensão das propriedades físicas e químicas das nanoestruturas e seu comportamento em situações *in vivo* pode fornecer uma base para avaliar a resposta tóxica, além de possibilitar o desenvolvimento de modelos experimentais para a avaliação da nanotoxicidade em sistemas biológicos ^[6,7].

Apesar do rápido progresso e da aceitação da nanobiotecnologia em diversas áreas, o potencial efeito na saúde humana e no meio ambiente, devido à exposição prolongada em vários níveis de concentração, ainda não foi estabelecido ^[8]. Para avaliar adequadamente os riscos que as nanopartículas trazem para a saúde, o ciclo de vida dessas partículas tem que ser avaliado, desde sua fabricação, armazenamento e distribuição, até sua aplicação e eliminação ^[5-8]. O impacto sobre os seres humanos ou o meio ambiente pode variar em diferentes estágios do ciclo de vida. Além disso, a resposta metabólica e imunológica induzida por esses materiais ainda não são compreendidas como um todo.

Ao falar sobre as nanopartículas é importante lembrar que estas quase nunca são monodispersas. Nesse caso, nanopartículas agregadas ou individuais possuem propriedades diferentes, o que dificulta a análise experimental. Como se comportam essas nanopartículas *in vivo* é uma das grandes questões que precisam ser resolvidas ^[3,6]. Não existem dados suficientes para saber com certeza se todas as nanopartículas podem ter efeitos indesejáveis sobre o meio ambiente e sobre os seres vivos em geral. Atualmente são descritas quatro rotas

de entrada das nanopartículas no corpo. As nanopartículas podem ser inaladas, ingeridas, absorvidas pela pele ou injetadas durante procedimentos médicos. Uma vez dentro do corpo, as nanopartículas são altamente móveis, podendo alojar-se em qualquer parte ^[7]. Até agora, nem as nanopartículas, nem os produtos e materiais que as contêm estão sujeitos a qualquer regulamentação.

As propriedades estruturais, químicas, elétricas e ópticas dos CNTs são exploradas por diversos grupos de pesquisa em nanomedicina. Em muitas aplicações previstas, o CNT seria diretamente injetado ou implantado no corpo, como para sistemas de entrega de medicamentos ^[7]. Segundo Alexandre Star, da Universidade de Pittsburgh nos Estados Unidos, um dos pioneiros no estudo da toxicidade de CNT por biodegradação, “efeitos negativos como resposta inflamatória, estresse oxidativo e a formação de radicais livres” foram encontrados como resultado das aplicações dos CNTs ^[9].

Dentre os diversos estudos de toxicidade de nanotubos de carbono que estão sendo testados, um dos mais aplicados é o uso de diferentes linhagens celulares *in vitro* para verificar sua potencial toxicidade. Monteiro-Riviere e colaboradores ^[10] estudaram o tratamento de queratinócitos humanos demonstrando que tanto SWCNTs quanto MWCNTs são capazes de internalizar em células e causar toxicidade celular ^[10,11]. Jia e colaboradores ^[12] realizaram testes com macrófagos alveolares e CNTs mostrando que SWCNTs foram mais citotóxicos do que MWCNTs após a exposição desses compostos em concentrações iguais nas células ^[12]. Bottini e colaboradores ^[13] realizaram estudos com células T humanas expostas a MWCNT oxidados, mostrando que as células morrem por tempo e dose dependente. Nesse caso é observado apoptose celular ^[13], isso também ocorreu em células renais expostas aos SWCNT ^[14].

Diante do potencial efeito tóxico de nanopartículas, especialmente de nanotubos de carbono, e da falta de regulação sobre tais efeitos, são necessárias novas metodologias

analíticas que auxiliem no entendimento e compreensão da nanotoxicidade desses materiais. Aliados aos estudos de nanotoxicidade por meio de modelos de membrana, nessa tese de doutoramento foram aplicados métodos da biologia celular para compreender o efeito que os SWCNTs e os nanocomplexos desses materiais com dendrímeros PAMAM provocam em células da linhagem C2C12. Espera-se que, com esse trabalho, uma nova visão sobre nanotoxicidade possa ajudar no entendimento e na formulação de regulação para o uso dessas nanopartículas, principalmente no território nacional.

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.1 Reagentes e soluções

Todos os materiais (balões volumétricos, espátulas, béqueres, etc) foram cuidadosamente limpos. Para isso foi utilizado uma solução sulfonítrica [$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$ 1:1 (v/v)] com posterior lavagem com água destilada, deixando ferver por 1 hora também em água destilada. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q, procedência Millipore Co. Para as diluições foram utilizadas pipetas automáticas de 100-1000 μL e 20-200 μL (Huawei), todas com ponteiros volumétricos descartáveis de polietileno.

Para os meios de cultura foram utilizados meios DMEM, soro fetal bovino e os antibióticos da Sigma-Aldrich e da Vitrocell (Campinas). Os dendrímeros PAMAM segunda geração e os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os demais reagentes foram de grau analítico PA.

5.1.2 Cultura celular

As células C2C12 cresceram em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 10% para controle e DMEM 2% para cultura com nanomateriais) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, sempre a 37 °C em ambiente úmido e a 5% CO₂. As células foram mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada 2 dias.

5.1.3 Nanomateriais para ensaio de toxicidade

Para os ensaios de nanotoxicidade em cultura celular foram utilizados os nanomateriais: nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT), dendrímero poliamidoamina geração 2 (PAMAM) e o nanocomplexo SWCNT-PAMAM. Os nanomateriais foram sintetizados pela agitação do SWCNT em solução de PAMAM por 1 hora. Em seguida, a solução foi centrifugada retirando o sobrenadante, e ressuspensa em tampão fosfato salino PBS pH 7,4 estéril. A concentração dos nanomateriais utilizada foi de 50 µg/mL cada, para poços com 100 µL de meio.

5.1.4 Ensaio de proliferação – Cristal Violeta

O ensaio com cristal violeta é útil para obter informações quantitativas sobre a densidade relativa de células aderidas em placa de cultura. Para esse ensaio foram removidos os meios de cultura dos poços e posteriormente lavados com PBS 1% estéril. Em seguida, adicionou-se 100 µL de etanol 70% por 10 minutos para fixagem da cultura. Após a remoção do etanol adicionou-se 40 µL de cristal violeta com tempo de incubação de 30 minutos. Após

o tempo de incubação os poços foram lavados e adicionados 100 µL de ácido acético por mais 30 minutos. A leitura de absorbância foi realizada com filtros de 540 e 690 nm.

5.1.5 Ensaio de inibição de adesão

Para o ensaio de inibição da adesão celular, foi imobilizada a fibronectina (1 µg/ 100 µL/ poço) diluída em ácido acético 0,1% por 12 horas em placa de 96 poços (Falcon, Pittsburg, PA) a 4 °C. Após esse tempo, foi feito o bloqueio dos poços com soroalbumina bovina (solução de BSA 1% solubilizada em tampão de adesão: HEPES 20 mM acrescido de NaCl 150 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹ e MnCl₂ 0,25 mmol L⁻¹, pH 7,4 200 µL/ poço) por 2 horas. O bloqueio foi feito com o intuito de certificar que a adesão das células fosse somente à proteína imobilizada nos poços, já que sobre o BSA não ocorre adesão celular. Após o bloqueio, as células (1x10⁵ células/mL) foram incubadas com os nanomateriais e tampão de adesão por 30 minutos a 37 °C. Após essa incubação as células foram transferidas para a placa de 96 poços, e incubadas por 60 minutos a 37 °C.

Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão (2x) para a retirada das células não aderidas, as células remanescentes foram fixadas com etanol 70% (100 µL), por 10 minutos. Em seguida, as células aderidas foram coradas com cristal violeta 0,5% (60 µL por 20 minutos). Após esse período, os poços foram lavados com PBS diversas vezes para retirada do excesso de corante. Por fim, as células coradas foram solubilizadas em SDS 1% (100 µL) por 30 minutos. A leitura da placa foi feita a 540 nm em leitor da absorbância Dynex. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata de três experimentos independentes.

5.1.6 Ensaio de fragmentação de DNA

Foram plaqueadas 5×10^5 células C2C12 em placas de 6 cm e essas foram tratadas com os nanomateriais durante 24 horas. Após o tratamento, as células foram soltas das placas com tampão de lise (Tris HCl 25 mmol L⁻¹, EDTA 25 mmol L⁻¹, triton (0,5%) e 10 µL de RNase) e coletadas em tubos *eppendorfs* os quais foram colocados em estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse tempo, adicionou-se 10 µL de proteinase K em cada *eppendorf* e colocados em banho seco a 65 °C por 1 hora. Às amostras foram adicionados 1 mL de uma solução equivalente de fenol:clorofórmio. Após agitação, os *eppendorfs* foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm. A fase superior foi transferida para outro *eppendorf*, e acrescentada 40 µL de acetato de sódio 3 mol L⁻¹ e 800 µL de etanol absoluto gelado. Após essa etapa, as amostras foram incubadas a -20 °C por pelo menos 12 horas. Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes descartados. Os *eppendorfs* com os pellets de DNA foram colocados em estufa a 37 °C por 15 minutos até secagem do material. O material foi ressuspensionado com 25 µL de água milliQ autoclavada, e 20 µL do material foram utilizados para aplicação em gel de eletroforese.

5.1.7 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada com o seguinte protocolo: o gel de agarose 1% (massa/volume) foi suspenso em tampão TBE (Tris, acetato e EDTA) e fervido em forno de microondas até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Brometo de etídio (EtBr) foi adicionado ao gel antes que esse estivesse polimerizado (1,2 µL de uma solução EtBr 25 mmol L⁻¹, para cada 30 mL de gel de agarose), para permitir a visualização do DNA após a eletroforese. O tampão usado para correr as amostras de DNAs nos géis de

agarose foi composto de 15% de tampão TBE 10x, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF e 30% de glicerol em água. A eletroforese foi corrida em tampão TBE 1x com aplicação de cerca de 90 volts. Os fragmentos de DNA foram separados de acordo com o tamanho e visualizados por marcação com brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta.

5.1.8 Protocolo FITC Annexin V

Os reagentes utilizados para avaliar a apoptose por meio da citometria de fluxo foram: *FITC Annexin V* (5 µL por teste) e iodeto de propídio (PI) utilizado como corante de ácidos nucleicos. O protocolo da Sigma-Aldrich recomenda usar até 10 µL por teste de uma solução 50 µg mL⁻¹ e um tampão 10x (0,1 mol L⁻¹ Hepes (pH 7,4), 1,4 mol L⁻¹ NaCl e 25 mmol L⁻¹ de CaCl₂). Os reagentes devem ser estocados a 4 °C.

O protocolo utilizado foi o recomendado pela Sigma-Aldrich, fabricante do kit, como descrito a seguir:

As células foram lavadas duas vezes com PBS frio e ressuspensas em tampão 1x até uma concentração de 1x10⁵ células/mL. Em seguida, foram transferidos 100 µL da solução de células para um tubo de cultura de 5,0 mL. A esse tubo foi adicionado 5 µL de *FITC Annexin V*. Em seguida, adicionou-se 10 µL de PI. A concentração ótima de PI pode variar com a linhagem da célula, sendo 10 µL de uma solução estoque de 50 µg mL⁻¹ a quantidade máxima que pode ser utilizada. As células são rotacionadas utilizando agitador e levadas para incubação por 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C) no escuro. Após o tempo de incubação foi adicionado 400 µL de tampão 1x em cada tubo. A análise por citometria de fluxo foi realizada dentro de 1 hora. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton-Dickinson San Jose, CA), com aquisição e análise no programa BD FACSDiva software.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Estudo da interação de nanomateriais com cultura de células

A linhagem de célula C2C12 é um subclone da linhagem de mioblastos C2 isolada de células satélite de ratos adultos. Os mioblastos de C2 e C2C12 são uma linhagem celular que exibe a maioria das características do mioblasto normal e é muito utilizada como modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. Por serem células satélites, as C2C12 são capazes de participar do processo de regeneração muscular, diferenciando-se em células precursoras miogênicas e em miofibras. Além disso, as células C2C12 são fundamentais para o processo de regeneração muscular e há evidências de que elas são capazes de diferenciar-se, *in vitro*, em células osteócitas e adipócitas no tecido muscular^[15].

Os resultados de uma possível citotoxicidade entre células e os nanomateriais à base de carbono foram avaliados por meio dos ensaios de proliferação celular, que indica a densidade relativa das células aderidas às placas; por meio de ensaios de inibição de adesão, para avaliar se esses compostos interferem de alguma forma na aderência à placa de cultura; por medidas de citometria de fluxo com o reagente anexina para a determinação de células apoptóticas e necróticas; e por fragmentação de DNA, para observar se as nanopartículas atingem o interior da célula causando então um possível efeito tóxico. Um desafio em estudos de toxicidade de nanopartículas é a pureza de nanopartículas empregadas para o estudo. As nanopartículas devem ser livres de reagentes utilizados nas etapas sintéticas. Para isso, as nanopartículas são exaustivamente lavadas após cada síntese com tampão PBS e ressuspensas em PBS estéril. Isso faz com que os experimentos sejam padronizados e que nenhum outro interferente possa agir, fornecendo um resultado falso positivo. Para a

realização dos estudos foi utilizada uma concentração padrão de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada nanomaterial.

5.2.2 Efeito sobre a morfologia das células

O primeiro e um dos mais perceptíveis efeitos da exposição de células a materiais tóxicos é a alteração na forma celular ou morfológica em uma cultura celular. As micrografias das células expostas aos nanomateriais: SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM são apresentadas na figura 5.1.

Figura 5.1. Micrografia das células submetidas aos nanomateriais: (A) Controle – células C2C12; (B) SWCNT $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C) SWCNT-PAMAM $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (D) PAMAM $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tempo de incubação 24 horas.

Aparentemente nenhuma mudança morfológica foi observada nas células saudáveis do controle e dos poços com as células contendo os nanomateriais. Nota-se que as células com os

nanomateriais cresceram de forma homogênea e com morfologia característica das células do controle. Apenas uma pequena mudança na confluência das células com o PAMAM foi observada, porém a morfologia aparentou normalidade. No geral, algumas células sob flutuação foram observadas, sugerindo a morte celular generalizada devido à necrose, principalmente das micrografias das figuras 5.1B e 5.1C.

5.2.3. Viabilidade celular

Ensaio de viabilidade são passos vitais em citotoxicologia, e explicam a resposta celular a um agente tóxico. Além disso, os ensaios dão informações sobre a sobrevivência da célula, morte e atividades metabólicas. Os ensaios de proliferação para avaliar a toxicidade de SWCNTs (figura 5.2) mostraram uma relação tempo dependente da queda na intensidade da absorbância em células expostas ao nanomaterial em relação as células do controle. Isso significa uma possível toxicidade em tempo dependente para os nanomateriais SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM entre 12 e 24 horas. Porém uma estabilidade para o complexo SWCNT-PAMAM é observado após 24 horas de exposição. Talvez para essa concentração não há efeitos nocivos após esse tempo de incubação.

Porém, um aumento na proliferação é observado após 36 horas de incubação para o SWCNT. Pode ser que, nesse caso, o conteúdo das células não foi significativamente afetado em 36 horas de incubação na presença dos nanomateriais. Uma estabilidade no valor de absorbância foi observada para o nanocomplexo SWCNT-PAMAM após 24 horas, e a mesma tendência foi vista para o PAMAM. Vale ressaltar que os efeitos adversos dos nanomateriais foram em relação tempo dependente. Aparentemente, após 24 horas de exposição as células não mostraram citotoxicidade significativa. Esse resultado pode estar atribuído à biocompatibilidade dos nanomateriais com as células.

Figura 5.2. Proliferação da linhagem celular C2C12 após incubação com nanotubos de carbono de parede simples - SWCNT, nanocomplexo - SWCNT/PAMAM e o dendrímero poliamidoamina de segunda geração PAMAM por (A) 12, (B) 24, (C) 36 e (D) 48 horas. Os valores com significância estatística foram atribuídos para $p < 0,05$, sendo os intervalos de confiança de *95%, **99% e ***99,9% (ANOVA one-way/Turkey). Quantidade de células distribuídas por poço 10^4 células. Concentração dos nanomateriais de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Um aumento na proliferação é observado após 36 horas de incubação para o SWCNT. Pode ser que, nesse caso, o conteúdo das células não foi significativamente afetado em 36 horas de incubação na presença dos nanomateriais. Uma estabilidade no valor de absorbância foi observada para o nanocomplexo SWCNT-PAMAM após 24 horas, e a mesma tendência foi vista para o PAMAM. Vale ressaltar que os efeitos adversos dos nanomateriais

foram tempo dependentes. Após 24 horas de exposição as células não mostraram citotoxicidade significativa. Esse resultado pode estar atribuído à biocompatibilidade dos nanomateriais com as células.

Observa-se uma pequena diminuição nos valores de absorbância das células incubadas com SWCNT, porém não podemos afirmar que tais efeitos sejam tóxicos, pois houve um aumento nos valores de absorbância após 48 horas de incubação. No caso do PAMAM, a diminuição na quantidade de células pode estar vinculada a efeitos tóxicos intrínsecos. Observando a absorbância referente ao nanocomplexo formado entre SWCNT-PAMAM, podemos considerar que as alterações não foram tão significativas quanto para o PAMAM isoladamente. Talvez a combinação entre esses dois sistemas não ocasionem efeitos nocivos, em caso de tratamento farmacológico.

Estudos realizados por Cui e colaboradores ^[14] revelaram que SWCNTs podem inibir a proliferação das células da linhagem HEK293. Essa inibição foi dependente do tempo e da concentração de SWCNT expostos as células ^[14,16].

5.2.4 Citometria de Fluxo

As principais mudanças que podem ocorrer em teste de citotoxicidade são: necrose e/ou apoptose. Morfologicamente, a necrose difere da apoptose pelo rompimento da membrana celular. As células necróticas não conseguem manter a integridade da membrana plasmática, extravasando seu conteúdo plasmático e podendo causar inflamação no tecido adjacente. Já na apoptose, a membrana celular permanece intacta, o que difere bastante das situações de necrose. Neste caso, a célula é eliminada rapidamente, de maneira que não haja tempo do seu conteúdo citoplasmático extravazar, isto é, uma morte celular desencadeada por

vários tipos de mecanismos visando eliminar células desnecessárias, excessivas, ou não desejáveis pelo organismo.

A citometria de fluxo, utilizando o marcador *anexina V* é usada para determinar quantitativamente a porcentagem de células dentro de uma população que podem sofrer ativamente apoptose. Esse comportamento se deve à propriedade que a célula tem de perder a assimetria de membrana perto da fase de apoptose. Em células apoptóticas, a membrana do fosfolípido fosfatidilserina (PS) é deslocada do interior da membrana plasmática para fora dela, consequentemente a exposição de PS na ambiente externo. A *anexina V* é uma proteína fosfolipídica dependente de cálcio que tem uma grande afinidade por PS, e essa afinidade é utilizada para identificar células apoptóticas com a exposição de PS. O iodeto de propídio (PI) é um padrão para viabilizar a citometria de fluxo e é usado para distinguir células viáveis das não viáveis. Células viáveis excluem o PI da interação com a membrana, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo PI. Células que são positivas para *FITC anexina V* e negativas para PI estão em estágio de apoptose e estão livres de necrose. Por outro lado, células que são positivas para *FITC anexina V* e PI estão no final do estágio de apoptose ou estão em estágio de necrose. Células que são negativas para *FITC anexina V* e PI estão vivas, livres de apoptose.

Dessa forma, podemos observar na figura 5.3 os resultados de citometria de fluxo das células em 24 horas de exposição a concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM.

Figura 5.3. Histogramas individuais representando o percentual de células controle C2C12 (A) fluorescentes obtidas após incubação de 24 horas dos nanomateriais (B) SWCNT, (C) SWCNT-PAMAM e (D) PAMAM na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. O posicionamento do marcador (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de células fluorescentes como controle interno.

As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando os histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de células. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência das células do controle (figura 5.3A). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores do percentual de células fluorescentes positivas para cada nanomaterial (figuras 5.3B, 5.3C e 5.3D). De acordo com os histogramas da figura 5.3, foi construída a tabela 5.1 com as porcentagens de células vivas dentro de uma população.

Tabela 5.1. Estatística dos valores de células vivas obtidos pela citometria de fluxo

Nanocomplexo	número de eventos	% total	% gate
Controle	10000	100,00	100,00
SWCNT	4005	40,05	40,05
SWCNT/PAMAM	2916	29,16	29,16
PAMAM	4422	44,22	44,22

De acordo com os resultados da tabela 5.1, os resultados do experimento com anexina-V indicaram que uma grande porcentagem de células foram positivas para apoptose e necrose na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanomateriais em 24 horas de exposição. Para o SWCNT, 60% da população de células C2C12 estão em processo de apoptose. Já para o nanocomplexo SWCNT-PAMAM 71% das células estão no estágio de apoptose, um aumento de 11% das células em processo de apoptose quando comparada as células expostas ao SWCNT por 24 horas. Nesse caso, apenas 29% das células estão vivas mostrando que o nanocomplexo apresenta uma alta toxicidade às células C2C12. Contudo, para o PAMAM observa-se um valor de 56% da população de células em apoptose em comparação com as células do controle. Uma quantidade muito parecida com o que foi observado para as células com SWCNT. Esses resultados poderiam ser interpretados como uma situação onde as células apresentam uma maior resistência à morte. Recentes estudos têm identificado apoptose como principal mecanismo de morte celular em exposição a nanomateriais ^[17].

5.2.5 Medidas de inibição de adesão

Esse ensaio visa testar o efeito da incubação das células C2C12 com os nanomateriais sobre a adesão das mesmas em fibronectina. Os poços revestidos com BSA foram utilizados como controle negativo de adesão (C-) em todos os ensaios. A adesão a fibronectina sem

adição dos nanomateriais foi considerada como 100% (controle positivo). Os resultados são apresentados na figura 5.4.

Figura 5.4. Porcentagem de mioblastos aderidos a fibronectina após incubação com os nanomateriais: SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM. O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle. Os resultados foram expressos como média de três experimentos independentes em quadruplicata. Concentração dos nanomateriais de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores com significância estatística foram atribuídos para $p < 0,05$, sendo os intervalos de confiança de *95%, (ANOVA one-way/Turkey).

Para os nanomateriais SWCNT e SWCNT-PAMAM houve uma pequena inibição à adesão à fibronectina. Porém considerando o desvio padrão da medida não houve inibição significativa. Diferentemente do PAMAM, que inibe a adesão em aproximadamente 40%. Talvez essa diferença na adesão das células C2C12 com o PAMAM à fibronectina possa estar relacionada as cargas positivas do dendrímero. A fibronectina é de uma família de glicoproteínas de elevado peso molecular, contendo cerca de 5% de carboidratos e que se liga a receptores proteicos da membrana celular. Nesse caso, pode ser que, por conter uma grande quantidade de grupos amina na superfície do PAMAM ocorra uma dificuldade na adesão das

células na fibronectina. Talvez a neutralidade da combinação entre o SWCNT e o PAMAM seja suficiente para que não ocorra inibição da adesão.

Esses resultados corroboram, de certa forma, com os dados obtidos por Cui e colaboradores, onde obteve resultados positivos para a inibição das células HEK293 com o SWCNT. Nesses resultados Cui e colaboradores, mostraram que os SWCNT podem diminuir a habilidade de adesão das células HEK293 com fibronectina ^[14].

5.2.6 Fragmentação do DNA

De acordo com os resultados de fragmentação de DNA apresentados na figura 5.5, não houve fragmentação de DNA para os três nanomateriais: SWCNT, SWCNT-PAMAM e PAMAM. No caso do nanocomplexo SWCNT-PAMAM, além de não ter fragmentação, uma certa quantidade de DNA ficou nos poços do gel. Isso pode estar relacionado as cargas do próprio gel (caráter aniônico) com as cargas positivas que o PAMAM promove ao nanocomplexo. Para o gel de eletroforese com o PAMAM, nenhuma banda de fragmentação de DNA foi observada. Nesse caso, uma leve banda caracterizando a não fragmentação é indicada pela seta branca. A banda com intensidade fraca deve-se a pequena quantidade de DNA disponível para a fragmentação, uma vez que o dendrímero PAMAM apresenta uma toxicidade maior em relação a viabilidade e proliferação celular. Uma outra possibilidade é a interação entre o gel de agarose com as cargas positivas do PAMAM, impossibilitando que a amostra de DNA se desloca-se pelo gel.

Os testes de fragmentação de DNA desse trabalho indicam que não houve fragmentação do DNA com as células C2C12 incubadas com o SWCNT. Os resultados dos géis de eletroforese são apresentados da figura 5.5.

Figura 5.5. Teste de fragmentação de DNA das células C2C12 (A controle) tratadas com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de (B) SWCNT, (C) SWCNT-PAMAM e (D) PAMAM por 24 horas a 37°C . Após a extração do DNA este foi analisado por gel de agarose.

Os resultados desses estudos corroboram com os testes realizados por Yamashita e colaboradores ^[18] que estudou os danos causados ao DNA das célula da linhagem A549 após exposição de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SWCNT e MWCNT por 24 horas. Os resultados mostraram que os MWCNTs podem causar danos ao DNA aumentando os riscos de atividade cancerígena. Isso pode estar relacionado com o comprimento e a espessura dos MWCNTs. Diferentemente do observado para os MWCNT, os resultados indicam que os SWCNT não

apresentam danos ao DNA ^[18,19]. Cui e colaboradores, também obteve o mesmo resultado com relação a fragmentação de DNA com a exposição das células da linhagem HEK293 com SWCNT ^[14].

Portanto, de acordo com os resultados da fragmentação de DNA é possível afirmar que, os nanomateriais estudados nesse trabalho não apresentam interações com o DNA para promover sua fragmentação.

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

No momento em que é difícil tirar conclusões gerais sobre a toxicidade do SWCNT por causa da escassez de resultados e sua variabilidade, como comprimento, composição e contaminação por metais, mais trabalhos sobre toxicidade *in vitro* são necessários para definir os fatores que impulsionam a toxicidade dos SWCNT. Os resultados desse estudo mostraram que os SWCNT e o nanocomplexo SWCNT-PAMAM apresentaram resultados diferenciados comparados ao PAMAM. Talvez o nanocomplexo apresente um aumento de toxicidade à cultura celular testada devido sua combinação com o PAMAM, principalmente levando em conta os resultados de citometria de fluxo e proliferação. Contudo, os resultados de morfologia celular apresentaram-se favoráveis ao nanocomplexo, isso é, com uma possível ausência de toxicidade nesse nanomaterial, diferentemente do relatado nos componentes individuais. Os resultados indicam que as conclusões sobre a toxicidade de SWCNT, de SWCNT-PAMAM e PAMAM contra células C2C12 podem ser fortemente ligados às cargas, ao tipo de material e como esse está disponível no meio testado.

5.4 BIBLIOGRAFIA

- [1] GATTI, A.M.; MONTANARI S. **Nanopathology**: the health impact of nanoparticles. Singapura: Pan Stanford Publishing, 2008. 295p.
- [2] MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; TRAN, C.L. **Nanotoxicology**: characterization, dosing and health effects. New York: Informa healthcare, 2007. 452p.
- [3] FISCHER, H.C.; CHAN, W.C.W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 565–571, 2007.
- [4] OBERDÖRSTER G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**. v. 267, p. 89-105, 2010.
- [5] SARGENT LM, REYNOLDS SH, CASTRANOVA V. Potential pulmonary effects of engineered carbon nanotubes: in vitro genotoxic effects. **Nanotoxicology**, v. 4, p. 396-408, 2010.
- [6] UNFRIED K, ALBRECHT C, KLOTZ L, VON MIKECZ A, GREYER-BECK S, SCHINS RPF. 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. **Nanotoxicology**, v. 1, p. 52-71, 2007.
- [7] BERGER, M. Nano-Society: pushing the boundaries of technology. In: O'BRIEN, P.; CRAIGHEAD, H. G.; KROTO, H. (Ed.). **RSC Nanoscience and Nanotechnology**. London: Royal Society of Chemistry, 2009, v. 8, p. 332.
- [8] PLATA, D.L.; GSCHWEND, P.M.; REDDY, C.M. Industrially synthesized single-walled CNTs: compositional data for users, environmental risk assessments, and source apportionment. **Nanotechnology**, v. 19, p. 185706, 2008.
- [9] ALLEN, B.L.; KICHAMBARE, P.D.; GOU, P.; VLASOVA, I.I.; KAPRALOV, A.A.; KONDURU, N.; KAGAN, V.E.; STAR, A. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. **Nano Letters**, v. 8, p. 3899-3903, 2008.
- [10] MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; NEMANICH, R.J.; INMAM, A.O.; WANG, Y.Y; RIVIERI, J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 377-384, 2005.
- [11] SHVEDOVA, A.A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A.R.; GANDELSMAN, V.Z.; MAYNARD, A.; BARON, P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 66, p. 1909-1926, 2003.

[12] JIA, G.; WANG, H.; YAN, L.; WANG, X.; PEI, R.; YAN, T.; ZHAO, Y.; GUO, X. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 1378-1383, 2005.

[13] BOTTINI, M.; BRUCKNER, S.; NIKA, N.; BOTTINI, N.; BELLUCCI, S.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; MUSTELIN, T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 121-126, 2006.

[14] CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M.; GAO, H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 73-85, 2005.

[15] FERREIRA, MARCOS PAULO PINHEIRO. Efeito da laserterapia de baixa potência sobre a viabilidade de células musculares. 2008. 25 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2008.

[16] MANNA, S.K.; SARKAR, S.; BARR, J.; WISE, K.; BARRERA, E.V.; JEJELOWO, O.; RICE-FICHT, A.C.; RAMESH, G.T. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. **Nano Letters**, v. 5, p. 1676-1684, 2005.

[17] MAILÄNDER, V.; LANDFESTER, K. Interaction of nanoparticles with cells. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 2379–2400, 2009.

[18] YAMASHITA, K.; YOSHIOKA, Y.; HIGASHISAKA, K.; MORISHITA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJIMURA, M.; KAYAMURO, H.; NABESHI, H.; YAMASHITA, T.; NAGANO, K.; ABE, Y.; KAMADA, H.; KAWAI, Y.; MAYUMI, T.; YOSHIKAWA, T.; ITOH, N.; TSUNODA, S.; TSUTSUMI, Y. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. **Inflammation**, v. 33, p. 276-280, 2010.

[19] DUKE, R.C., COHEN, J.J. AND CHERVENAK, R. Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 1442-1447, 1986.

A utilização de filmes finos por meio das técnicas *layer-by-layer*, SAM e Langmuir-Blodgett mostrou-se versátil, ou seja, foi possível aplicar as técnicas de auto-organização para diferentes situações. Os filmes LbL foram aplicados em ultramicroeletrodos de fibra de carbono para detecção de óxido nítrico. No desenvolvimento de sensores de NO[•], a seletividade é uma das características mais importantes, pois com isso, a detecção torna-se mais rápida e precisa. Esse requisito foi alcançado utilizando materiais como ftalocianina e dendrímeros de poliamidoamina na forma auto-organizada em dispositivos eletroquímicos, promovendo uma seletividade aos interferentes de NO[•], como nitrito, nitrato e peróxido de hidrogênio.

A auto-organização por meio das SAM_{mix} favoreceu o desenvolvimento de um transdutor para biossensor sensível. A construção de um biossensor de acetilcolinesterase com o transdutor de SAM_{mix} aumentou a transferência eletrônica em dispositivos eletroquímicos. O que chamou mais atenção nesse trabalho foram os valores de limite de detecção de LD=3,45x10⁻¹⁰ mol L⁻¹ e dos limites de quantificação, LQ=1,15x10⁻⁹ mol L⁻¹ para a determinação do pesticida carbaril, representando a alta sensibilidade que o transdutor oferece para a reação enzimática.

Por fim, o uso de filmes de Langmuir no desenvolvimento de modelos de membranas biomiméticas trouxe informações importantes sobre a nanotoxicidade de nanomateriais à base de carbono. Uma expansão da monocamada promovida pela presença dos SWCNTs foi indicativa de que SWCNTs afetam o empacotamento dos lipídios. Além disso, a pressão de superfície de colapso dos nanocomplexos difere ligeiramente dos observados para o DPPC puro. Esses resultados indicam a adsorção/incorporação desse nanocomplexo na interface. A

avaliação dessa interação no nível molecular abre novas possibilidades em relação ao uso de nanomateriais em sistemas modelo de membrana. Complementando os resultados de modelos de membrana, as técnicas da biologia celular, como citometria de fluxo, proliferação celular, inibição de adesão trouxeram informações importantes. Os resultados evidenciaram que a combinação entre SWCNT e PAMAM para a formação do nanocomplexo SWCNT-PAMAM G2, proporcionam um aumento na toxicidade comparando ao SWCNT. Um comportamento diferenciado do que relatado com SWCNT e PAMAM G2 individualmente. Os resultados indicam que as conclusões sobre a toxicidade de nanocomplexos e dos seus componentes individuais podem estar fortemente ligados ao tipo de material e como esse está disponível no meio.

A principal contribuição desse trabalho foi desenvolver novas aplicações e metodologias utilizando filmes finos auto-organizados, tendo em vista aplicações específicas desses sistemas em dispositivos para nanomedicina.

Ainda há muito que investigar utilizando sistemas auto-organizados, principalmente aplicados em nanomedicina. A seguir, são listadas algumas propostas para a continuação desse trabalho:

- 1- Melhorar a sensibilidade do sensor de $\text{NO}^\bullet$, utilizando nanopartículas para aumentar o desempenho catalítico.
- 2- Desenvolver novos biossensores utilizando o transdutor de SAM_{mix} para a detecção de produtos gerados na reação enzimática, diferentemente da inibição.
- 3- Estudar a interação de diferentes nanomateriais utilizando o modelo de membrana biomimética com diferentes fosfolipídios para avaliar a nanotoxicidade desses materiais.
- 4- Aplicar diferentes linhagens celulares em estudos citotóxicos de nanomateriais tendo em vista o desenvolvimento de novas metodologias para ampliar os conhecimentos sobre tais efeitos.