UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LILIAN MARIA PESSOA DA CRUZ CENTURION

**Interação de nanotubos de carbono com sistemas nanométricos e
biológicos: estudos experimentais e computacionais**

São Carlos
2015

LILIAN MARIA PESSOA DA CRUZ CENTURION

Interação de nanotubos de carbono com sistemas nanométricos e biológicos: estudos experimentais e computacionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada.
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos – SP
2015

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Centurion, Lilian Maria Pessoa da Cruz

Interação de nanotubos de carbono com sistemas
nanométricos e biológicos: estudos experimentais e
computacionais / Lilian Maria Pessoa da Cruz

Centurion; orientador Valtencir Zucolotto - versão
corrigida -- São Carlos, 2015.

147 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2015.

1. Nanotubos de carbono. 2. Biossensores. 3.
Nanotoxicidade. 4. Dinâmica molecular. 5. Citometria
de fluxo. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

Agradecimentos

À minha família, por permitir que eu seguisse a carreira acadêmica e por incentivar e financiar meus desejos científicos há muitos anos.

Ao professor Valtencir Zucolotto, por me admitir em seu grupo e proporcionar plena liberdade de escolha sobre os rumos da minha pesquisa.

Ao professor Mark Sansom, do Departamento de Bioquímica da Universidade de Oxford, por aceitar fazer uma parceria com uma doutoranda estrangeira sem nenhuma experiência computacional.

Ao Dr. Mickaël Lelimosin, por tornar meu projeto internacional possível e executável, pela paciência, por todos os ensinamentos sobre dinâmica molecular e pela amizade.

À Dra. Juliana Cancino Bernardi e à Valéria Spolon Marangoni, por contribuírem com a tese diretamente e pela amizade.

Ao Wagner Correr, ao Henrique Mendonça Faria e à Denise Basso Nakabayashi, por toda a ajuda no laboratório.

Aos meus colegas do GNano, pelos muitos anos de convivência, pelo companheirismo, pela ajuda no laboratório e pelos inúmeros churrascos e momentos de diversão.

Aos meus queridos amigos de Oxford e do SBCB, pelo grande aprendizado e pelos momentos de descontração que ajudaram a fazer do meu período no Reino Unido o tempo mais feliz de minha vida. Em especial, agradeço a Maíra Fresqui, Maria Musgaard, Amanda Buyan, Lukas Stelzl e Prafulla Aryal pela amizade que levarei sempre comigo e a Antreas Kalli por todo o apoio técnico durante a execução do meu projeto.

Aos funcionários do Instituto de Física de São Carlos, pela prestatividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

Resumo

CENTURION, L. M. P. C. **Interação de nanotubos de carbono com sistemas nanométricos e biológicos: estudos experimentais e computacionais.** 2015. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Esta tese de doutoramento relata estudos sobre a interação de nanotubos de carbono com nanomateriais, biomoléculas e células, com o propósito de obter informações relevantes para o desenvolvimento de biossensores e para o campo da nanotoxicologia. No primeiro estudo, foram produzidos e caracterizados três tipos de eletrodos modificados com filmes multicamadas obtidos através da técnica de automontagem. Estes filmes continham nanotubos de carbono de parede simples (SWNT), ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc) e o dendrímero poli(amidoamina) de geração 2 (PAMAM G2), e estes polieletrólitos foram organizados nos seguintes sistemas: (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito SWNT/PAMAM G2 / NiTsPc). Medidas de voltametria cíclica com a sonda ferrocianeto de potássio revelaram que os três sistemas podem ser aplicados como eletrodos descartáveis por serem instáveis e que os dois sistemas com NiTsPc apresentam um amplo intervalo de potencial para detecção de analitos sem a interferência dos picos redox da Pc. Também foram conduzidos ensaios de citometria de fluxo para avaliação da toxicidade de nanocompósitos contendo nanotubos de carbono e poli(amidoamina) de gerações 2, 4 e 6 em células F C3H, correspondentes a fibroblastos saudáveis de fígado humano. Os resultados mostraram que o contato com os nanomateriais provoca uma queda significativa na viabilidade deste tipo de célula, e apontam para a necessidade de aprofundar a investigação sobre os efeitos biológicos deste nanocompósito para que ele seja aplicado com segurança como um vetor de drogas e material genético. A última parte da tese é dedicada a explorar ferramentas computacionais para elucidar os mecanismos de formação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e sua interação com modelos de membrana celular. Simulações por dinâmica molecular revelaram que a estabilidade do nanocompósito é mantida por interações entre as paredes apolares dos nanotubos e as cadeias internas não polares do dendrímero. O estudo envolvendo bicamadas lipídicas sugeriu que a presença de espécies aniônicas, como as fosfatidilserinas, é crucial para iniciar a ligação desta nanopartícula à membrana celular. O contato do nanocompósito com a bicamada resultou na extração destrutiva de lipídeos da membrana, um efeito deletério que pode causar danos às células.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono. Biossensores. Nanotoxicidade. Dinâmica molecular.
Citometria de fluxo.

Abstract

CENTURION, L. M. P. C. **Interaction between carbon nanotubes and nanometric and biological systems: experimental and computational insights.** 2015. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

This thesis describes the interaction between carbon nanotubes and nanomaterials, biomolecules and cells, to obtain relevant information for the development of biosensors and the progress of the nanotoxicology field. In a first study, we produced and characterized three types of modified electrodes made from layer-by-layer films. These nanostructures had single-walled carbon nanotubes (SWNT), nickel tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) and poly(amidoamine) dendrimer, generation 2 (PAMAM G2). These polyelectrolytes were organized in the following multilayers: (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) and (SWNT/PAMAM G2 nanocomposite / NiTsPc). Cyclic voltammetry measurements with a potassium ferrocyanide probe revealed that the three systems can be used as disposable electrodes for being unstable and that the two systems with NiTsPc exhibit a wide useful potential interval for detection without the interference of the Pc redox peaks. We also performed flow cytometry experiments to evaluate the toxicity of nanocomposites containing carbon nanotubes and poly(amidoamine) generations 2, 4 and 6 in F C3H cells, derived from healthy human liver fibroblasts. The results showed that the contact with these nanomaterials decreases the viability of this type of cell and point to the need to further determine the biological effects of this nanocomposite before it can be safely applied as a vector for drugs and genetic material. The last part of the thesis explores computational tools to unravel the mechanisms behind the formation of the nanocomposite SWNT/PAMAM G2 and its interaction with cell membrane models. Molecular dynamics simulations revealed that the stability of the nanocomposite is kept mainly by interactions between the apolar nanotube walls and the inner non polar chains of the dendrimer. The study involving lipid bilayers suggested that the presence of anionic species, such as phosphatidylserines, is crucial to trigger the binding of this nanoparticle to the cell membrane. The contact of the nanocomposite with the bilayer resulted in the destructive extraction of lipids from the membrane, an effect that ultimately causes cell damage.

Keywords: Carbon nanotubes. Biosensors. Nanotoxicity. Molecular dynamics. Flow cytometry.

Lista de figuras

Figura 2.1 –	Imagens consideradas como o primeiro registro de nanotubos de carbono por microscopia eletrônica de transmissão. Os nanotubos em questão apresentam múltiplas paredes e diâmetros de aproximadamente 50 nm.....	25
Figura 2.2 –	Esquema da folha de grafeno que, ao ser enrolada, compõe o nanotubo de carbono. O vetor quiral está delimitado por AA'	26
Figura 2.3 –	Representação de uma molécula genérica de dendrímero com quatro gerações.....	30
Figura 2.4 –	Estruturas químicas das espécies imobilizadas em filmes automontados neste estudo: (a) nanotubo de carbono de parede única funcionalizado com ácido carboxílico (SWNT); (b) ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc); (c) poli(amidoamina) de geração 2 (PAMAM G2).....	34
Figura 2.5 –	Representação dos filmes automontados estudados nesta tese. (a) exhibe a multicamada (PAMAM G2/NiTsPc), (b) ilustra a multicamada (PAMAM G2/SWNT) e (c) mostra a multicamada (nanocompósito/NiTsPc). Em todos os itens, estão representadas duas bicamadas das nanoestruturas.....	35
Figura 2.6 –	(a) Espectros de absorção óptica para o filme (PAMAM G2/NiTsPc). As curvas azul escuro, amarelo escuro e verde oliva foram obtidas após a adsorção de PAMAM G2 para 6,5, 12,5 e 18,5 bicamadas, respectivamente, para controle da dessorção de NiTsPc. (b) Absorbância em 612 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de NiTsPc; a curva preta exhibe os dados experimentais, e a vermelha mostra o ajuste.....	39
Figura 2.7 –	(a) Espectros de absorção óptica para o filme (PAMAM G2/SWNT). (b) Absorbância em 500 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de SWNT; a curva preta exhibe os dados experimentais, e a vermelha mostra o ajuste.....	40
Figura 2.8 –	(a) Espectros de absorção óptica para o filme (nanocompósito/NiTsPc). (b) Absorbância em 500 e 612 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de SWNT e de NiTsPc, respectivamente; as curvas preta e azul exibem os dados experimentais, e as vermelhas mostram os ajustes.....	41
Figura 2.9 –	Espectro de absorção óptica para uma solução de NiTsPc 0,04 g/L com pH 5,5.....	42
Figura 2.10 –	Espectros de FTIR para o estudo da interação dos polieletrólitos que formam o filme LbL. As curvas preta, azul e vermelha representam, respectivamente, os resultados para PAMAM G2 <i>cast</i> , NiTsPc <i>cast</i> e	

	(PAMAM G2/NiTsPc) ₃₀	43
Figura 2.11 –	Espectros Raman para o estudo da interação entre PAMAM G2 e NiTsPc no filme LbL. As curvas preta e vermelha representam, respectivamente, os resultados para NiTsPc em pó e para (PAMAM G2/NiTsPc) ₁₅	45
Figura 2.12 –	Espectros Raman para o estudo da interação entre PAMAM G2 e SWNT no filme LbL. As curvas preta e vermelha representam, respectivamente, os resultados para SWNT em pó e para (PAMAM G2/SWNT) ₁₅	47
Figura 2.13 –	Imagens de AFM para filmes contendo uma, três, sete e 15 bicamadas dos sistemas (PAMAM G2/NiTsPc) (b-e), (PAMAM G2/SWNT) (f-i) e (nanocompósito/NiTsPc) (j-m). Em (a) são exibidas imagens do substrato de vidro BK7. À esquerda são exibidas imagens bidimensionais, enquanto que à direita estão reunidas representações tridimensionais.....	49
Figura 2.14 –	Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados do tipo (a) (PAMAM G2/SWNT) em H ₂ SO ₄ 0,1 M e (b) (PAMAM G2/SWNT) em H ₂ SO ₄ 0,1 M com [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 2 mM.....	54
Figura 2.15 –	Voltamogramas para eletrodos modificados do tipo (a) (PAMAM G2/NiTsPc) em H ₂ SO ₄ 0,1 M e (b) (PAMAM G2/NiTsPc) em H ₂ SO ₄ 0,1 M com [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 2 mM.....	55
Figura 2.16 –	Voltamogramas para eletrodos modificados do tipo (a) (nanocompósito/NiTsPc) em H ₂ SO ₄ 0,1 M e (b) (nanocompósito/NiTsPc) em H ₂ SO ₄ 0,1 M com [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 2 mM.....	56
Figura 3.1 –	Espectros de absorção óptica dos nanocompósitos e seus constituintes..	74
Figura 3.2 –	Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G2 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G2 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.....	75
Figura 3.3 –	Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G4 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G4 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.....	76
Figura 3.4 –	Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G6 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G6 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.....	77
Figura 3.5 –	Potenciais ζ medidos para os constituintes dos nanocompósitos e os nanocompósitos de SWNT/PAMAM produzidos com as três gerações de dendrímero.....	78
Figura 3.6 –	Histogramas de população relativa de nanopartículas em relação ao	

	diâmetro. (a) PAMAM G6; (b) - (d): nanocompósitos com PAMAMs G2, G4 e G6, nesta ordem. Valores de pH médios em cada amostra: 5,19 para a PAMAM G6, 5,07 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G2, 4,93 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G4 e 5,05 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G6.....	80
Figura 3.7 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes regiões de amostras de SWNTs (a-c), nanocompósito SWNT/PAMAM G2 (d-f), nanocompósito SWNT/PAMAM G4 (g-i) e nanocompósito SWNT/PAMAM G6 (j-l). Todas as imagens foram obtidas com uma voltagem de aceleração do feixe primário de elétrons de 5 kV, exceto as imagens i-l, para as quais a voltagem foi 2 kV. A amplificação das imagens foi de 50000 vezes, exceto para as imagens b e e, cuja magnificação foi de 100000 vezes.....	83
Figura 3.8 –	Calores registrados a cada titulação de PAMAM G2 na solução de SWNT (gráfico superior) e áreas integradas de cada pico, com o calor de diluição já descontado (gráfico inferior).....	86
Figura 3.9 –	Calores registrados a cada titulação de PAMAM G4 na solução de SWNT (gráfico superior) e áreas integradas de cada pico, com o calor de diluição já descontado (gráfico inferior).....	87
Figura 3.10 –	Gráficos do tipo <i>dot plot</i> obtidos nos experimentos de citometria de fluxo para células F C3H incubadas com (a) nenhum nanomaterial (controle); (b) PAMAM G2; (c) PAMAM G4; (d) PAMAM G6; (e) SWNT; (f) SWNT/PAMAM G2; (g) SWNT/PAMAM G4; (h) SWNT/PAMAM G6.....	88
Figura 4.1 –	Representação das estruturas dos nanotubos de carbono estudados nas simulações computacionais. Partículas CNP são mostradas em cinza e partículas Q _a são destacadas em vermelho. São exibidos os nanotubos isolados (a-f) e na forma de feixes (g-l), com graus de funcionalização com carboxilas de 0% (a, b, g, h), 1% (c, d, i, j) e 2% (e, f, k, l). Na coluna à esquerda, estão reunidas as vistas laterais das nanopartículas, enquanto que na coluna à direita são exibidas as vistas frontais.....	104
Figura 4.2 –	(a): Mapeamento para conversão do modelo atomístico da PAMAM G2 em um modelo CG. (b): Estrutura atomística da PAMAM G2 gerada pelo programa DBT. Átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio são representados em ciano, azul, vermelho e branco, respectivamente. (c) e (d): Estrutura CG da PAMAM G2, vista de diferentes ângulos, com partículas N ₀ , N _{da} e Q _d mostradas em magenta, laranja e verde, respectivamente. (e) e (f): Estrutura CG da PAMAM G2 com as partículas removidas, com exceção do núcleo, para facilitar a visualização das cadeias ramificadas do dendrímero. Em c-f, as duas partículas no núcleo, que são do tipo N ₀ , estão destacadas em azul para auxiliar a identificação do centro da molécula.....	107
Figura 4.3 –	Ampliação da área próxima à extremidade dos feixes de nanotubos	

	contendo (a) 0%, (b) 1% e (c) 2% de grupos carboxila para visualização do deslocamento de alguns nanotubos na direção do eixo do feixe.....	111
Figura 4.4 –	Visão lateral (em cima) e frontal (embaixo) de alguns tipos de nanocompósito SWNT/PAMAM G2 depois da etapa de equilíbrio. Estes sistemas são: SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 (esquerda), SWNT isolado com 1% de COOH e 5 PAMAMs G2 (centro) e feixe de SWNT 0% COOH e uma PAMAM G2 (direita). Os grupos superficiais da PAMAM G2 são destacados em verde.....	114
Figura 4.5 –	Distância perpendicular entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	116
Figura 4.6 –	Distância paralela entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	117
Figura 4.7 –	Componente x da distância entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	118
Figura 4.8 –	Distância perpendicular entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	119
Figura 4.9 –	Distância paralela entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	120
Figura 4.10 –	Componente x da distância entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.....	121
Figura 4.11 –	Imagens de um dímero (esquerda) e um trímero (direita) de PAMAM G2 em solução aquosa depois de 1 ms de produção. Moléculas distintas são mostradas em verde claro, roxo e laranja. As duas	

partículas que constituem o núcleo do dendrímero são destacadas com esferas azuis para facilitar a identificação de cada unidade..... **123**

Figura 4.12 – Nanocompósito SWNT/PAMAM G2 interagindo com uma bicamada lipídica de POPC e POPS. O lipídeo zwitteriônico está representado em branco e o negativo em verde, e o código de cores para o nanomaterial é o mesmo da figura 4.4. (a) Vista superior; (b-c) vista lateral..... **127**

Lista de tabelas

Tabela 2.1 –	Técnicas, equipamentos e programas empregados na caracterização dos filmes automontados.....	38
Tabela 2.2 –	Atribuições das bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para PAMAM G2 e NiTsPc imobilizadas em filmes <i>cast</i> e no filme automontado (PAMAM G2/NiTsPc) ₃₀	43
Tabela 2.3 –	Atribuições (49) dos picos (em cm^{-1}) observados nos espectros Raman para NiTsPc em pó e imobilizada no filme automontado (PAMAM G2/NiTsPc) ₁₅	46
Tabela 2.4 –	Atribuições dos picos (em cm^{-1}) observados nos espectros Raman para SWNT em pó e imobilizado no filme automontado (PAMAM G2/SWNT) ₁₅	47
Tabela 2.5 –	Valores de rugosidade rms para os filmes (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc) e o substrato de vidro BK7.....	52
Tabela 3.1 –	Técnicas, equipamentos e programas para análise empregados na caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM.....	71
Tabela 3.2 –	Atribuições das bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para filmes <i>cast</i> de SWNT, PAMAM G2, nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e seu sobrenadante.....	75
Tabela 3.3 –	Atribuições das bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para filmes <i>cast</i> de SWNT, PAMAM G4, nanocompósito SWNT/PAMAM G4 e seu sobrenadante.....	76
Tabela 3.4 –	Atribuições das bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para filmes <i>cast</i> de SWNT, PAMAM G6, nanocompósito SWNT/PAMAM G6 e seu sobrenadante.....	77
Tabela 3.5 –	Diâmetros médios na amostra de nanotubos de carbono isolados e nas amostras dos três nanocompósitos. Os valores são referentes à média aritmética de 60 medidas e o erro corresponde ao desvio padrão.....	85
Tabela 3.6 –	Porcentagem de células F C3H em diferentes grupos de morte celular após incubação por 24 horas com nanomateriais isolados ou em forma de nanocompósito com concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$	90
Tabela 4.1 –	Parâmetros calculados para caracterizar a PAMAM G2 do modelo Martini e grandezas correspondentes obtidas através de outros métodos. EDL: espalhamento dinâmico de luz; SAXS: espalhamento de raios X a baixo ângulo (do inglês <i>small angle x-ray scattering</i>); CVFF: campo de força de valência consistente (do inglês <i>consistent valence force field</i>).....	113

Tabela 4.2 –	Estequiometria dos nanocompósitos após 1 μ s de produção. As células exibem o número de moléculas de PAMAM G2 ligadas aos nanotubos de carbono versus o número de moléculas não ligadas.....	124
Tabela 4.3 –	Estequiometria dos nanocompósitos após 2 μ s de produção, para sistemas não equilibrados, destacados em cinza. As células exibem o número de moléculas de PAMAM G2 ligadas aos nanotubos de carbono versus o número de moléculas não ligadas.....	125

Lista de abreviações

AA MD	dinâmica molecular atomística
AFM	microscopia de força atômica
CG	<i>coarse grained</i>
CNT	nanotubo de carbono
DLS	espalhamento dinâmico de luz
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	dimiristoilfosfatidilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPG	dipalmitoilfosfatidilglicerol
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FTIR	espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
ITC	calorimetria de titulação isotérmica
ITO	óxido de índio dopado com estanho
LbL	<i>layer-by-layer</i>
MD	dinâmica molecular
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NiTsPc	ftalocianina tetrasulfonada de níquel
NP	nanopartícula
PAMAM Gx	poli(amidoamina) de geração x
PBS	tampão fosfato salino
Pc	ftalocianina
PI	iodeto de propídeo
POPC	palmitoiloleoilfosfatidilcolina
POPS	palmitoiloleoilfosfatidilserina
PS	fosfatidilserina
RNA	ácido ribonucleico
SAXS	espalhamento de raios X a baixo ângulo
SEM	microscopia eletrônica de varredura
SWNT	nanotubo de carbono de parede simples

SUMÁRIO

Capítulo 1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	21
Capítulo 2	FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO SWNTs , NiTsPc E PAMAM G2.....	25
2.1	Introdução.....	25
2.1.1	Nanotubos de carbono.....	25
2.1.2	Sensores contendo nanotubos de carbono.....	27
2.1.3	Metaloftalocianinas.....	28
2.1.4	Dendrímeros e a poli(amidoamina).....	29
2.1.5	Filmes automontados.....	32
2.2	Materiais e métodos.....	33
2.3	Resultados e discussões.....	38
2.4	Conclusões parciais.....	58
Capítulo 3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO NANOTOXICOLÓGICA <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS F C3H DO NANOCOMPÓSITO SWNT/PAMAM.....	61
3.1	Introdução.....	61
3.1.1	Nanocompósitos de nanotubos de carbono e dendrímeros.....	61
3.1.2	Toxicidade do nanocompósito SWNT/PAMAM.....	65
3.2	Materiais e métodos.....	67
3.2.1	Preparação e caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM.....	68
3.2.2	Análise por citometria de fluxo da morte celular induzida pelo nanocompósito SWNT/PAMAM.....	71
3.3	Resultados e discussões.....	73
3.3.1	Preparação e caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM.....	73
3.3.2	Análise por citometria de fluxo da morte celular induzida pelo nanocompósito SWNT/PAMAM.....	88
3.4	Conclusões parciais.....	91
Capítulo 4	ESTUDO DA FORMAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO SWNT/PAMAM G2 E DE SUA INTERAÇÃO COM MODELOS DE MEMBRANA ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS.....	93
4.1	Introdução.....	93
4.1.1	Estudos computacionais da interação entre nanotubos de carbono e modelos de membrana celular.....	98
4.1.2	Estudos computacionais da interação entre dendrímeros PAMAM e modelos de membrana celular.....	99
4.2	Informações sobre as simulações.....	102
4.2.1	Modelos computacionais.....	103

4.2.2 Simulações da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2.....	109
4.2.3 Simulações da interação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 com modelos de membrana.....	109
4.3 Resultados e discussões.....	111
4.3.1 Aplicação do modelo Martini aos feixes de nanotubos de carbono.....	111
4.3.2 Aplicação do modelo Martini à PAMAM G2.....	112
4.3.3 Simulações da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2.....	114
4.3.4 Simulações da interação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 com modelos de membrana.....	126
4.4 Conclusões parciais.....	128
 Capítulo 5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	 131
 REFERÊNCIAS.....	 133
 APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO GERADA DURANTE O DOUTORAMENTO..	 147

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A área de nanomateriais recebeu grande destaque por parte da comunidade científica nos últimos 25 anos e se firmou como um dos mais proeminentes ramos da ciência dos materiais. Não existe ainda uma definição definitiva para este tipo de material; entretanto, é comumente citada a recomendação proposta pela Divisão Ambiental da Comissão Europeia em outubro de 2011, segundo a qual um nanomaterial é aquele que contém partículas isoladas, ou na forma de agregado ou aglomerado, em que 50% ou mais das partículas apresentam ao menos uma dimensão entre 1 e 100 nm.⁽¹⁾ Mais do que uma dimensão limite, o que diferencia os nanomateriais de outros materiais é a presença de efeitos quânticos e de razão entre área e volume que não são observados em escalas micro ou macroscópicas.⁽²⁾ Como consequência, apesar da definição formal, a comunidade científica estendeu o tamanho limite até algumas centenas de nanômetros, desde que o comportamento físico-químico da partícula em questão seja semelhante ao observado para nanopartículas com algumas unidades ou dezenas de nanômetros.⁽³⁾

Os potenciais benefícios dos nanomateriais abrangem as mais variadas áreas, como energia, eletrônica, agricultura e medicina. Neste último campo, o uso de nanopartículas pode contribuir para a obtenção de dispositivos implantáveis e de tecidos para regeneração celular, aperfeiçoar métodos de diagnóstico analítico ou por imagem, gerar novos veículos para a entrega controlada de fármacos ou genes, facilitar a administração de drogas hidrofóbicas e atenuar efeitos colaterais de um tratamento por reduzir a quantidade de princípio ativo e confiná-lo a um tecido específico através de estratégias de reconhecimento de alvos celulares.⁽⁴⁾ Em alguns casos, é possível unir algumas destas atribuições numa única estrutura multifuncional que atue proporcionando um diagnóstico e liberando um agente terapêutico, formando assim uma plataforma “teranóstica”. Muitos destes avanços ainda estão restritos ao domínio acadêmico e ainda se encontram no estágio de pesquisa básica, mas a nanomedicina já se mostra um mercado relevante. Segundo levantamento recente, há 274 produtos contendo nanomateriais já aprovados ou em fase de estudos clínicos na área farmacêutica.⁽³⁾ Apesar desta perspectiva comercial promissora, muitos tópicos relacionados a síntese, caracterização e interação com sistemas biológicos devem ser explorados no âmbito da ciência fundamental para que os nanomateriais se transformem em produtos importantes na área de saúde.

Um dos primeiros objetos de estudo da nanociência foram os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *carbon nanotubes*). Esta classe de nanomateriais tem sido explorada nas mais variadas vertentes da nanomedicina: como um vetor de peptídeos, proteínas, material genético e fármacos em sistemas de entrega controlada de substâncias, como integrante da plataforma transdutora em biossensores, como substrato para o crescimento de tecidos e para a diferenciação de células-tronco, como material para o desenvolvimento de próteses ósseas e neurais e como agentes para obtenção de imagens e para indução de morte celular seletiva através da ablação fototérmica de tumores.(5,6) As possibilidades de aplicação ampliam-se se considerarmos as modificações que a estrutura básica dos nanotubos pode sofrer através de processos de funcionalização, que conferem ao material original novas propriedades.

Apesar de haver extensa literatura descrevendo provas de conceito para aplicações médicas de nanotubos de carbono, o seu uso disseminado só será possível se ficar comprovado que a sua introdução em organismos e no ambiente não provoca efeitos deletérios. Para atender a demanda por este tipo de informação, muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a elucidar a interação de CNTs com outros nanomateriais, com o ambiente e com seres vivos em diferentes níveis: celular, tecidual e sistêmico. O conhecimento gerado através destes estudos deve aprimorar o desempenho de sistemas nanoestruturados já conhecidos e implementados e embasar a elaboração de normas sobre a exposição a nanomateriais por agências reguladoras.

Esta tese explora três tópicos principais.

- No capítulo 2, é apresentado um estudo sobre a fabricação e a caracterização de filmes nanoestruturados contendo nanotubos de carbono de parede simples e/ou ftalocianina tetrasulfonada de níquel imobilizados através da técnica de automontagem na forma *layer-by-layer*. O objetivo principal deste estudo é revelar como cada um destes nanomateriais interfere no comportamento eletroquímico de eletrodos modificados com as multicamadas e, consequentemente, no seu desempenho como transdutor. Para tanto, foram produzidos três tipos de filmes finos: dois deles contendo os nanotubos de carbono ou a ftalocianina como poliânion e o dendrímero poli(amidoamina) de geração 2 como policação e um terceiro sistema que uniu os três nanomateriais numa plataforma que apresentou um nanocompósito de dendrímero e nanotubos como policação e ftalocianina como poliânion. O comportamento eletroquímico destas multicamadas foi investigado e comparado através da técnica de voltametria cíclica.

- O capítulo 3 descreve ensaios *in vitro* para avaliação da toxicidade em fibroblastos saudáveis de fígado humano (células F C3H) provocada por um nanocompósito contendo nanotubos de carbono de parede simples e o dendrímero poli(amidoamina), juntamente com uma ampla caracterização físico-química deste material. A viabilidade celular após a exposição às nanopartículas foi medida através da técnica de citometria de fluxo, considerada atualmente a mais adequada para este propósito.
- No capítulo 4, os detalhes moleculares da formação deste nanocompósito por interações não covalentes e de sua interação com modelos de membrana celular foram investigados através de métodos computacionais, mais especificamente simulações por dinâmica molecular. Este estudo foi conduzido aplicando-se um campo de força *coarse grained* para que as simulações tivessem abrangências temporal e espacial suficientes para a observação dos fenômenos importantes nestes sistemas. A abordagem computacional usada neste estudo foi escolhida por ser pouco explorada na literatura e por proporcionar um entendimento em nível molecular dos processos de auto-organização de nanomateriais e de suas interações com membranas celulares, em detrimento do uso de outras técnicas espectroscópicas ou ensaios biológicos. Alguns tópicos nos quais a dinâmica molecular pode ser particularmente útil são os mecanismos de formação do nanocompósito, as mudanças conformacionais dos componentes durante o processo, a estequiometria do material resultante, as alterações observadas na bicamada após a ligação com a nanopartícula e as causas desta interação.

Os resultados relatados nos capítulos 2 e 3 foram obtidos no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto. O estudo descrito no capítulo 4 foi desenvolvido no grupo *Structural Bioinformatics and Computational Biochemistry Unit* do Departamento de Bioquímica da Universidade de Oxford, no Reino Unido, sob supervisão do Prof. Mark S. P. Sansom.

2 FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO SWNTs, NiTsPc e PAMAM G2

2.1 Introdução

2.1.1 Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono são um dos alótropos do carbono. Não se sabe ao certo quando estas estruturas foram observadas pela primeira vez. Os primeiros registros de objetos carbonáceos comprovadamente tubulares e com diâmetros nanométricos datam de 1952, quando estes foram observados por microscopia eletrônica de transmissão, como pode ser conferido na figura 2.1.(7) Entretanto, quase 40 anos se passaram até que a comunidade científica de fato reconhecesse os nanotubos de carbono como um tópico instigante para pesquisa básica e aplicada. Este marco ocorreu com a publicação de um artigo por Iijima em 1991 (8), relatando a presença dos nanotubos num procedimento malsucedido de síntese de fulerenos.

Figura 2.1 – Imagens consideradas como o primeiro registro de nanotubos de carbono por microscopia eletrônica de transmissão. Os nanotubos em questão apresentam múltiplas paredes e diâmetros de aproximadamente 50 nm.

Fonte: MONTHIOUX; KUZNETSOV (7).

Os nanotubos de carbono são constituídos por uma ou mais folhas de grafeno enroladas, formando estruturas cilíndricas com razão de aspecto de 100 a 1000.(9) O diâmetro típico deste material é de poucos nanômetros, e seu comprimento pode variar de dezenas de nanômetros até poucos milímetros.(10) Quando estendida, a parede de um nanotubo de carbono revela uma rede hexagonal de átomos de carbono com hibridização sp^2 . A distância entre estes átomos é $a_{CC} = 0,144$ nm, um pouco maior do que a que se observa para o grafite, 0,1421 nm (11), por conta da elevada curvatura da superfície. Esta monocamada simples apresenta uma propriedade única entre materiais no estado sólido: a capacidade de gerar estruturas semicondutoras ou metálicas apenas a partir do controle da orientação dos orbitais π dos átomos de carbono, sem dopagem.

A figura 2.2 mostra a rede hexagonal que compõe a parede do nanotubo de carbono. Os versores $\mathbf{a}_1$ e $\mathbf{a}_2$ são usados para descrever o vetor quiral $\mathbf{C}_h = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$, que é perpendicular ao eixo do tubo. O parâmetro θ , conhecido como ângulo quiral, é o ângulo entre a direção do versor $\mathbf{a}_1$ e a do vetor quiral. Quando $m = 0$, o nanotubo é classificado como *zigzag*; se $m = n$, $\theta = 30^\circ$ e se tem um nanotubo do tipo *armchair*. Para valores de θ entre 0° e 30° , o nanotubo apresenta uma orientação intermediária entre estes dois arranjos.(9)

Figura 2.2 – Esquema da folha de grafeno que, ao ser enrolada, compõe o nanotubo de carbono. O vetor quiral está delimitado por AA’.

Fonte: CHARLIER (9).

Uma vez que os parâmetros n e m são conhecidos, é possível calcular o ângulo quiral,

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{m\sqrt{3}}{m+2n}\right), \text{ e o diâmetro do nanotubo, } d_t = \left(\frac{\sqrt{3}}{\pi}\right)a_{cc}\sqrt{m^2 + mn + n^2}. \quad (11)$$

Quanto à natureza eletrônica, os nanotubos de carbono são considerados metálicos se $n - m$ for um múltiplo de três; caso contrário, eles são semicondutores. Portanto, todo nanotubo *armchair* é metálico, enquanto que um nanotubo *zigzag* pode ser metálico ou semicondutor. Um dos grandes atrativos destes objetos é conduzir eletricidade em uma única direção com baixíssima resistência a temperatura ambiente, fenômeno denominado transporte balístico.⁽⁹⁾ Quanto mais livre de defeitos for a parede do nanotubo, maior a sua condutividade.

2.1.2 Sensores contendo nanotubos de carbono

Uma das mais importantes aplicações dos nanotubos de carbono é na área de sensores, incluindo aqueles para a detecção de biomoléculas. Um levantamento recente ⁽¹²⁾ mostra como evoluiu o interesse pelo desenvolvimento de biossensores à base deste tipo de nanomaterial: o número de publicações nesta área vem crescendo desde 2000, e a partir de 2008 o número anual de artigos sobre o assunto ultrapassou 10000, conforme busca baseada no repositório do *Scholar Google*. A produção de biossensores é importante não apenas na nanomedicina, para o diagnóstico de doenças, mas também para o monitoramento de produtos alimentícios, poluentes e agentes patogênicos. Muito do trabalho dedicado ao aprimoramento destes dispositivos nos últimos anos está relacionado a tentativas de criar plataformas para múltiplos analitos, com componentes cada vez menores, portáteis, com alta estabilidade e resposta rápida, para que as medidas possam ser feitas *in situ* ou até mesmo *in vivo*, no caso de plataformas implantáveis, e por indivíduos sem capacitação específica.⁽¹⁰⁾

Do ponto de vista físico, um biossensor consiste em um elemento de biorreconhecimento, que pode ser um receptor, um anticorpo, uma enzima ou material genético, e uma plataforma transdutora. Quando um analito interage com o elemento de biorreconhecimento, ocorrem mudanças em alguma característica física destas biomoléculas, e cabe ao transdutor converter estas modificações em grandezas físicas facilmente

mensuráveis, como corrente elétrica, absorção óptica, massa, e outras. A maioria dos biossensores contendo nanotubos de carbono é do tipo transistor de efeito de campo ou de natureza eletroquímica, pois este método reúne a possibilidade de desenvolver dispositivos portáteis e de baixo custo com sensibilidade adequada para a detecção de analitos em concentrações extremamente baixas. Dentre as modalidades de sensores eletroquímicos, destacam-se os amperométricos, os potenciométricos e os impedimétricos, sendo os primeiros os mais comuns.

As características pelas quais os nanotubos de carbono são frequentemente imobilizados em eletrodos modificados de biossensores são as destacadas estabilidades térmica e química, a alta razão entre área e volume, que torna toda a superfície do nano-objeto disponível para a interação com biomoléculas, a elevada condutividade elétrica, a capacidade eletrocatalítica e de promover a transferência eletrônica em reações de oxi-redução. Ainda há a necessidade de esclarecer quais são os fatores determinantes no comportamento eletroquímico dos nanotubos: as características eletrônicas das paredes em regiões afastadas das bordas, a presença de contaminantes provenientes da síntese, de grupos contendo oxigênio e de defeitos na estrutura hexagonal da rede.(10)

Os analitos quantificados através de biossensores à base de nanotubos de carbono são os mais variados: diversos tipos de proteínas, material genético, glicose, ácido úrico, colesterol, neurotransmissores, como dopamina e serotonina, o vírus da dengue e a bactéria *Escherichia coli*.(12)

2.1.3 Metalofalocianinas

As ftalocianinas (Pcs, do inglês *phthalocyanines*), sintetizadas pela primeira vez em 1907 por Braun e Tcherniac (13), são compostos de coordenação macrocíclicos altamente conjugados cujas propriedades físicas e químicas os tornaram alvo de intensa pesquisa nos mais variados campos da ciência. Além da intensa pigmentação, característica que proporcionou sua primeira aplicação como corante, destacam-se as altas estabilidades térmica e química, a não toxicidade, a atividade redox bem definida e a semicondutividade, caráter elétrico predominante nestas moléculas.(14,15) Seu sistema π conjugado, com 18 elétrons, dá origem a bandas de absorção eletrônica nas faixas de 400 nm (banda B, na região ultravioleta)

e de 700 nm (banda Q, na região visível).(15) Sua condutividade elétrica está entre 10^{-14} e 10^{-12} Sm^{-1} – são isolantes quando puras e adquirem semicondutividade ao serem dopadas.(15) Propriedades como estas estimularam a aplicação destes compostos em dispositivos como células de combustível, células fotovoltaicas, transistores orgânicos, diodos emissores de luz orgânicos, eletrodos para catálise, sensores de gás, dispositivos eletrocromáticos e de memória óptica.(14,15,16) No campo da medicina, as ftalocianinas têm sido empregadas como agente fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, além de serem amplamente utilizadas em eletroquímica e na fabricação de sensores químicos.(15,17)

Uma das características marcantes destes macrociclos é a possibilidade de modificar a estrutura básica do anel ou de introduzir grupos químicos específicos nas extremidades dos anéis benzênicos, dependendo da característica físico-química que se deseja agregar ao composto.(18) Como exemplo, pode-se citar a adição de grupos sulfônicos periféricos, que aumentam drasticamente a solubilidade das ftalocianinas em água. Esta modificação simples permitiu a imobilização destas macromoléculas em diversos tipos de filmes finos, especialmente nos automontados.

Os primeiros registros de uso de ftalocianinas em multicamadas datam de 1998, quando foram feitos estudos estruturais, elétricos e ópticos destes filmes para investigar os processos de formação das camadas.(19,20,21) Pouco depois, muitos grupos de pesquisa começaram a investir esforços no desenvolvimento de sensores elétricos e eletroquímicos à base de ftalocianinas, com o intuito de explorar sua atividade eletrocatalítica e biomimética. Alguns exemplos de analitos comumente detectados através de transdutores contendo ftalocianinas são neurotransmissores (22,23), gases (24) e poluentes.(25)

2.1.4 Dendrímeros e a poli(amidoamina)

Os dendrímeros são uma classe de moléculas poliméricas que se diferenciam dos polímeros convencionais por apresentarem monodispersividade. A figura 2.3 exibe a representação de uma molécula genérica de dendrímero. Na região central, encontra-se o núcleo, uma pequena cadeia de onde emergem as ramificações da estrutura. A extremidade de cada ramificação comporta a introdução de duas novas cadeias idênticas à já existente, e quando este processo é efetuado o dendrímero ganha uma nova camada de material que é

denominada geração. Ao final do processo de síntese, alguns grupos presentes na extremidade da última geração, representados em azul na figura 2.3, ficam expostos na superfície da molécula, e podem ter diferentes características químicas dependendo do tipo de dendrímero, ou seja, da cadeia polimérica que forma cada geração. Estes grupos são facilmente modificáveis, e podem alterar drasticamente a interação da nanoestrutura com o meio.

Figura 2.3 – Representação de uma molécula genérica de dendrímero com quatro gerações.

Fonte: Adaptado de ESCOBAR-CHÁVEZ (26).

Este tipo especial de polímero começou a ser estudado no fim da década de 1970, mas o termo dendrímero foi cunhado alguns anos depois, em 1985, por D. A. Tomalia, em referência à geometria ramificada da molécula, que lembra a de uma árvore – a palavra *dendron* é grega e tem este significado.(27) O grande interesse pelo desenvolvimento deste tipo de nanomaterial vem do fato de ele ser uma nanopartícula polimérica com características físico-químicas bem definidas e previsíveis, o que não ocorre em polímeros convencionais, cujos métodos de síntese proporcionam produtos altamente polidispersos. Dendrímeros de uma determinada geração apresentam mínima variação em parâmetros como dimensões características, massa molecular e número de cargas na superfície. A monodispersidade destes

nano-objetos é tão marcante que muitas vezes os dendrímeros são comparados às proteínas, pela semelhança em termos de tamanho e de reprodutibilidade estrutural.(28)

Depois de algumas décadas de pesquisa, mais de 100 tipos de dendrímeros já foram caracterizados e em torno de 1000 grupos químicos testados na superfície destas moléculas.(28) Apesar desta grande variedade, um tipo de dendrímero se destaca entre os demais: a poli(amidoamina), ou PAMAM, cuja estrutura pode ser vista na figura 2.4 (c). A PAMAM foi sintetizada pela primeira vez em 1984, e foi o primeiro dendrímero a ter toda a sua série, da geração 0 até a 10, produzida.(29,30) Sua estrutura química é muito simples: ela apresenta aminas primárias na superfície e aminas terciárias nos pontos de ramificação. A protonação deste dendrímero é complexa e fortemente dependente do pH, mas comumente se adota a seguinte simplificação: em pH básico, todas as aminas são desprotonadas; a protonação é restrita às aminas primárias em pH neutro ou fisiológico, e abrange todas as aminas, primárias e terciárias, em pH ácido. A cada geração acrescentada, o diâmetro da PAMAM cresce de forma aproximadamente linear – em torno de 1 nm por geração – enquanto que a massa aproximadamente dobra e o número de grupos superficiais cresce geometricamente. Para gerações baixas e médias (G0 a G4), a densidade de ramificações é reduzida o suficiente para que as PAMAMs sejam planares, mas nas gerações altas (G5 a G10) esta densidade ocasiona uma geometria globular.(29)

Por ter a habilidade de penetrar células e de conter pequenas moléculas, a PAMAM tem sido considerada atualmente o principal veículo não viral para entrega controlada de substâncias na área médica. O dendrímero pode abrigar a carga nas cavidades existentes entre as cadeias poliméricas, como mostra a figura 2.3, ou pode estabelecer alguma interação ou ligação covalente com um fármaco ou com genes através de seus grupos superficiais. A atuação da PAMAM como vetor tem se revelado especialmente útil para a administração de drogas antitumorais de baixa solubilidade. Alguns obstáculos biológicos naturais, como a barreira hematoencefálica e o trato gastrointestinal, podem ser atravessados pelo dendrímero, enquanto que outros são pouco permeáveis a ele, como a placenta. O estímulo à aplicação da PAMAM em plataformas teranósticas tem sido reforçado por estudos para avaliação da sua toxicidade, que têm indicado ausência de efeitos deletérios para concentrações baixas e médias e gerações reduzidas em ensaios *in vitro*.(29) Estes trabalhos apontam que a toxicidade da PAMAM é provocada essencialmente por uma densidade crítica de aminas primárias na superfície, presente a partir de gerações intermediárias (G4 ou G5). Como uma alternativa para contornar esta desvantagem, pode-se modificar a superfície da PAMAM de

modo a introduzir grupos químicos eletricamente neutros ou negativos ou truncar a cadeia polimérica na metade de uma geração, fazendo com que a superfície contenha hidroxilas.(29) Na área de biossensores, a PAMAM é comumente imobilizada em eletrodos modificados nanoestruturados, mesmo sendo eletricamente isolante. Isto ocorre porque ela propicia um ambiente favorável à manutenção da estrutura terciária de proteínas em geral e da atividade enzimática.(31)

2.1.5 Filmes automontados

Por definição, filmes automontados são aqueles cuja formação é um processo termodinamicamente favorável, espontâneo, que dispensa o acréscimo de energia para acontecer. Entre os filmes automontados mais comuns, destaca-se o filme automontado por adsorção física, objeto de estudo deste capítulo. Neste tipo de nanoestrutura, duas substâncias com cargas opostas são depositadas alternadamente sobre um substrato cuja carga superficial é oposta àquela da primeira camada. A estrutura destes filmes é mantida, predominantemente, por atração eletrostática, embora em alguns casos as camadas se formem por outros tipos de interação, como hidrofóbica, e ligações covalentes e de hidrogênio.(32) Cada etapa de deposição é seguida por um processo de lavagem, cuja finalidade é retirar o material fracamente adsorvido.(33)

A técnica de automontagem por adsorção física possibilitou um grande aumento na variedade de espécies imobilizadas em filmes finos, uma vez que o único requisito para atuar como um polieletrólito é estar eletricamente carregado. Assim, os filmes automontados passaram a conter desde polieletrólitos tradicionais, como a polialilamina hidrocloreada e o poliestireno sulfonado (34) até biomoléculas, vírus e células.(35) Entre as aplicações mais comuns destas multicamadas destacam-se a produção de sensores elétricos e eletroquímicos para os mais variados analitos, cápsulas para entrega controlada de fármacos, dispositivos fotovoltaicos e emissores de luz.(36)

Há muitas vantagens associadas ao uso das multicamadas. A formação destes filmes pode ocorrer em substratos de qualquer forma e tamanho, e o aparato experimental para a imobilização dos polieletrólitos é muito simples e barato, ao contrário da infraestrutura para a produção de filmes por outros métodos, como Langmuir-Blodgett ou por deposição química a

vapor. Entretanto, as principais características que diferenciam as camadas automontadas dos demais filmes finos são sua estabilidade e o controle de propriedades físico-químicas como espessura, rugosidade, porosidade e composição, que acabam por tornar mais reprodutíveis os dispositivos feitos a partir destas estruturas.

Neste capítulo, realizou-se um estudo para elucidar como os nanotubos de carbono interagem com outros nanomateriais no nível molecular através de interações não covalentes. Para este estudo de caso, optou-se por investigar o contato dos SWNTs com uma metaloftalocianina, em razão da compatibilidade entre as dimensões características deste macrociclo e o diâmetro dos nanotubos e pelo fato de ambas as espécies apresentarem potencial para atuar como transdutores em biossensores eletroquímicos.

2.2 Materiais e métodos

Os nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com grupos carboxílicos (SWNTs), a ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc) e a poli(amidoamina) de geração 2 (PAMAM G2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem modificações. De acordo com as informações disponibilizadas pelo fabricante (37), os nanotubos, produzidos pelo método de descarga de arco elétrico, apresentam diâmetro médio de $1,4 \pm 0,1$ nm e estão organizados em feixes com diâmetros no intervalo de 4 a 5 nm e comprimentos variando de 0,5 a 1,5 μ m. O grau de funcionalização destas estruturas é de 1 a 3% de carboxilas (em porcentagem de átomos). As moléculas de PAMAM G2, por sua vez, têm diâmetro de 2,9 nm e contêm 16 aminas primárias em sua superfície.(38) A figura 2.4 exhibe os nanomateriais usados como polieletrólitos nestes experimentos.

Figura 2.4 – Estruturas químicas das espécies imobilizadas em filmes automontados neste estudo: (a) nanotubo de carbono de parede simples funcionalizado com ácido carboxílico (SWNT); (b) ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc); (c) poli(amidoamina) de geração 2 (PAMAM G2).

(a)

(b)

(c)

Fonte: (a) CARBON (37); (b) NICKEL (39); (c) SUPATTAPONE (40).

Estes três nanomateriais foram imobilizados na forma de filmes nanoestruturados com multicamadas. Para avaliar o comportamento eletroquímico de filmes contendo apenas SWNT, apenas NiTsPc ou ambos foram projetados três tipos de filmes: (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc). Nos dois primeiros casos, a PAMAM G2 atuou como polycation e a NiTsPc e o SWNT foram usados como poliânions; no

terceiro sistema, o nanocompósito de SWNT e PAMAM G2 foi imobilizado como polication e a NiTsPc, novamente, desempenhou a função de poliânion. A figura 2.5 exibe um esquema das arquiteturas moleculares destes filmes. Deve-se ressaltar que esta figura tem caráter meramente ilustrativo: é possível que haja interpenetração dos polieletrólitos. Além disso, não há informação sobre o arranjo das moléculas em relação ao substrato e os polieletrólitos não estão representados em escala.

Figura 2.5 – Representação dos filmes automontados estudados nesta tese. (a) exibe a multicamada (PAMAM G2/NiTsPc), (b) ilustra a multicamada (PAMAM G2/SWNT) e (c) mostra a multicamada (nanocompósito/NiTsPc). Em todos os itens, estão representadas duas bicamadas das nanoestruturas.

(a)

(b)

continua

continuação

(c)

Fonte: Adaptado de DR. HAYES' (41); CRESPILO (42); CHARLIER (9); ARTETA (43).

Para a fabricação dos filmes automontados produziram-se soluções 1 g/L de PAMAM G2 e 0,5 g/L de SWNT e NiTsPc. Na solução de nanocompósito, as concentrações de SWNT e PAMAM G2 eram, respectivamente, 0,05 g/L e 0,5 g/L. Mais detalhes sobre a produção e a caracterização do nanocompósito contendo SWNT e PAMAM G2 encontram-se no capítulo 3. Os polieletrólitos usados nos sistemas (PAMAM G2/NiTsPc) e (nanocompósito/NiTsPc) tiveram seu pH ajustado para 5,5, enquanto que os da multicamada (PAMAM G2/SWNT) foram imobilizados com pH 8. Estes valores de pH foram obtidos a partir da adição de pequenos volumes de soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Embora os nanotubos solubilizassem facilmente em água em virtude da presença de grupos carboxílicos, as deposições envolvendo este polieletrólito sempre eram precedidas pela sonicação da solução por aproximadamente 30 minutos em ultrassom de banho com potência nominal de 100 W rms para reduzir a quantidade de agregados. Optou-se por não efetuar a secagem com nitrogênio ao final da deposição de cada camada para aumentar o ordenamento molecular do material imobilizado.(44) O tempo de deposição de cada camada no filme foi de cinco minutos.

O crescimento dos filmes foi acompanhado através da espectroscopia de absorção óptica, com deposição até a vigésima bicamada e o monitoramento a cada duas bicamadas. Medidas de espectroscopia de absorção no infravermelho, ou FTIR (espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform*

infrared spectroscopy), só puderam ser feitas para o filme (PAMAM G2/NiTsPc), pois as amostras feitas com nanotubos de carbono apresentaram intensidade de absorção muito reduzida. O espectro para o sistema (PAMAM G2/NiTsPc)₃₀ forneceu informações sobre as interações entre os dois polieletrólitos no filme. A espectroscopia Raman foi usada com o intuito de obter dados sobre a formação das multicamadas, complementando a análise feita por FTIR; neste caso, as amostras apresentavam 15 bicamadas. Realizou-se também um estudo sobre a morfologia e a rugosidade dos sistemas a partir de imagens obtidas por microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*) no modo *tapping* com filmes de uma, três, sete e 15 bicamadas.

Os filmes automontados foram produzidos sobre diferentes substratos, dependendo do tipo de caracterização ao qual foram submetidos. Nos experimentos de espectroscopia de absorção óptica, Raman e AFM, as multicamadas foram imobilizadas sobre vidro BK7. Para as medidas de FTIR, usaram-se placas de silício como substratos, pois os experimentos foram feitos no modo transmitância. Limpavam-se as lâminas de vidro através de um tratamento que inclui duas etapas, cada uma com 24 horas de duração: imersão dos substratos em solução saturada de permanganato de potássio e, depois de enxágue abundante com água ultrapura, mergulho em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 20:1. Os substratos de silício foram submetidos a um procedimento de limpeza que consistia em sonicar as lâminas em solução alcoólica de hidróxido de potássio 2% por 15 minutos em ultrassom de banho.

Os três tipos de multicamadas caracterizadas neste projeto – (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc) – foram imobilizados sobre substratos de vidro cobertos com óxido de índio dopado com estanho (ITO, do inglês *indium tin oxide*) para a realização de experimentos de voltametria cíclica. Os substratos foram limpos com solução alcoólica de hidróxido de potássio 2% por dois minutos em ultrassom de banho. Estes eletrodos modificados com os filmes continham uma, três, sete ou 15 bicamadas. O aparato usado neste estudo consistiu em uma cela eletroquímica de vidro borossilicato com um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl 3 M e um contra-eletrodo de platina de 1 cm². Todas as caracterizações foram conduzidas a uma temperatura de 25°C com ácido sulfúrico, H₂SO₄, 0,1 M como eletrólito. Os voltamogramas foram obtidos a partir de varreduras de 0 a 1,6 V versus Ag/AgCl a 100 mVs⁻¹. Todas as medidas envolvendo o uso de sonda foram realizadas com ferrocianeto de potássio, [K₄(CN)₆].3H₂O, 2 mM em ácido sulfúrico 0,1 M.

Na tabela 2.1 estão reunidas as especificações dos equipamentos e programas usados para caracterizar as amostras.

Tabela 2.1 – Técnicas, equipamentos e programas empregados na caracterização dos filmes automontados.

Técnica	Equipamento/programa
Espectroscopia de absorção óptica	Espectrofotômetro Hitachi U-2800
Espectroscopia de infravermelho	Espectrômetro Nicolet 6700, resolução de 3 cm^{-1}
Espectroscopia Raman	Espectrômetro micro-Raman confocal Witec Alpha 300 A/R, <i>laser</i> He-Ne de 632 nm e espectrômetro Raman triplo monocromador Horiba-Jobim-Yvon T64000, <i>laser</i> de 632 nm, resoluções de 3 cm^{-1}
Microscopia de força atômica	SPM Multimode – Nanoscope III, Digital Instruments/Gwyddion
Voltametria cíclica	PGSTAT, Autolab (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands)/GPES (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands)

Fonte:Elaborada pela autora.

As medidas de espectroscopia Raman foram feitas com o auxílio do Dr. Marcello Andreeta, no Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos, IFSC, USP, e do Prof. Dr. Cristiano Fantini Leite, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.3 Resultados e discussões

Os espectros de absorção óptica para o sistema (PAMAM G2/NiTsPc) estão reunidos na figura 2.6.

Figura 2.6 – (a) Espectros de absorção óptica para o filme (PAMAM G2/NiTsPc). As curvas azul escuro, amarelo escuro e verde oliva foram obtidas após a adsorção de PAMAM G2 para 6,5, 12,5 e 18,5 bicamadas, respectivamente, para controle da dessorção de NiTsPc. (b) Absorbância em 612 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de NiTsPc; os pontos exibem os dados experimentais e a curva vermelha mostra o ajuste.

Fonte:Elaborada pela autora.

A banda monitorada nas multicamadas contendo Pc foi a banda Q, situada entre 600 e 750 nm.(45) Verificou-se que no filme há um predomínio de dímeros – banda em 612 nm –, embora um ombro de monômeros em 685 nm também esteja presente no espectro. O gráfico de absorbância em função do número de bicamadas revela que a quantidade de Pc depositada sobre vidro cresce exponencialmente, segundo a equação $y = a * e^{(x/b)} + y_0$, com $a = 0,051 \pm 0,005$, $b = 8,6 \pm 0,3$ e $y_0 = -0,060 \pm 0,009$. Há evidência na literatura de que o crescimento exponencial em filmes LbL está relacionado à difusão do polieletrólito em questão ao longo de toda a estrutura das multicamadas, ou seja, associa-se o crescimento exponencial à interpenetração dos componentes.(46,47) Estas características podem ter um impacto direto no comportamento eletroquímico ou elétrico destas plataformas.

As curvas para os filmes com SWNT encontram-se na figura 2.7.

Figura 2.7 – (a) Espectros de absorção óptica para o filme (PAMAM G2/SWNT). (b) Absorbância em 500 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de SWNT; os pontos exibem os dados experimentais e a curva vermelha mostra o ajuste.

Fonte:Elaborada pela autora.

Os nanotubos de carbono não apresentam banda de absorção na região espectral monitorada, mas provocam o espalhamento da luz incidente, reduzindo a intensidade detectada no equipamento. Além disso, apresentam significativa absorção para a região mais energética do espectro por causa da presença de elétrons π .(48) Observando-se a intensidade da absorção para um comprimento de onda arbitrário – neste caso, 500 nm –, determinou-se que a deposição de SWNT é exponencial, assim como para a ftalocianina. Os parâmetros que ajustam estas curvas são $a = 0,014 \pm 0,002$, $b = 7,4 \pm 0,3$ e $y_0 = -0,016 \pm 0,003$.

O crescimento das camadas do filme contendo o nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e NiTsPc também foi avaliado, como pode ser conferido nos gráficos da figura 2.8.

Figura 2.8 – (a) Espectros de absorção óptica para o filme (nanocompósito /NiTsPc). (b) Absorbância em 500 e 612 nm em função do número de bicamadas, mostrando o crescimento exponencial das camadas de SWNT e de NiTsPc, respectivamente; os pontos exibem os dados experimentais e as curvas vermelhas mostram os ajustes.

Fonte:Elaborada pela autora.

Observou-se o crescimento exponencial da NiTsPc e do SWNT nesta multicamada, como foi verificado para os filmes que não continham nanocompósito. Os parâmetros que ajustam estas curvas são $a = 0,068 \pm 0,008$, $b = 9,2 \pm 0,4$ e $y_0 = -0,08 \pm 0,01$ para a NiTsPc e $a = 0,05 \pm 0,01$, $b = 19 \pm 3$ e $y_0 = -0,05 \pm 0,01$ para o SWNT. Comparando-se as absorbâncias registradas para a NiTsPc nos filmes (PAMAM G2/NiTsPc) e (nanocompósito/NiTsPc), nota-se que, embora as concentrações das soluções de NiTsPc tenham sido as mesmas, a segunda multicamada apresenta uma quantidade de NiTsPc um pouco maior do que a primeira. Em relação à quantidade de SWNT, observa-se que até a oitava bicamada o filme (nanocompósito/NiTsPc) apresenta mais SWNT, enquanto que a partir da décima bicamada é o filme (PAMAM G2/SWNT) que adsorve uma quantidade maior de SWNT. A literatura mostra que a densidade de nanotubos de carbono em transistores de efeito de campo é um fator determinante na sensibilidade e no limite de detecção de proteínas, sendo densidades menores mais apropriadas para este tipo de aplicação.⁽⁴⁹⁾ É plausível que este parâmetro também seja crucial na performance de biossensores eletroquímicos com transdutores baseados em filmes automontados. É importante ressaltar que as concentrações de SWNT nas soluções não foram idênticas nos sistemas estudados: 0,5 g/L para a plataforma (PAMAM G2/SWNT) e 0,05 g/L na solução final do nanocompósito contendo PAMAM G2, revelando

que neste caso a transferência de SWNT da solução para o filme foi mais eficiente em termos relativos. Novamente, há predomínio de dímeros neste sistema.

Para comparar as características da NiTsPc imobilizada nos filmes com as da molécula em solução, obteve-se um espectro para uma solução 0,04 g/L com pH 5,5, como pode ser visto a seguir.

Figura 2.9 – Espectro de absorção óptica para uma solução de NiTsPc 0,04 g/L com pH 5,5.

Fonte:Elaborada pela autora.

Esta curva mostra que o pico associado aos dímeros e o ombro referente aos monômeros estão localizados em 621 e 661 nm, respectivamente, mostrando que o deslocamento observado quando a molécula foi imobilizada na forma de filme automontado foi pequeno. Em todos os casos, a NiTsPc parece estar presente predominantemente na forma de dímeros.

A seguir encontram-se os espectros de FTIR de filmes *cast* de PAMAM G2 e NiTsPc e a curva referente ao filme automontado (PAMAM G2/NiTsPc)₃₀. A tabela 2.2 traz uma lista com as atribuições das bandas mais importantes presentes nestas três amostras.

Figura 2.10 – Espectros de FTIR para o estudo da interação dos polieletrólitos que formam o filme LbL. As curvas preta, azul e vermelha representam, respectivamente, os resultados para PAMAM G2 *cast*, NiTsPc *cast* e (PAMAM G2/NiTsPc)₃₀.

Fonte:Elaborada pela autora.

Tabela 2.2 – Atribuições das bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para PAMAM G2 e NiTsPc imobilizadas em filmes *cast* e no filme automontado (PAMAM G2/NiTsPc)₃₀.

Atribuição	PAMAM G2	NiTsPc	(PAMAM G2/NiTsPc) ₃₀
Vibração do macrociclo (50)		637	635
Vibração do macrociclo (50)		650	650
Deformação angular C-H perpendicular ao plano (22)		702	702
Deformação angular C-H perpendicular ao plano (22)		749	749
Estiramento SO_3^- (50)		1032	1024
Estiramento C-N em amina (51)	1035		
Estiramento SO_3^- (50)		1066	1064
Deformação angular C-H no plano (22)		1147	
Estiramento SO_3^- (50)		1194	1178
Estiramento SO_3^- (52)		1227	1219
Estiramento pirrol (50)		1331	1331
Deformação N-H no plano (53)	1362		

continua

continuação

Estiramento isoindol (50)	1406	1406
Deformação angular H-C-H (54)	1461	1464
Estiramento isoindol (52)	1492	
Estiramento pirrol C=C, C=N (52)	1534	
Amida secundária (HNC=O) (55)	1552	1552
Estiramento C=O em amida (56)	1650	1664
Estiramento anel benzênico (52)	1656	
Ni - ligante axial (52)	1716	
Estiramento assimétrico CH (57)	2781	
Estiramento assimétrico CH ₂ (55)	2835	
Estiramento assimétrico C-H alquila (57)	2877	
Estiramento assimétrico C-H alquila (57,58)	2924	
Estiramento simétrico CH ₂ (55)	2955	
Harmônico de amida secundária e ressonância de Fermi da vibração N-H (54)	3064	3082
Estiramento N-H em amina primária, H ligado (55,56)	3254	3277

Fonte:Elaborada pela autora.

O formato do espectro do filme (PAMAM G2/NiTsPc)₃₀ se assemelha, de forma geral, ao do filme *cast* de NiTsPc. Seis bandas apresentaram deslocamentos em relação aos resultados dos materiais puros (em cm⁻¹): 1024, 1178 e 1219, provenientes das bandas em 1032, 1194 e 1227 da NiTsPc, e 1664, 3082 e 3277, originadas das bandas em 1650, 3064 e 3254 da PAMAM G2. Estes deslocamentos indicam uma interação dos dois polieletrólitos que formam o filme. Os deslocamentos para 1024 cm⁻¹ e 1178 cm⁻¹ já tinham sido observados em sistemas semelhantes.(31,58) Estas duas bandas e a localizada em 1219 cm⁻¹ indicam que a vibração dos grupos sulfônicos da Pc imobilizada no filme LbL está associada a uma massa maior do que aquela presente no filme *cast*, sugerindo que os grupos SO₃⁻ do poliânion e NH₃⁺ do policátion estão interagindo fortemente através de forças coulombianas. A banda em 1664 cm⁻¹ no espectro da multicamada provavelmente é resultante de uma combinação da banda em 1650 cm⁻¹ da PAMAM e das bandas de baixa intensidade na região de 1656 cm⁻¹ da NiTsPc, e corrobora a interação entre os polieletrólitos. As bandas em 1716 e 2781 cm⁻¹ foram suprimidas no espectro do filme automontado. Isto indica que estes modos vibracionais foram comprometidos pela formação das multicamadas. É possível que o átomo de níquel esteja

estabelecendo uma interação não específica com a PAMAM, provavelmente através de uma ligação de coordenação, como foi observado anteriormente para a ftalocianina de ferro.(52)

Os espectros Raman relativos ao sistema (PAMAM G2/NiTsPc)₁₅ estão reunidos na figura 2.11. Para investigar o efeito da imobilização deste material nas multicamadas com PAMAM G2, foram feitas medidas com a substância isolada, na forma de pó, e com o filme LbL. Na tabela 2.3 podem ser vistas as atribuições dos picos observados nestes espectros.

Figura 2.11 – Espectros Raman para o estudo da interação entre PAMAM G2 e NiTsPc no filme LbL. As curvas preta e vermelha representam, respectivamente, os resultados para NiTsPc em pó e para (PAMAM G2/NiTsPc)₁₅.

Fonte:Elaborada pela autora.

Tabela 2.3 – Atribuições (52) dos picos (em cm^{-1}) observados nos espectros Raman para NiTsPc em pó e imobilizada no filme automontado (PAMAM G2/NiTsPc)₁₅.

Atribuição	NiTsPc em pó	(PAMAM G2/NiTsPc) ₁₅
Deformação isoindol	507	504
Vibração macrociclo	603	600
Vibração macrociclo	686	689
Vibração macrociclo	751	751
Respiração do anel benzênico	965	962
Deformação angular C-H	1094	1114
Deformação angular C-H	1122	1136
Estiramento SO_3^-	1188	1186
Deformação angular C-H	1262	1268
Estiramento pirrol	1335	1335
Estiramento C-N	1466	1466
Estiramento pirrol C=C, C=N	1553	1547

Fonte:Elaborada pela autora.

De acordo com os valores listados na tabela anterior, quatro bandas sofreram deslocamento por conta da imobilização da NiTsPc no filme multicamadas: três delas associadas à deformação angular C-H (em 1094, 1122 e 1262 cm^{-1}) e uma ao estiramento pirrol (em 1553 cm^{-1}). Neste último caso, a frequência registrada no filme foi menor do que a da amostra em pó, sugerindo uma intensa interação entre as camadas.

Um estudo análogo foi feito para o filme automontado contendo SWNT. Estes resultados estão reunidos na figura 2.12.

Figura 2.12 – Espectros Raman para o estudo da interação entre PAMAM G2 e SWNT no filme LbL. As curvas preta e vermelha representam, respectivamente, os resultados para SWNT em pó e para (PAMAM G2/SWNT)₁₅.

Fonte:Elaborada pela autora.

Tabela 2.4 – Atribuições dos picos (em cm^{-1}) observados nos espectros Raman para SWNT em pó e imobilizado no filme automontado (PAMAM G2/SWNT)₁₅.

Atribuição	SWNT em pó	(PAMAM G2/SWNT) ₁₅
Banda RBM	197	197
Modo de segunda ordem		862
Modo de segunda ordem		1069
Banda D	1316	1308
Banda G	1589	1581
Modo de segunda ordem		1732

continua

continuação

Modo de segunda ordem		1917
Modo de segunda ordem		2442
Banda G'	2626	2618

Fonte:Elaborada pela autora.

A banda RBM foi observada nestes espectros, mas limitações nos filtros do equipamento comprometeram a qualidade dos picos nesta região. Por isso, não será realizada nenhuma análise quantitativa envolvendo este modo vibracional.

O estudo da banda G é uma importante ferramenta na caracterização de SWNTs.(59) Ela é composta por uma superposição de cinco ou seis bandas que se apresentam como uma unidade. Os seus dois picos de maior intensidade, representados por ω^+ e ω^- – em magnitude decrescente em frequência – são os que de fato contribuem para a investigação da natureza dos nanotubos. Sabe-se que, para nanotubos metálicos, estes dois picos são assimétricos e a banda associada a ω^- é mais larga; já as estruturas semicondutoras apresentam características opostas para o sinal nesta mesma frequência: trata-se de uma banda semelhante em forma à que se observa em ω^+ . Uma análise dos espectros acima revela que parece haver um predomínio de espécies metálicas, tanto no pó isolado quanto no filme, embora as frequências propriamente ditas não tenham sido coincidentes ($\omega^+ = 1594 \text{ cm}^{-1}$ e $\omega^- = 1589 \text{ cm}^{-1}$ para a amostra pura, $\omega^+ = 1581 \text{ cm}^{-1}$ e $\omega^- = 1563 \text{ cm}^{-1}$ para a imobilizada nas multicamadas).

Análises semelhantes feitas com a amostra (nanocompósito/NiTsPc)₁₅ mostraram que não houve deslocamento de picos. Sendo assim, não foi possível usar esta técnica para elucidar a interação entre as bicamadas neste sistema.

Na figura 2.13 estão reunidas imagens de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ de microscopia de força atômica para as amostras das multicamadas (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc).

Figura 2.13 – Imagens de AFM para filmes contendo uma, três, sete e 15 bicamadas dos sistemas (PAMAM G2/NiTsPc) (b-e), (PAMAM G2/SWNT) (f-i) e (nanocompósito/NiTsPc) (j-m). Em (a) são exibidas imagens do substrato de vidro BK7. À esquerda são exibidas imagens bidimensionais, enquanto que à direita estão reunidas representações tridimensionais.

(a)

(b)

(c)

(d)

continua

continuação

(e)

(f)

(g)

(h)

continua

continuação

(i)

(j)

(k)

(l)

continua

continuação

Fonte:Elaborada pela autora.

Os valores de rugosidade rms para as amostras exibidas na figura anterior estão reunidos na tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Valores de rugosidade rms para os filmes (PAMAM G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc) e o substrato de vidro BK7.

Amostra	Rugosidade rms (nm)
vidro BK7	4,98
(PAMAM G2/NiTsPc) ₁	1,27
(PAMAM G2/NiTsPc) ₃	1,48
(PAMAM G2/NiTsPc) ₇	2,58
(PAMAM G2/NiTsPc) ₁₅	13,79
(PAMAM G2/SWNT) ₁	3,61
(PAMAM G2/SWNT) ₃	6,52
(PAMAM G2/SWNT) ₇	8,81
(PAMAM G2/SWNT) ₁₅	19,40
(nanocompósito/NiTsPc) ₁	4,49
(nanocompósito/NiTsPc) ₃	4,94
(nanocompósito/NiTsPc) ₇	2,85
(nanocompósito/NiTsPc) ₁₅	20,50

Fonte:Elaborada pela autora.

Observando-se as imagens de AFM, pode-se concluir que os filmes são significativamente rugosos e que o crescimento das bicamadas se dá através da formação de aglomerados, ou colunas. A presença destas estruturas, típicas de filmes automontados, sugere que as multicamadas começaram a crescer sobre o substrato através de um mecanismo de competição com a água que atuava como solvente dos polieletrólitos.(60) Como o vidro é hidrofílico, tanto os polieletrólitos quanto a água apresentaram afinidade pelo substrato. O resultado é que, nas amostras com poucas bicamadas, há a presença de ilhas de multicamadas circundadas por áreas sem filme, onde houve deposição de água, apenas. Conforme o número de deposições aumenta, a influência do substrato hidrofílico diminui, fazendo com que uma área maior do filme seja coberta com polieletrólitos, e não água. Este fenômeno explica a morfologia destas nanoestruturas e o aumento no número de agregados com o número de bicamadas.

Os resultados da tabela 2.5 mostram que a rugosidade cresce significativamente com o número de bicamadas. Quando este número é reduzido, a rugosidade do filme é menor do que a do substrato, mas a presença dos aglomerados nas amostras com 15 bicamadas torna as multicamadas muito mais rugosas. Deve-se destacar que a elevada rugosidade é uma característica desejável em filmes finos usados em sensores eletroquímicos, uma vez que eles proporcionam uma área maior para interação com o analito.

A seguir são apresentados os resultados dos estudos eletroquímicos das multicamadas (PAMAM G2/SWNT), (PAMAM G2/NiTsPc) e (nanocompósito/NiTsPc). Abaixo estão reunidos os voltamogramas cíclicos obtidos para estes três eletrodos modificados, em dois eletrólitos distintos, H_2SO_4 0,1 M e $[\text{Fe}(\text{CN})]^{4-}$ 2 mM em H_2SO_4 0,1 M. O objetivo foi observar as características eletroativas dos filmes, além das propriedades catalíticas dos eletrodos modificados na presença de uma espécie eletroativa.

Figura 2.14 – Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados do tipo (a) (PAMAM G2/SWNT) em H_2SO_4 0,1 M e (b) (PAMAM G2/SWNT) em H_2SO_4 0,1 M com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 2 mM.

Fonte:Elaborada pela autora.

Figura 2.15 – Voltamogramas para eletrodos modificados do tipo (a) (PAMAM G2/NiTsPc) em H_2SO_4 0,1 M e (b) (PAMAM G2/NiTsPc) em H_2SO_4 0,1 M com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 2 mM.

Fonte:Elaborada pela autora.

Figura 2.16 – Voltamogramas para eletrodos modificados do tipo (a) (nanocompósito/NiTsPc) em H_2SO_4 0,1 M e (b) (nanocompósito/NiTsPc) em H_2SO_4 0,1 M com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 2 mM.

Fonte:Elaborada pela autora.

Do ponto de vista eletroquímico, o sistema envolvendo apenas PAMAM e SWNT é o mais simples, uma vez que nenhum destes compostos apresenta atividade eletroquímica no

intervalo de potencial estudado.(61) Observando-se os voltamogramas da figura 2.14 (a), nota-se que os eletrodos não apresentam picos redox, apenas um aumento da corrente capacitiva gerada por processos não faradaicos. Na figura 2.14 (b), verificou-se que não há diferenças significativas na magnitude da corrente para os filmes com diferentes números de bicamadas, apenas um pequeno deslocamento do potencial de oxidação de 0,54 V para o filme com uma bicamada para 0,50 V para o filme com 15 bicamadas. Isto indica que este eletrodo modificado não é catalítico para a sonda em questão.

Diferentemente do observado para o sistema anterior, os sistemas contendo ftalocianinas apresentam comportamento eletroquímico extremamente rico e de difícil interpretação. O anel de Pc exibe resposta redox variável dependendo do meio em que se encontra – solução ou filme –, das condições físico-químicas do ambiente – pH, força iônica, concentração do macrociclo – e das características específicas do composto – estado de agregação, modificações na estrutura do anel, tipo de átomo metálico.(45,62) Um dos tópicos controversos em estudos eletroquímicos de Pcs é a determinação dos potenciais redox do anel e do centro metálico. Alguns autores consideram que os processos redox que necessitam de potenciais maiores para ocorrer são os que envolvem o átomo metálico (63), enquanto que outros relatam que é o anel que precisa de energias maiores para sofrer transferência de carga.(64) Observando-se a figura 2.10, nota-se que a vibração associada ao átomo de níquel está ausente no filme automontado. Isto é um indício de que este metal pode estar interagindo com o outro polieletrólito, auxiliando a estabilidade das multicamadas. Se isso de fato ocorrer, é provável que um aumento no número de bicamadas no eletrodo modificado não interfira significativamente na magnitude das correntes, uma vez que esta interação torna o metal menos disponível para as reações redox. Sendo assim, sugere-se que, nas amostras contendo Pc, o pico de oxidação do metal é o que se manifesta em potenciais maiores, pois o aumento relativo de corrente foi menor do que o obtido para o pico adjacente.

Apesar desta incerteza a respeito da atribuição dos processos redox envolvidos nestas multicamadas, pode-se observar que elas apresentam uma característica que favorece seu uso em sensores eletroquímicos: o eletrodo modificado exibe eletroatividade apenas para potenciais elevados, deixando uma vasta janela de potencial para a detecção de analitos sem interferência dos processos próprios do filme.

É necessário destacar também que o filme de 15 bicamadas apresentou um comportamento bastante distinto daquele verificado para as demais amostras. A amplitude da

corrente na redução do íon ferrocianato foi maior neste eletrodo modificado, indicando que filmes com maior número de bicamadas são mais adequados para o uso em sensores eletroquímicos elaborados para analitos semelhantes a este íon. Para o eletrodo modificado com nanocompósito, a amplitude registrada para os filmes com uma, três e sete bicamadas foi ainda menor do que a obtida com o filme de Pc sem SWNT.

Os eletrodos modificados foram submetidos a diversas varreduras seguidas para a avaliação de sua estabilidade. As três amostras sofreram queda significativa de intensidade de corrente, e após poucos ciclos a resposta eletroquímica era nula. Esta é uma evidência de que estas plataformas só poderiam ser usadas em sensores eletroquímicos descartáveis.

Os três sistemas também foram testados quanto à velocidade de varredura nos experimentos de voltametria cíclica. Após as primeiras varreduras, as correntes se tornaram nulas, impossibilitando um estudo sistemático da cinética de transferência de cargas nos eletrodos.

Recentemente, Mugadza e colaboradores descreveram a detecção de amitrol com eletrodos de carbono vítreo modificados com um nanocompósito covalente de SWNT e 2, (3)-tetra-(4-oxobenzamida) ftalocianinato de cobalto.⁽⁶⁵⁾ Do ponto de vista de detecção pela técnica de voltametria cíclica, o desempenho eletroquímico deste sistema não foi adequado, uma vez que a oxirredução do amitrol foi observada na mesma região de potencial dos processos redox do eletrodo isolado (em torno de 0,75 V) dificultando a análise da presença do analito. Os eletrodos modificados com poucas bicamadas de filme do tipo (nanocompósito/NiTsPc) propostos neste projeto podem ser uma alternativa para a detecção de analitos com elevados potenciais redox, uma vez que sua atividade eletroquímica só se manifesta em potenciais muito elevados (em torno de 1,2 V).

2.4 Conclusões parciais

Neste capítulo, relatou-se um estudo de caracterização de filmes multicamadas do tipo *layer-by-layer* contendo dois dos nanomateriais mais comumente usados para melhorar o desempenho de eletrodos modificados para aplicações em biossensores eletroquímicos: os nanotubos de carbono de parede simples e as metaloftalocianinas. As plataformas (PAMAM

G2/NiTsPc), (PAMAM G2/SWNT) e (nanocompósito/NiTsPc) apresentaram crescimento exponencial das bicamadas, indicando que os polieletrólitos difundem através do filme ao invés de se organizar em camadas estratificadas com interfaces bem definidas. Medidas de espectroscopia vibracional revelaram que forças de atração eletrostática e a ligação de coordenação entre o átomo de níquel da Pc e as aminas da PAMAM G2 são os principais fatores na manutenção da estrutura destes filmes. A caracterização por AFM mostrou que a morfologia predominante na superfície das multicamadas é colunar, e que o aumento no número de bicamadas leva a um acréscimo significativo da rugosidade. Medidas de voltametria cíclica proporcionaram uma investigação mais detalhada do comportamento eletroquímico destes sistemas. Os voltamogramas mostraram que estes filmes apresentam potencial como transdutores em sensores eletroquímicos descartáveis, pois os processos redox relativos aos componentes do filme ocorrem em potenciais elevados, e não devem interferir na detecção de uma grande variedade de analitos.

3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO NANOTOXICOLÓGICA *IN VITRO* EM CÉLULAS F C3H DO NANOCOMPÓSITO SWNT/PAMAM

3.1 Introdução

3.1.1 Nanocompósitos de nanotubos de carbono e dendrímeros

O desenvolvimento da nanociência nas últimas décadas gerou um extenso acervo de nanomateriais com as mais distintas características, incluindo a natureza química do material precursor – metal, semicondutor, polímero, material carbonáceo –, o tamanho, a forma e as propriedades de superfície. Uma das consequências desta grande variedade de nano-objetos foi o surgimento de nanocompósitos, materiais feitos a partir da mistura de dois ou mais componentes. A união destas duas fases tem como objetivo potencializar uma determinada propriedade desejável ou atenuar um efeito negativo de um dos constituintes. É também possível que um nanocompósito apresente uma nova e única característica, ausente nos seus componentes isolados.

Entre os nanocompósitos desenvolvidos recentemente, destaca-se o obtido a partir da interação de nanotubos de carbono e dendrímeros ou polímeros hiper-ramificados. O primeiro relato sobre este novo material ocorreu em 2001, com a caracterização de algumas de suas propriedades.⁽⁶⁶⁾ Desde então, esta nova nanopartícula tem sido objeto de investigação de muitos grupos de pesquisa, cujos esforços permeiam vários aspectos da fabricação e do uso do nanocompósito, como otimização da síntese, caracterização físico-química, descoberta de aplicações e estudo dos seus efeitos biológicos, incluindo sua toxicidade. O processo de produção desta nanopartícula também é classificado como uma funcionalização dos nanotubos, embora neste caso o grupo funcional seja formado por uma molécula completa de dendrímero ou por dêndrons, em vez de um pequeno grupo orgânico. A maioria das publicações nesta área explora o uso da poli(amidoamina), a PAMAM, como elemento modificador do nanomaterial carbonáceo.

O nanocompósito CNT/dendrímero pode ser mantido através de ligações covalentes, mais frequentes na literatura, e interações não covalentes.(67) As primeiras demandam reações químicas de múltiplas etapas, que em geral levam dias para ser finalizadas, e dependem da presença de funcionalizações específicas nas paredes dos nanotubos de carbono. Entretanto, apresentam a vantagem de ser comprovadamente estáveis. As interações não covalentes são menos exploradas, embora sejam o método mais fácil e rápido para a obtenção do nanocompósito. Além disso, este tipo de funcionalização permite que a rede de carbonos sp^2 dos nanotubos permaneça intacta, o que preserva muitas das suas propriedades elétricas e ópticas por evitar a geração de defeitos. Há artigos que descrevem a junção dos CNTs e polímeros através de empilhamento $\pi - \pi$, emaranhamento físico, interações de van der Waals e, no caso de nanotubos oxidados, atração eletrostática e ligação de hidrogênio.(67) No primeiro caso, o empilhamento $\pi - \pi$ depende da introdução de anéis aromáticos, como os que existem no naftaleno, fenantreno, pireno e nas porfirinas e ftalocianinas, na estrutura do dendrímero. Como os trabalhos em geral são desenvolvidos a partir do uso de técnicas experimentais, a atribuição de um tipo específico de interação para justificar a estabilização do nanocompósito é muitas vezes especulativa. O próximo capítulo traz um estudo detalhado e sistemático sobre a interação entre CNTs e PAMAM que visa contribuir para o entendimento da formação e manutenção da estrutura do nanocompósito.

Distintas aplicações foram exploradas para este nanomaterial nos últimos anos. Uma das mais comuns é o emprego de dendrímeros para a síntese de nanotubos de carbono. O polímero é usado na obtenção de um tipo de nanopartícula metálica, que é empregada como catalisador no crescimento de nanotubos a alta temperatura; em algumas situações, os dendrímeros são também a fonte de carbono dos nanotubos. A nanopartícula mais produzida neste tipo de síntese é a de óxido de ferro, Fe_2O_3 .(68) A inserção de dendrímeros ou dândrons nas paredes dos CNTs é também uma contribuição importante para aumentar a dispersabilidade destes nano-objetos em água. Nanotubos de carbono formam dispersões em solventes orgânicos facilmente, mas são insolúveis em água quando não funcionalizados, o que dificulta o seu uso em certas aplicações, principalmente no campo biomédico. Quando em contato com tecido biológico, agregados de CNTs podem resultar em interações heterogêneas em organelas celulares distintas e causar efeitos adversos.(67)

A medicina é uma das áreas mais promissoras para o uso deste nanocompósito, como exemplifica a sua imobilização em biossensores amperométricos. Numa das primeiras publicações focadas neste ramo, Zeng e colaboradores (69) produziram um sensor que usava

um nanocompósito CNT/PAMAM com as enzimas glicose oxidase e peroxidase de raiz forte para detecção de glicose. A presença do nanotubo de carbono assegurou uma rápida transferência de elétrons para o eletrodo e a PAMAM permitiu a imobilização por ligação covalente das duas enzimas, com alta densidade de cada uma delas nos eletrodos modificados. Como resultado, obteve-se um sensor com potencial de operação de $-0,34\text{ V}$, o que proporcionou a detecção eletroquímica de glicose sem sinais de interferentes, normalmente presentes em sensores com a mesma finalidade, que usam a janela $+0,1$ a $+0,4\text{ V}$. As propriedades bactericidas do nanocompósito, por sua vez, foram destacadas por Yuan e colaboradores.(70) Observou-se que as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas gram-negativas, apresentam a mesma taxa de mortalidade quando em contato com nanocompósitos do tipo CNT/PAMAM e CNT/PAMAM/Ag, enquanto que a gram-positiva *Staphylococcus aureus* exibe mortalidade marcadamente maior após exposição ao híbrido contendo nanopartícula de prata, em comparação com os valores registrados para o nanocompósito isolado. Os autores especularam que as toxicidades observadas para as três espécies estudadas provavelmente estão associadas à diferença de espessura da camada de peptidoglicano na parede celular das bactérias: nas gram-negativas, a parede tem em torno de 8 nm , enquanto que nas gram-positivas este valor varia entre 20 e 80 nm .

Apesar destes exemplos bem-sucedidos de aplicações, nenhum ganhou tanto destaque nos últimos anos quanto a tentativa de empregar o nanocompósito CNT/dendrímero como um carreador de fármacos e material genético para o interior celular. Nanotubos de carbono e dendrímeros podem desempenhar isoladamente esta função, mas há desvantagens envolvendo ambas as nanopartículas. Sabe-se que os nanotubos são internalizados facilmente por diferentes tipos de células de mamíferos, mas mesmo após a funcionalização armazenam um número reduzido de moléculas, sendo assim um carreador pouco eficiente. A toxicidade dos nanotubos de carbono, por sua vez, ainda é um tópico controverso, pois a literatura apresenta diversos estudos contraditórios sobre a influência de fatores como a presença de uma ou múltiplas paredes, presença de catalisadores metálicos, razão de aspecto e funcionalização nos efeitos biológicos deste nanomaterial.(71) Ainda assim, há um número significativo de publicações que relatam redução na toxicidade de CNTs após a introdução de grupos orgânicos em suas paredes, e esta se tornou uma estratégia recorrente para reduzir seus efeitos deletérios.(72) Os dendrímeros, por sua vez, são menos tóxicos e armazenam um número muito maior de moléculas terapêuticas, pois seus espaços interiores podem abrigar moléculas pequenas e as aminas protonadas em sua superfície, presentes em pH ácido e neutro, podem

estabelecer forças de atração eletrostática com grupos fosfato de fitas de DNA ou RNA. Porém, a capacidade dos dendrímeros de penetrar membranas celulares não é tão proeminente quanto a dos CNTs. O nanocompósito se mostrou, então, uma alternativa para produzir um novo nanocarreador com elevada eficácia e baixa toxicidade.

A maioria dos trabalhos que propõe a aplicação do nanocompósito CNT/dendrímero na área de entrega controlada de substâncias descreve experimentos com DNA e RNA (do inglês *deoxyribonucleic* e *ribonucleic acid*, respectivamente), ou seja, está focada em desenvolver terapias gênicas, principalmente para tratamento de cânceres. Uma das modalidades deste tratamento em potencial é a administração de nucleotídeos *antisense*, na qual o gene associado à produção de uma proteína essencial para a sobrevivência das células tumorais tem sua ação bloqueada pelo pareamento da sua fita de RNA mensageiro, mRNA, com uma fita complementar, comprometendo assim a tradução da proteína em questão. Este tipo de terapia é de difícil implementação, já que os curtos trechos de mRNA introduzidos no organismo têm dificuldade para penetrar a membrana celular. Além disso, após cruzarem esta barreira, ficam expostos à ação deletéria de ribonucleases, cuja função é degradar RNA. O estudo pioneiro sobre a administração *in vitro* de material genético usando o nanocompósito como veículo foi feito em 2009 por Pan e coautores.⁽⁷³⁾ Neste trabalho de prova de conceito, células humanas MCF-7 e MDA-MB-435, de tumor de mama, e HepG2, de tumor de fígado, foram incubadas com o nanocompósito contendo a sequência complementar dos cinco primeiros códon de mRNA do gene Myc, cuja mutação altera a proliferação celular de forma a iniciar o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Os resultados mostraram que a inibição da expressão da proteína Myc depende da dose de nanocompósito com nucleotídeos *antisense* e do tempo de administração. Além dos experimentos de regulação de expressão gênica, os autores conduziram a mais completa caracterização físico-química do nanocompósito publicada até hoje, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, espectroscopias FTIR e Raman, termogravimetria e potencial ζ . Seguiram-se publicações semelhantes, relatando estudos com diferentes linhagens celulares tumorais humanas – de colo de útero (72,74,75), mama (76) e pulmão (77), principalmente –, atestando assim a capacidade desta nanopartícula de atuar como um carreador de diferentes tipos de RNA com taxas elevadas de transferência de material genético para as células em questão. Desta forma, o nanocompósito se tornou uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos carreadores na terapia gênica.

Assim como outros nanomateriais, o nanocompósito CNT/dendrímico pode ser funcionalizado com grupos que aumentem a chance de interação com células alvo em detrimento de outros tipos de células. Shi, Shen e colaboradores propuseram a adição de ácido fólico à superfície do nanocompósito para restringir a adsorção da nanopartícula a células tumorais que expressam receptores de ácido fólico em suas membranas celulares, atribuindo assim seletividade ao nano-objeto.(78) A presença de receptores de ácido fólico na superfície celular é comum em muitos tipos de carcinoma humano, dentre eles os de mama, ovário, endométrio, rim, pulmão, cabeça e pescoço, cérebro e tecido mieloide.(78) No trabalho em questão, os autores cultivaram células KB, derivadas de carcinoma oral, em duas formas distintas: com e sem receptores de ácido fólico. Através de experimentos de citometria de fluxo e de microscopia confocal, provou-se que a internalização das nanopartículas ocorre somente nas células contendo os receptores em sua superfície e quando o nanocompósito abriga moléculas de ácido fólico, comprovando-se assim a seletividade do processo. Alguns anos depois, o mesmo grupo de pesquisa aprimorou esta aplicação do nanocompósito através da incorporação de doxorubicina, uma das drogas antitumorais mais comuns, via empilhamento π - π com a parede dos nanotubos. Esta nova nanopartícula permite a entrega controlada do fármaco com taxas de liberação altas em meios ácidos e baixas em ambientes com pH fisiológico. Este efeito ocorre graças à hidrofobicidade variável da doxorubicina, que tende a interagir fortemente com os nanotubos de carbono em pH básico e se torna solúvel em água quando protonada.(79)

3.1.2 Toxicidade do nanocompósito SWNT/PAMAM

O desenvolvimento da nanociência nos últimos anos permitiu a síntese de novos materiais com propriedades inéditas. Atualmente, os avanços provocados pela aplicação de nanopartículas estão confinados, em geral, ao domínio acadêmico, mas muitos apresentam potencial para serem implementados em breve, em áreas distintas, como medicina, eletrônica, tecnologias relacionadas a energia e tratamento de água e esgoto. Se o uso de nanopartículas de fato se disseminar, haverá um grande aumento na exposição de humanos e do ambiente a estes objetos nanométricos, o que origina um novo problema: os efeitos potencialmente nocivos dos nanomateriais aos seres vivos. A consequência imediata desta questão, que

competir não apenas à comunidade científica mas também às agências reguladoras, foi o surgimento de um novo ramo de pesquisa: a nanotoxicologia.

Os estudos nanotoxicológicos realizados nos últimos anos mostraram a associação ubíqua entre os efeitos provocados por um nanomaterial em uma entidade biológica e as características físico-químicas da nanopartícula. Diversas propriedades, como formato, tamanho, polidispersidade, composição, grau de agregação e corona gerada após contato com fluidos biológicos, podem afetar a interação com células e gerar efeitos benéficos ou nocivos.(80) Mesmo pequenas variações nestas características podem ter um impacto na resposta biológica, e como resultado desta dependência, tornaram-se mandatórias a detalhada investigação e a divulgação das características físico-químicas das nanopartículas, juntamente com os resultados dos experimentos biológicos. Relatar as propriedades do nanomaterial não é necessariamente suficiente para apontar uma causa para os efeitos observados, mas ao menos os restringe a materiais com aqueles atributos específicos e aumenta as chances de um estudo ser comparado a outros resultados na literatura, um dos problemas mais recorrentes no campo da nanotoxicologia.(81) Atualmente há a proposta de implementar a prática de incluir uma lista com as características físico-químicas essenciais dos nanomateriais em toda publicação na área.(81)

Alguns estudos sobre a toxicidade do nanocompósito SWNT/PAMAM foram desenvolvidos recentemente, e a maioria relata toxicidade muito baixa ou inexistente para concentrações convencionais de SWNT, em torno de 50 µg/mL.(73,76,77,78,82,83,84) Este fato, juntamente com a comprovada habilidade de penetrar células e liberar carga, fez com que o nanocompósito se tornasse um dos principais candidatos a nanocarreador de substâncias terapêuticas. Poucos artigos apontam para graus de toxicidade que limitariam a administração do nanocompósito.(74,75) Entretanto, a resposta celular a um determinado nanomaterial é fortemente dependente do tipo de célula, e não há descrição de experimentos *in vitro* sobre a interação entre esta nanopartícula e células saudáveis humanas. Este tipo de investigação é fundamental para a aplicação segura do nanocompósito, já que o contato entre células saudáveis próximas de um tumor e um nanofármaco deve ser minimizado com o avanço das técnicas de entrega controlada, mas dificilmente será eliminado. Além disso, os tratamentos envolvendo a nanopartícula não serão necessariamente restritos à área de câncer, e outras doenças poderão ser eliminadas através de terapias que dependam deste nanomaterial. Outra limitação destes estudos é que muito do que se conhece sobre o tópico foi elucidado através de ensaios de proliferação celular com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazólio], ou MTT, a sigla para o nome deste corante em inglês. Embora muito disseminada, a aplicação deste teste em experimentos com SWNTs tem sido desaconselhada, pois há evidências de que esta nanopartícula interage com a substância que dá nome ao ensaio, interferindo nos resultados.(85)

Este capítulo descreve uma extensa caracterização físico-química de nanocompósitos SWNT/PAMAM produzidos a partir de dendrímeros de gerações 2, 4 e 6. Foram estudados propriedades como diâmetro dos SWNTs e tamanho, carga e alguns aspectos da formação dos nanocompósitos. A toxicidade provocada pelo material foi avaliada em células F C3H, derivadas de fibroblastos saudáveis de fígado humano. A escolha desta linhagem celular para os ensaios foi guiada pela necessidade de investigar a toxicidade do nanocompósito em células saudáveis de um dos órgãos onde há maior acúmulo de nanomateriais após administração endovenosa. Para quantificar a morte celular, usou-se a técnica de citometria de fluxo, considerada atualmente a mais sensível para este tipo de avaliação.

3.2 Materiais e métodos

Nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com grupos carboxílicos, idênticos aos descritos na seção 2.2, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Para o estudo da formação do nanocompósito SWNT/PAMAM, foram testadas três gerações de dendrímero – 2, 4 e 6. Em todos os casos, o núcleo era composto de etilenodiamina. A PAMAM de geração 6 foi fornecida pela Sigma Aldrich, enquanto que as de gerações 2 e 4 foram adquiridas tanto desta empresa quanto da Dendritech. Cada molécula deste polímero contém 16, 64 e 256 aminas primárias em sua superfície, com diâmetros de 2,9 nm, 4,5 nm e 6,7 nm, respectivamente, para as gerações 2, 4 e 6.(38) Todos os produtos foram usados sem modificações. As informações sobre a cultura celular usada nos experimentos de citometria de fluxo estão reunidas no item 3.2.2.

3.2.1 Preparação e caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM

O método usado para fabricar o nanocompósito SWNT/PAMAM consistiu, basicamente, em colocar soluções das duas substâncias em contato por um período prolongado para garantir a interação entre os solutos e uma posterior separação do nanocompósito das demais espécies presentes na solução – SWNT e PAMAM nas suas formas livres. Trata-se do método mais simples encontrado na literatura para a formação de nanocompósitos de nanotubos de carbono e polímeros, pois não prevê a interação dos componentes através de ligações covalentes, que requerem longas reações químicas para ocorrer.

Não existem informações sobre a estequiometria que rege a formação do nanocompósito. Por isso, determinou-se que a razão entre o número de moléculas de PAMAM e de nanotubo deveria ser extremamente elevada, uma vez que o nanotubo apresenta uma dimensão que é três ordens de grandeza maior do que o diâmetro da maior PAMAM estudada, e portanto pode abrigar diversos sítios de interação com o dendrímero. Para valores usuais de concentrações de SWNT e PAMAM – 0,1, 1, 4, e 13 g/L, respectivamente, para os nanotubos de carbono e os dendrímeros de gerações 2, 4 e 6 –, estimou-se a razão entre o número de moléculas de polímero e de nanotubos na solução final do nanocompósito, considerando-se o uso de volumes iguais de solução para cada componente. Para tanto, as massas molares das PAMAMs foram consultadas na página eletrônica do fabricante (38) e a massa molar dos nanotubos foi estimada fazendo-se algumas aproximações: considerou-se que todos os nanotubos estavam presentes na dispersão na forma de feixes hexagonais com sete tubos, que todos os feixes tinham comprimento de 1 μm e que as áreas superficiais de SWNTs isolados (1315 m^2/g) e na forma de feixes (751 m^2/g) não foram afetadas pela funcionalização com grupos carboxílicos.(86) As razões obtidas apresentaram a ordem de grandeza de 10^4 , o que sugere que as quatro concentrações mencionadas acima parecem adequadas para conduzir os experimentos de fabricação dos nanocompósitos, se considerarmos o comprimento dos nanotubos e a tentativa de saturar todos os seus sítios de interação.

Definidas estas concentrações iniciais de nanotubo e de polímero, foram feitos os experimentos para a obtenção do nanocompósito. Volumes idênticos de soluções de SWNT e de PAMAM com pH 5,5 foram misturados e mantidos sob agitação por aproximadamente 14

horas. Em seguida, a solução resultante foi acondicionada em tubos plásticos de 2 mL e centrifugada por uma hora com uma velocidade de 10000 rpm. Retiraram-se então 1,5 mL de sobrenadante e ao 0,5 mL restante foi adicionado 0,5 mL de água ultrapura com pH 5,5. Os experimentos foram conduzidos com este precipitado, onde há maior chance de o nanocompósito estar.

As espectroscopias de absorção óptica e de absorção no infravermelho foram empregadas para avaliar a interação entre os componentes do nanocompósito e conferir a formação do novo material. O modo transmitância foi usado novamente nos experimentos de FTIR, com o estudo do precipitado e do sobrenadante resultantes do procedimento descrito no parágrafo anterior depositados como filmes *cast* em substratos de silício. Medidas de potencial ζ e de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) proporcionaram informações sobre a carga na superfície das nanopartículas e seu tamanho, respectivamente. Nos experimentos para a determinação do potencial ζ , foram realizadas medidas para a faixa de pH 5 – 8, já que o equipamento comporta um procedimento de titulação na amostra; novamente, foram usadas soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio para a modificação do pH. A faixa de pH 5 – 8 foi escolhida por conter os pHs de ambientes importantes do ponto de vista da internalização celular de nanopartículas: o pH do plasma sanguíneo é aproximadamente 7,4, muito semelhante ao do citoplasma, que fica em torno de 7, enquanto que o do interior dos endossomos, vesículas formadas durante o processo de endocitose, é significativamente menor – em torno de 5.⁽⁸⁷⁾ Como método alternativo de medição dos diâmetros dos SWNTs, obtiveram-se imagens por microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) de amostras depositadas em substrato de silício na forma de filmes *cast*. Já os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *isothermal titration calorimetry*) foram conduzidos para corroborar a formação do nanocompósito e obter informações sobre a termodinâmica deste processo.

Todas estas caracterizações foram feitas com a solução resultante do processo detalhado acima, sem modificações, exceto as medidas de calorimetria de titulação isotérmica. Para explorar esta técnica, foi necessário substituir o solvente aquoso por tampão citrato com pH 5,5, para que este parâmetro fosse constante ao longo do experimento; caso contrário, poderia haver absorção ou liberação de energia devido a flutuações desta grandeza, que poderiam ser muito maiores do que aquelas provocadas pela formação do nanocompósito.

O experimento de ITC merece ser descrito com mais detalhes, uma vez que ele não consiste apenas na análise da solução pronta dos novos nanomateriais. As soluções de SWNT e de PAMAM foram preparadas com tampão citrato 1 mM, para que o pH se mantivesse constante e igual a 5,5. A escolha do tipo de tampão foi guiada pela faixa de pH e pela força iônica das soluções resultantes, que deveria ser tão reduzida quanto possível para não diferir tanto das forças iônicas das amostras usadas nas demais caracterizações. O tampão citrato se mostrou, então, o mais adequado para satisfazer esta condição. A preparação da dispersão de SWNT foi planejada com o intuito de evitar o surgimento de agregados durante o procedimento, um fator que em geral é crítico em experimentos de ITC. A dispersão de nanotubos descrita anteriormente foi sonicada por mais uma hora e centrifugada por cinco minutos a 12000 rpm; o sobrenadante foi diluído no tampão citrato duas vezes e usado como a amostra de SWNT neste experimento. A obtenção de uma curva de calibração com esta dispersão permitiu a estimativa de que a concentração de SWNT usada no experimento de ITC tenha sido de 0,005 g/L.

A medida propriamente dita consistiu em uma série de injeções de 7 μ L de solução de PAMAM $1,07 \cdot 10^{-5}$ M em uma cela de 1,47 mL contendo a dispersão de SWNT descrita acima. O volume total de dendrímero introduzido na cela foi 300 μ L. A temperatura do sistema foi mantida em 25°C e a velocidade de agitação da cela foi 255 rpm. Os calores de diluição foram medidos titulando-se a solução de PAMAM na cela contendo o tampão na ausência do SWNT nas mesmas condições; estes calores foram descontados das medidas de interação. A cela de referência foi preenchida com água em todos os experimentos.

A tabela 3.1 reúne as técnicas, os equipamentos e os programas para análise usados neste conjunto de caracterizações.

Tabela 3.1 – Técnicas, equipamentos e programas para análise empregados na caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM.

Técnica	Equipamento/programa
Espectroscopia de absorção óptica	Espectrofotômetro Shimadzu UV3600
Espectroscopia de infravermelho	Espectrômetro Nicolet 6700/GRAMS Suite, resolução de 3 cm ⁻¹
Potencial ζ	Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments
Espalhamento dinâmico de luz	Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments
Microscopia eletrônica de varredura	JSM-6701F, JEOL/Gwyddion
Calorimetria de titulação isotérmica	VP-ITC Microcal/programa do fabricante

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens de SEM foram obtidas na Embrapa Instrumentação, em São Carlos.

3.2.2 Análise por citometria de fluxo da morte celular induzida pelo nanocompósito SWNT/PAMAM em células F C3H

A citometria de fluxo com marcação com anexina V associada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo (PI, do inglês *propidium iodide*) é usada para quantificar morte celular causada por apoptose e necrose. Em células na fase inicial da apoptose, a membrana celular permanece íntegra, porém com os lipídeos contendo fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*) movendo-se da camada interna da membrana para a externa, num fenômeno denominado *flip-flop*. Como a anexina V – FITC apresenta elevada afinidade com a PS, a proteína marcada com o fluoróforo se tornou um marcador para células apoptóticas nesta fase do processo. Todavia, algumas células em processo de necrose também conseguem se ligar à anexina, por causa dos defeitos estruturais presentes nas membranas destas células desde as primeiras etapas deste mecanismo de morte celular. Este comprometimento da integridade estrutural faz com que a membrana perca a capacidade de atuar como uma barreira para a entrada de moléculas na célula e por fim se rompa, causando o extravasamento de citoplasma no tecido, o que desencadeia uma reação inflamatória. O fato de a membrana se tornar muito permeável durante a necrose é usado

nesta técnica, pois nesta circunstância, o PI consegue ser internalizado pela célula, em qualquer fase do processo necrótico. Entretanto, células em apoptose tardia também podem internalizar o PI, já que a degradação da membrana também é observada nos últimos estágios deste processo. Assim, em experimentos de citometria de fluxo envolvendo os dois marcadores, pode-se classificar uma célula como pertencente a uma das quatro categorias a seguir.

- 1) Células negativas para anexina V – FITC e negativas para PI são células vivas que não estão atravessando nenhum processo de morte celular ou que estão em uma etapa muito precoce de algum processo, de modo que ele não é detectável.
- 2) Células positivas para anexina V – FITC e negativas para PI são células vivas que estão em estágio inicial de apoptose.
- 3) Células negativas para anexina V – FITC e positivas para PI são células vivas que estão em processo de necrose ou que já morreram através deste mecanismo.
- 4) Células positivas para anexina V – FITC e positivas para PI são células vivas que estão em fase adiantada de apoptose ou em necrose ou já mortas por apoptose ou necrose. Neste grupo, não há como fazer a distinção entre os dois tipos de morte celular.(88)

Para a realização dos experimentos nanotoxicológicos, células F C3H, de fibroblastos saudáveis de fígado humano, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, cresceram em meio Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica, a 37°C em ambiente úmido e a 5% de CO₂. As células foram mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada dois dias. Estas células foram então incubadas, por 24 horas, em placas de 24 poços com os nanomateriais cujos potenciais efeitos tóxicos seriam avaliados: os nanocompósitos e os componentes isolados, como um controle para averiguar se a morte celular registrada foi provocada pelo nanocompósito propriamente dito ou por seus constituintes. Para todos os tipos de nanomateriais, foram usadas concentrações de 50 µg/mL nestes ensaios; no caso dos nanocompósitos, a quantidade de material incubada foi tal que a concentração de SWNT também era de 50 µg/mL. Este valor foi escolhido por ser padrão em testes de nanotoxicidade.

O protocolo utilizado para a marcação das amostras com os fluoróforos foi o recomendado pela Becton-Dickinson, fabricante do *kit* usado no experimento, como descrito a seguir. As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino, ou PBS (do inglês *phosphate buffered saline*), 0,1× (relativo à concentração do tampão fornecido no *kit*), a 37°C e ressuspensas neste mesmo tampão até que fosse atingida uma concentração de 1.10^5 células/mL. Em seguida, foram transferidos 100 µL da solução de células para um tubo de cultura de 5 mL. A esse tubo foram adicionados 5 µL de anexina V – FITC e 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 a quantidade máxima que pode ser utilizada. As células foram agitadas utilizando-se o vórtex e levadas para incubação com estes marcadores por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após este tempo de incubação dos fluoróforos foram adicionados 400 µL de tampão PBS 1× em cada tubo. O experimento de citometria de fluxo propriamente dito foi realizado na janela de uma hora disponível para a fluorescência dos marcadores. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson San Jose, CA) com análise de dados no programa BD FACSDiva.

As dispersões de nanomateriais usadas nos ensaios nanotoxicológicos foram preparadas pela autora da tese, enquanto que o cultivo das células e as medidas de citometria de fluxo foram conduzidos pela Dra. Juliana Cancino Bernardi, que atua como pós-doutoranda no GNano.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Preparação e caracterização físico-química do nanocompósito SWNT/PAMAM

A seguir encontram-se os espectros de absorção óptica para os nanomateriais puros e os nanocompósitos envolvendo as três gerações de dendrímero.

Figura 3.1 – Espectros de absorção óptica dos nanocompósitos e seus constituintes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 3.1, apenas o espectro da PAMAM G6 apresenta uma banda bem definida, em 283 nm. Esta banda é provocada pelas carbonilas (89) e é evidente apenas em PAMAMs de elevadas gerações, podendo se manifestar como um ombro discreto em gerações menores, como ocorreu com a geração 4. O nanocompósito correspondente exibe a mesma banda, porém sem pico definido, com a presença de um ombro, apenas. Esta mudança no formato da banda pode ter sido causada pela modificação das características eletrônicas das carbonilas da PAMAM depois da interação com os nanotubos, ou pode ser resultante da elevada absorção provocada pelos elétrons π dos SWNTs.(48) De acordo com estes resultados, é necessário explorar outras técnicas de caracterização para comprovar a formação dos nanocompósitos.

Os espectros de FTIR obtidos para os nanocompósitos e seus constituintes estão reunidos abaixo; os resultados foram separados de acordo com a geração de dendrímero investigada. Para cada gráfico há uma tabela de atribuições correspondente, descrevendo as principais bandas de absorção de cada curva.

Figura 3.2 – Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G2 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G2 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3.2 – Atribuições das bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para filmes *cast* de SWNT, PAMAM G2, nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e seu sobrenadante.

Atribuição	SWNT	PAMAM G2	Nanocompósito	Sobrenadante
Estiramento C-O (51)	1105			
<i>Scissoring</i> H-C-H (54)		1458		1458
Amida secundária HNC=O (55)		1552	1552	1552
Estiramento C=O em amida (56)		1654	1654	1654
Estiramento assimétrico CH_2 (55)		2831		2831
Estiramento simétrico CH_2 (55)		2962		2962
Harmônico de amida secundária e ressonância de Fermi da vibração N-H (54)		3066		3066
Estiramento N-H em amina primária, H ligado (55) (56)		3256		3256

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.3 – Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G4 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G4 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3.3 – Atribuições das bandas (cm⁻¹) observadas nos espectros de FTIR para filmes *cast* de SWNT, PAMAM G4, nanocompósito SWNT/PAMAM G4 e seu sobrenadante.

Atribuição	SWNT	PAMAM G4	Nanocompósito	Sobrenadante
Estiramento C-N em amina (51)		1040	1040	1040
Estiramento C-O (51)	1105			
Deformação N-H no plano (53)		1368	1368	1368
<i>Scissoring</i> e deformação angular CH ₂ (51)		1442	1442	1442
Deformação angular CH ₂ (56)		1464	1464	1464
Amida secundária HNC=O (55)		1558	1558	1558
Estiramento C=O (55) (56)		1654	1654	1654
Estiramento assimétrico CH ₂ (55)		2840	2840	2840
Estiramento simétrico CH ₂ (55)		2963	2963	2963
Harmônico de amida secundária e ressonância de Fermi da vibração N-H (54)		3068	3068	3068
Estiramento N-H em amina primária, H ligado (55) (56)		3264	3264	3264
Estiramento N-H em amina primária, H livre (56)		3478		

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.4 – Espectros de FTIR para SWNT (preto), PAMAM G6 (azul), nanocompósito SWNT/PAMAM G6 (vermelho) e seu sobrenadante (verde). As principais bandas estão indicadas no gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3.4 – Atribuições das bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR para filmes *cast* de SWNT, PAMAM G6, nanocompósito SWNT/PAMAM G6 e seu sobrenadante.

Atribuição	SWNT	PAMAM G6	Nanocompósito	Sobrenadante
Estiramento C-N em amina (51)		1040	1040	1040
Estiramento C-O (51)	1108			
Deformação N-H no plano (53)		1368	1368	1368
Deformação angular CH_2 (56)		1465	1465	1465
Amida secundária HNC=O (55)		1556	1556	1556
Estiramento C=O (55) (56)		1653	1653	1653
Estiramento assimétrico CH_2 (55)		2832	2832	2832
Estiramento simétrico CH_2 (55)		2955	2955	2955
Harmônico de amida secundária e ressonância de Fermi da vibração N-H (54)		3069	3069	3069
Estiramento N-H em amina primária, H ligado (55) (56)		3257	3257	3257

Fonte: Elaborada pela autora.

As três tabelas anteriores mostram que não houve deslocamento de bandas em nenhum dos nanocompósitos estudados, e que há mudanças sutis no formato de algumas bandas. Outros tipos de caracterização são necessários para confirmar e descrever quantitativamente a interação entre os nanotubos e os dendrímeros.

A figura 3.5 exibe os potenciais ζ medidos para as nanopartículas isoladas e para os nanocompósitos com as três gerações de PAMAM. Considerando-se que as medidas de potencial ζ podem degradar as amostras, por submetê-las a um campo elétrico relativamente elevado, optou-se por fazer uma única medida com as amostras em questão. Entretanto, alguns experimentos preliminares proporcionaram resultados semelhantes, comprovando a validade das medidas mostradas a seguir.

Figura 3.5 – Potenciais ζ medidos para os constituintes dos nanocompósitos e os nanocompósitos de SWNT/PAMAM produzidos com as três gerações de dendrímero.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 3.5 mostra que os potenciais ζ das PAMAMs são sensíveis ao pH, ao contrário do que ocorre com o SWNT. De acordo com as curvas, os potenciais ζ das PAMAMs G2 e G4 são muito semelhantes em solução aquosa, principalmente na região de pH 7 – 9, apesar de o número previsto de cargas superficiais para as moléculas individuais ser bastante distinto – 16 para a geração 2 e 64 para a geração 4, em pHs neutros e básicos. Isto pode ser explicado pelo fato de o potencial ζ não ser gerado diretamente pela carga superficial da nanopartícula, e sim pelas cargas presentes na superfície da dupla camada formada quando o nanomaterial entra em contato com os contra-íons presentes na solução. Além disso, a PAMAM pode sofrer agregação em solução aquosa (90), e este processo pode fazer com que as cargas presentes na superfície do dendrímero não fiquem mais expostas ao solvente. As medidas de potencial ζ também revelam que esta grandeza cresce à medida que o pH diminui para todas as gerações avaliadas, o que é compatível com um aumento da protonação destas partículas. Quanto à amostra de SWNT, nota-se que ela apresenta uma elevada densidade de cargas negativas, mesmo para os valores mais baixos de pH estudados.

Os potenciais ζ medidos para os nanocompósitos são consideravelmente diferentes daqueles medidos para as nanopartículas isoladas e podem ser tomados como uma evidência da formação de um novo material. Na faixa de pH estudada, todos os potenciais são positivos, revelando que os nanocompósitos apresentam cargas positivas em sua superfície. Qualitativamente, as curvas são semelhantes às das PAMAMs isoladas, ou seja, elas são uma evidência de que são os dendrímeros, e não os nanotubos, que determinam o perfil da carga superficial destes nanocompósitos. Este fato é uma evidência de que as regiões dos nanotubos contendo carboxilas negativamente carregadas não devem estar expostas ao solvente por interagirem eletrostaticamente com a PAMAM. Em termos quantitativos, os gráficos mostram que a presença de PAMAMs de diferentes gerações não afeta significativamente o potencial ζ dos materiais. Todas as soluções apresentaram potenciais positivos e semelhantes variando de 20 mV a 50 mV, com a mesma tendência crescente para valores mais baixos de pH observada para as PAMAMs isoladas. Para o intervalo de pH entre 5 e 7,4, que engloba os pHs envolvidos num caso de administração via endovenosa das nanopartículas, os potenciais ζ têm magnitude superior a 30 mV, sendo os nanocompósitos livres de corona estáveis e apresentando baixa probabilidade de agregação.(91)

A seguir, encontram-se os gráficos resultantes das caracterizações através da técnica de DLS. São exibidos histogramas que revelam a população relativa de partículas para alguns

intervalos de diâmetros das nanopartículas. Foram feitas tentativas de medir os diâmetros das nanopartículas nas amostras de PAMAM G2 e G4 para concentrações que atingiram 2500 $\mu\text{g/mL}$ para a geração 2 e 500 $\mu\text{g/mL}$ para a geração 4. Nenhuma destas medidas apresentou um sinal suficientemente intenso para gerar dados confiáveis. Isto indica que provavelmente as PAMAMs não estão gerando agregados grandes nestas soluções, pois a intensidade de luz espalhada por uma partícula coloidal é inversamente proporcional ao seu diâmetro elevado à sexta potência.(91)

Figura 3.6 – Histogramas de população relativa de nanopartículas em relação ao diâmetro. (a) PAMAM G6; (b) - (d): nanocompósitos com PAMAMs G2, G4 e G6, nesta ordem. Valores de pH médios em cada amostra: 5,19 para a PAMAM G6, 5,07 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G2, 4,93 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G4 e 5,05 para o nanocompósito SWNT/PAMAM G6.

continua

continuação

continua

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

Os histogramas na figura 3.6 revelam uma elevada polidispersividade nas amostras. Os índices de polidispersividade obtidos foram 0,70, 0,32, 0,40 e 0,51, respectivamente, para a PAMAM G6 e os nanocompósitos com dendrímeros de gerações 2, 4 e 6. Estes valores indicam que há uma grande variação no diâmetro das nanopartículas em solução aquosa, tanto para a PAMAM G6 isolada quanto para os nanocompósitos. A faixa de diâmetros registrada para a PAMAM G6, de 5 a 10 nm, está compatível com o valor previsto para uma molécula isolada (38) e também indica a presença de aglomerados pequenos do dendrímero. Para os nanocompósitos, a maioria das nanopartículas apresenta diâmetros no intervalo de 50 a 200 nm. É importante ressaltar que nenhuma das caracterizações revelou a geometria destas nanopartículas, e os valores medidos através da técnica de DLS proporcionam uma boa estimativa de diâmetro apenas se elas forem esféricas, motivo pelo qual a técnica não foi usada para estimar a dimensão dos SWNTs.

Na figura 3.7 são mostradas as imagens obtidas por SEM das amostras contendo apenas SWNTs e os três tipos de nanocompósitos para determinação do diâmetro médio dos nanotubos de carbono.

Figura 3.7 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes regiões de amostras de SWNTs (a-c), nanocompósito SWNT/PAMAM G2 (d-f), nanocompósito SWNT/PAMAM G4 (g-i) e nanocompósito SWNT/PAMAM G6 (j-l). Todas as imagens foram obtidas com uma voltagem de aceleração do feixe primário de elétrons de 5 kV, exceto as imagens i-l, para as quais a voltagem foi 2 kV. A amplificação das imagens foi de 50000 vezes, exceto para as imagens b e e, cuja magnificação foi de 100000 vezes.

continua

continuação

(g)

(h)

(i)

(j)

(k)

(l)

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a medição dos diâmetros dos SWNTs exibidos nestas imagens, usou-se o programa Gwyddion. Selecionaram-se 20 nanotubos por imagem, totalizando-se assim 60 medidas por amostra. Os resultados encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Diâmetros médios na amostra de nanotubos de carbono isolados e nas amostras dos três nanocompósitos. Os valores são referentes à média aritmética de 60 medidas e o erro corresponde ao desvio padrão.

	SWNT	SWNT/PAMAM G2	SWNT/PAMAM G4	SWNT/PAMAM G6
Diâmetro médio (nm)	23,6 ± 4,8	23,6 ± 6,6	29,6 ± 7,1	27,6 ± 7,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados na tabela 3.5 revelam que os nanotubos não se apresentam na forma de feixes isolados de sete nanotubos, mas que alguns destes feixes se unem para formar uma unidade de diâmetro mais elevado. Este efeito provavelmente é provocado pela concentração relativamente elevada de SWNT nas soluções. Os resultados também mostram que a variação de diâmetro provocada pela funcionalização com PAMAM não é significativa. A presença do dendrímero não provocou a dispersão dos SWNTs, e para as gerações 4 e 6 os diâmetros obtidos foram 25,4% e 16,9% maiores do que para os SWNTs puros e para o nanocompósito contendo a geração 6.

A natureza da interação entre os dendrímeros de diferentes gerações e o SWNT foi avaliada através de medidas de calorimetria de titulação isotérmica. Os gráficos abaixo mostram os resultados. Executaram-se experimentos envolvendo as três gerações de dendrímero, porém as medidas com a PAMAM G6 não foram bem-sucedidas, pois o pH da solução de SWNT e PAMAM G6 não se manteve constante.

Figura 3.8 – Calores registrados a cada titulação de PAMAM G2 na solução de SWNT (gráfico superior) e áreas integradas de cada pico, com o calor de diluição já descontado (gráfico inferior).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.9 – Calores registrados a cada titulação de PAMAM G4 na solução de SWNT (gráfico superior) e áreas integradas de cada pico, com o calor de diluição já descontado (gráfico inferior).

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os gráficos acima, o processo de interação entre os dendrímeros e os nanotubos é exotérmico. O perfil de interação é caracterizado pela diminuição dos calores produzidos com o progresso das injeções provocada pela redução no número de sítios de interação disponíveis para a ligação até que a saturação ocorra e o sinal fique constante. Em razão da dificuldade para se determinar a concentração molar exata dos SWNTs, que são um material polidisperso, a análise quantitativa, que poderia revelar a estequiometria do nanocompósito, a afinidade entre os dois materiais e parâmetros termodinâmicos, como as contribuições entálpica e entrópica e a energia livre, não pôde ser realizada.

3.3.2 Análise por citometria de fluxo da morte celular induzida pelo nanocompósito SWNT/PAMAM

Os gráficos *dot plot*, comumente usados para apresentar dados coletados em experimentos de citometria de fluxo, podem ser conferidos na figura 3.10. O canal FL1 – H, representado no eixo x, refere-se à população de células marcadas com PI, enquanto que o canal FL3 – H, exibido no eixo y, indica a população de células ligadas à anexina V – FITC. Ambos os eixos apresentam escalas logarítmicas. Dessa forma, associa-se uma elevada população de células em cada quadrante a um quadro específico de morte celular.

- 1) Quadrante inferior esquerdo: células livres de apoptose ou necrose.
- 2) Quadrante inferior direito: células predominantemente necróticas.
- 3) Quadrante superior esquerdo: células predominantemente apoptóticas.
- 4) Quadrante superior direito: células apresentando necrose ou apoptose.

Figura 3.10 – Gráficos do tipo *dot plot* obtidos nos experimentos de citometria de fluxo para células F C3H incubadas com (a) nenhum nanomaterial (controle); (b) PAMAM G2; (c) PAMAM G4; (d) PAMAM G6; (e) SWNT; (f) SWNT/PAMAM G2; (g) SWNT/PAMAM G4; (h) SWNT/PAMAM G6.

(a)

(b)

continua

continuação

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

(h)

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises foram realizadas usando-se os histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de células, ou seja, produzindo-se uma informação quantitativa a partir dos gráficos *dot plot* mostrados na figura 3.10. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência das células do controle. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores do percentual de células fluorescentes para cada nanomaterial. A partir dos dados dos histogramas da figura 3.10, foi construída a tabela 3.6, que mostra as populações de células em cada grupo de morte celular.

Tabela 3.6 – Porcentagem de células F C3H em diferentes grupos de morte celular após incubação por 24 horas com nanomateriais isolados ou em forma de nanocompósito com concentração de 50 µg/mL.

	% células viáveis	% células apoptóticas	% células necróticas	% células apoptóticas/necróticas
Controle	99,90	0,00	0,00	0,00
PAMAM G2	51,20	24,20	7,26	17,30
PAMAM G4	48,00	16,10	11,30	24,60
PAMAM G6	45,30	20,90	4,48	29,40
SWNT	55,10	29,40	2,70	12,80
SWNT/PAMAM G2	50,90	27,90	5,13	15,90
SWNT/PAMAM G4	52,70	15,80	10,30	21,10
SWNT/PAMAM G6	51,70	19,90	4,09	24,30

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 3.6 revela que todos os nanomateriais testados induziram a morte de uma porcentagem significativa de células – em torno de 50%. Para as PAMAMs isoladas, nota-se que há uma dependência entre o número de cargas positivas na superfície da molécula e a viabilidade celular: quanto maior a geração, maior a porcentagem de células mortas, embora o dendrímero de menor geração também tenha causado uma redução significativa de viabilidade celular. De maneira geral, os dados mostram que, entre as nanopartículas investigadas, os SWNTs são as que apresentaram menor toxicidade, seguidas dos nanocompósitos; os dendrímeros originaram as menores viabilidades celulares. Outro aspecto importante revelado por este experimento é que a geração da PAMAM não interferiu significativamente na toxicidade provocada pelos nanocompósitos, ao contrário do que foi observado para os

dendrimeros isolados. Uma provável explicação para este fato é a semelhança dos potenciais ζ , dos diâmetros das nanopartículas como um todo e dos diâmetros dos SWNTs nos três nanocompósitos, conforme pode ser conferido nas figuras 3.5 - 3.7. A quinta coluna da tabela 3.6, que se refere à população celular positiva tanto para a anexina V – FITC quanto para o PI, apresenta porcentagens elevadas, similares às registradas na terceira coluna, referente à morte provocada por apoptose; por este motivo, não é possível afirmar qual é o mecanismo de morte celular predominante nestes ensaios, uma vez que não há como distinguir as populações que sofreram apoptose e necrose na quinta coluna.

3.4 Conclusões parciais

Neste capítulo, foram descritas a produção e a caracterização de nanocompósitos baseados em interações não covalentes de SWNT e PAMAM de três gerações, juntamente com a avaliação da toxicidade provocada por estes nanomateriais em células F C3H. Observou-se que alguns parâmetros determinantes das propriedades físico-químicas dos nanocompósitos, como potencial ζ e tamanho, são semelhantes, apesar de os mesmos parâmetros diferirem significativamente para as moléculas de PAMAM isoladas. Os potenciais ζ variaram de 50 a 20 mV, aproximadamente, para uma faixa de pH de 5 a 8,5, indicando uma considerável estabilidade para estas nanopartículas. Em termos de tamanho, os nanocompósitos se mostraram altamente polidispersos, com diâmetros predominantemente entre 50 e 200 nm. Os diâmetros dos SWNTs propriamente ditos, por sua vez, exibiram menor variação, e não apresentaram redução significativa após a interação com os dendrimeros, indicando que a presença da PAMAM não modificou a dispersão dos SWNTs. Ensaio de citometria de fluxo apontaram para uma baixa viabilidade celular – em torno de 50% – das células F C3H após incubação com os três tipos de nanocompósito e os seus constituintes. Estes resultados sugerem que aplicações envolvendo a administração endovenosa deste nanomaterial para entrega controlada de genes e fármacos devem ser desenvolvidas com cautela, já que, ao menos na forma descrita nos itens anteriores, os nanocompósitos apresentam efeitos deletérios ao fígado, um dos órgãos que mais acumula nanopartículas antes da sua eliminação do organismo.

4 ESTUDO DA FORMAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO SWNT/PAMAM G2 E DE SUA INTERAÇÃO COM MODELOS DE MEMBRANA ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

4.1 Introdução

O estudo das interações entre nanopartículas e biomoléculas, crucial para a implementação segura e otimizada de métodos diagnósticos e terapêuticos baseados em nanomateriais, tem se desenvolvido a partir de diferentes abordagens. A mais comum são os ensaios *in vitro*, que permitem o contato de linhagens celulares específicas e nanoestruturas num ambiente controlado. Apesar do elevado número de artigos descrevendo resultados importantes obtidos através desta técnica (93,94,95), ela apresenta desvantagens. A principal é que dois experimentos com objetivos semelhantes englobam muitas variáveis, como linhagem celular e condições de produção do meio de cultura, que acabam dificultando a comparação de resultados de grupos distintos.(96) A extensão dos experimentos *in vitro* a um organismo, representada pelos ensaios *in vivo*, é a forma ideal de avaliar quantitativamente a farmacocinética das nanopartículas – a rota que inclui absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Entretanto, questões éticas relacionadas ao bem estar animal e humano tornaram esta metodologia o último recurso em estudos toxicológicos. Além disso, seu alto custo impede sua aplicação em larga escala.(97)

Uma alternativa e um complemento a estes dois métodos, os cálculos computacionais proporcionam ferramentas poderosas no estudo de nano-bio interfaces. Enquanto as outras abordagens mostram um cenário mais geral, embora microscópico, do ambiente celular na presença de nanomateriais, as simulações computacionais são capazes de desvendar os detalhes moleculares destas interações, por apresentarem resoluções espacial e temporal adequadas para a observação destes fenômenos. Atualmente, esta é a técnica que traz mais informações sobre como projetar nanoestruturas mais seguras e eficientes para aplicações biomédicas. Enquanto os ensaios *in vitro* e *in vivo* apresentam um caráter mais descritivo, os experimentos computacionais aplicados a este campo primam, como nenhuma outra técnica, pela análise fundamental da evolução estrutural e pela descrição da relação estrutura-atividade de biomoléculas em contato com nanopartículas.

As técnicas computacionais mais usadas neste tipo de investigação são de três tipos: os que envolvem a descrição da estrutura eletrônica, os de dinâmica molecular com resolução atomística das moléculas estudadas e os chamados métodos *coarse grained*, ou CG.(98) No primeiro caso, os cálculos têm como objetivo fundamental estimar a energia de um dado sistema a partir de sua densidade eletrônica. Em geral, obtêm-se dados sobre a energia de ligação, a transferência de carga e energias de ativação associadas a um determinado processo químico. Por se tratar de um método quântico, ele é extremamente dispendioso do ponto de vista computacional, e como consequência limita muito o tamanho do sistema a ser estudado e a duração da simulação – centenas de átomos e unidades de picosegundos são valores representativos neste tipo de abordagem. Quando se deseja realizar um estudo mecanístico para investigar a trajetória de um conjunto de estruturas, o método de escolha, em geral, é a dinâmica molecular atomística, também conhecida como AA MD (do inglês *all-atom molecular dynamics*). Esta técnica emprega algoritmos que resolvem numericamente a segunda equação de Newton para determinar a trajetória de partículas ao longo da simulação. As forças interatômicas nestes sistemas são calculadas a partir da definição de um campo de força, que consiste na descrição matemática da energia potencial de uma dada partícula. Com a aplicação deste método ampliam-se enormemente as ordens de grandeza de espaço e tempo envolvidas numa simulação: milhões de átomos e tempos em torno de centenas de nanosegundos são objetivos viáveis, atualmente, através da AA MD. A técnica *coarse grained*, por sua vez, representa uma aproximação da AA MD, pois agrupa alguns átomos pesados (átomos que não os de hidrogênio) em grupos denominados *beads* (contas, em inglês), que se tornam as partículas usadas para descrever as trajetórias no sistema. Esta ferramenta é indicada para observar a dinâmica de sistemas grandes por longos períodos, pois nestas circunstâncias a resolução atomística se torna pouco relevante para uma descrição mais panorâmica do sistema. Há exemplos na literatura de simulações realizadas através de métodos CG que atingem centenas de microsegundos, um intervalo compatível com o de muitos fenômenos celulares e de internalização de nanopartículas por bicamadas lipídicas.(99)

Há dois aspectos cruciais que devem ser considerados quando se deseja descrever corretamente a nano-bio interface. O primeiro é a composição das superfícies envolvidas na interação. Para os componentes biológicos, esta informação é bastante disseminada, tanto para proteínas quanto para ácidos nucleicos e lipídeos. A natureza físico-química das nanopartículas, por sua vez, tem sido extensamente investigada através de diversas técnicas – medidas de potencial ζ , de espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia de absorção no

infravermelho, microscopias eletrônicas, entre muitas outras. Uma vez que estas características são conhecidas, o próximo passo é prever as forças que surgem quando os dois sistemas são colocados em contato: são elas que determinam, em última instância, a conformação final dos constituintes da interface. No caso das biomoléculas, esta mudança conformacional pode causar uma perda funcional – para proteínas e material genético – ou mesmo uma desintegração parcial da membrana celular, que pode culminar com um processo apoptótico ou necrótico.(100)

As forças que emergem do contato dos dois sistemas são variadas e complexas. Fatores que influenciam a dinâmica da interface envolvem tamanho, forma e rugosidade da nanoestrutura, seu caráter hidrofílico ou hidrofóbico, a presença de grupos funcionais e o ambiente físico-químico que circunda a interface. Forças eletrostáticas e eletrodinâmicas, assim como interações hidrodinâmicas, estéricas e de solvatação, exercem papéis importantes na determinação dos estados finais das partes biológica e sintética.(100) As simulações computacionais são o método mais adequado para acompanhar as evoluções temporal e espacial destas interações, propiciando assim conhecimento acerca da toxicidade dos nanomateriais e da concepção de estruturas alternativas, com propriedades e segurança otimizadas.

Apesar de ser uma ferramenta relativamente nova no campo da nanotoxicologia, os estudos *in silico* já compõem uma literatura relativamente abundante, com trabalhos sobre os efeitos de nanopartículas em peptídeos e proteínas, material genético e lipídeos.(98,101) A partir destes estudos, algumas tendências fundamentais acerca do tipo de interação entre determinados grupos de nanopartículas e de biomoléculas estão sendo elucidadas. Por exemplo, há várias evidências de que nanomateriais carbonáceos – fulerenos, nanotubos de carbono e grafenos – estabelecem interações do tipo empilhamento π - π quando a biomolécula em questão contém anéis aromáticos, como ocorre em alguns resíduos de proteínas e nas bases nitrogenadas de DNA e RNA. Já para nanopartículas de ouro funcionalizadas, forças de atração eletrostática parecem ser mais determinantes no processo de ligação à biomolécula.(102) Além destes trabalhos que usam métodos computacionais para desvendar efeitos de nanotoxicidade num nível mais fundamental, há publicações recentes que ilustram como estas técnicas podem auxiliar no desenvolvimento de nanofármacos para o combate de doenças específicas. Kang e colaboradores (103) elucidaram como a nanopartícula metalofulerenol $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ impede o desenvolvimento de adenocarcinoma pancreático

por inibir a atividade da enzima metaloproteinase de matriz 9, que atua diretamente na angiogênese dos vasos sanguíneos ao redor deste tipo de tumor. A dinâmica de interação entre a nanopartícula e a enzima foi detalhadamente estudada, e foi observado que a associação ocorre através de um conjunto de forças eletrostáticas e hidrofóbicas e ligações de hidrogênio na região da volta S1' da enzima, culminando com a supressão do crescimento do tumor.

Os exemplos citados acima referem-se a sistemas contendo proteínas ou material genético. A pesquisa associada ao terceiro grupo de biomoléculas investigadas neste campo, os lipídeos, tem proporcionado informações cruciais para a compreensão de mecanismos de internalização celular de nanomateriais e de nanotoxicidade associada a danos na membrana plasmática, já que este tipo de biomolécula permite a elaboração de modelos de membrana baseados na estrutura da bicamada lipídica. A seguir, encontram-se algumas contribuições que os métodos computacionais proporcionaram recentemente para o entendimento destes processos.

Embora relativamente recentes, os estudos *in silico* com modelos de membrana já esclareceram alguns pontos fundamentais no que diz respeito à influência da geometria da nanopartícula na determinação da sua capacidade de penetrar a bicamada. Yang e Ma (104) testaram diferentes formatos de partículas e concluíram que fatores como a anisotropia e a orientação inicial são decisivos na determinação da trajetória que o nano-objeto descreve na membrana, pois estas propriedades influenciam diretamente a área de contato com os lipídeos e a curvatura no ponto de contato. O volume, por sua vez, não parece ser um fator determinante, segundo os autores. Shi e coautores (99) investigaram como nanoestruturas de alta razão de aspecto são internalizadas pela célula, motivados pelos efeitos deletérios da ingestão incompleta provocada pelo elevado comprimento. Este estudo revelou que a inserção destes nano-objetos ocorre por meio de um processo de competição entre dois eventos: a rotação do nanomaterial para atingir um ângulo de entrada reto em relação à superfície da membrana para minimizar a energia elástica desta e a imersão lateral da nanopartícula na bicamada induzida por receptores. Vácha e colaboradores (105) desenvolveram simulações para testar o impacto de parâmetros como tamanho e formato na endocitose passiva, e concluíram que a eficácia deste processo é fortemente dependente da forma da nanoestrutura: ele acontece adequadamente para nanopartículas esferocilíndricas e cessa para nanomateriais que apresentam arestas em sua superfície.

Experimentos computacionais também podem ajudar a compreender a termodinâmica que rege a evolução destas interfaces. Li e Gu (106) programaram simulações para calcular parâmetros como entalpia, entropia, energia livre e capacidade calorífica decorrentes da penetração de uma partícula hidrofóbica na região também hidrofóbica da membrana. Este trabalho demonstrou que o fenômeno de inserção da nanoestrutura é regulado por um delicado equilíbrio de contribuições entálpicas e entrópicas, e que se trata de um evento espontâneo.

Recentemente, um artigo de Lin e colaboradores (107) demonstrou que os métodos computacionais podem revelar novos mecanismos de internalização de nanopartículas, diferentes das já conhecidas penetração passiva e endocitose. Motivados por evidências experimentais de que algumas nanopartículas positivamente carregadas despolarizam certos tipos de células, os autores reproduziram, em suas simulações, os ambientes intra e extracelular, com duas bicamadas lipídicas, e o gradiente iônico que gera o potencial transmembrana, adicionando uma camada de íons sódio na interface membrana–meio extracelular e duas camadas de íons cloro nas interfaces membrana–citoplasma. Com esta configuração sofisticada, eles demonstraram que, ao se aproximar da superfície da bicamada que continha íons sódio, a nanopartícula catiônica gera um campo elétrico suficientemente intenso para provocar eletroporação, fenômeno que gera poros transientes na membrana pelos quais o nanomaterial em questão adentra a célula. Os autores também especularam que este seja o processo pelo qual nanopartículas catiônicas entram no núcleo celular, uma vez que este apresenta um potencial elétrico mais negativo do que o do citoplasma.

Conforme mencionado no início deste capítulo, os experimentos *in silico* podem desvendar o mecanismo molecular responsável por um efeito observado experimentalmente, que dificilmente pode ser compreendido através de outras técnicas. Tu e colaboradores (108) explicaram a origem da atividade bactericida de folhas de grafeno e de óxido de grafeno em *Escherichia coli* através de simulações computacionais. O estudo mostrou que o contato entre o nanomaterial e a bicamada gera intensas forças de dispersão de London, capazes de fazer um grande número de lipídeos migrarem da membrana para a parede de grafeno, a ponto de reduzir a densidade de lipídeos na bicamada e comprometer sua integridade. Segundo os autores, a estrutura única do material carbonáceo, com átomos de carbono sp^2 numa rede bidimensional, ocasiona forças de dispersão suficientemente intensas para vencer a atração hidrofóbica que os lipídeos experimentam entre si.

Nas seções seguintes, são listados alguns exemplos que tratam especificamente dos nanomateriais abordados neste capítulo, os nanotubos de carbono e os dendrímeros PAMAM.

4.1.1 Estudos computacionais da interação entre nanotubos de carbono e modelos de membrana celular

Apesar da diversidade crescente dos nanomateriais, os nanotubos de carbono ainda estão entre as partículas mais investigadas na nanotoxicologia computacional.(109) Nos últimos anos, alguns trabalhos revelaram detalhes do complexo contato entre estes nano-objetos e as moléculas lipídicas que formam a membrana celular. Wallace e Sansom (110) descreveram a translação de SWNTs em uma membrana de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, do inglês *dipalmitoylphosphatidylcholine*).(111) Estas simulações mostram que, conforme o nanotubo se desloca através da membrana, alguns lipídeos aderem às paredes externa e interna do SWNT; aqueles localizados dentro da nanoestrutura tendem a se espalhar e se estender na extremidade do tubo, bloqueando seu interior. Este mesmo artigo mostrou que a membrana apresenta a capacidade de manter sua integridade estrutural após a passagem do SWNT, promovendo o rearranjo dos lipídeos, até que a conformação original seja restaurada. Já Lelimosin e Sansom (112) relataram que, ao penetrar uma bicamada de DPPC, SWNTs passam a abrigar em seu interior estruturas micelares invertidas, potencialmente capazes de encapsular fármacos.

A inserção de diferentes tipos de nanotubos de carbono – de parede simples, dupla e de parede dupla dopado com nitrogênio – em membranas foi pesquisada por Li e coautores.(113) Estas simulações ajudaram a esclarecer a organização das moléculas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, do inglês *dimiristoylphosphatidylcholine*) quando expostas a estas partículas. De acordo com estes experimentos, os nanotubos de carbono reduzem a entropia da camada lipídica e seu estado de empacotamento depende fortemente do nível de dopagem com nitrogênio. Para testar o desempenho desta membrana modificada quanto à capacidade de transportar pequenas moléculas, duas espécies diminutas e polares – etanol e ureia – foram incluídas nas simulações e colocadas em contato com a bicamada lipídica. Observou-se que, conforme as interações eletrostáticas entre os nanotubos e estas pequenas

moléculas se tornam mais intensas, sua constante de difusão diminui, dificultando a sua entrada na célula.

O mecanismo de internalização de nanotubos de carbono foi estudado por Shi e colaboradores através de simulações CG e métodos teóricos.(114) Este trabalho revelou que o processo de penetração na membrana é dependente do diâmetro do nanotubo: para valores menores, correspondentes a SWNTs, a difusão passiva é mais favorável, enquanto que para diâmetros maiores, típicos de MWNTs, a endocitose é dominante.

4.1.2 Estudos computacionais da interação entre dendrímeros PAMAM e modelos de membrana celular

Mais recentemente, a comunidade da nanotoxicologia computacional voltou sua atenção para os dendrímeros PAMAM, uma classe de nanopartículas com características peculiares – como o caráter não rígido, ao contrário do observado nos nanomateriais metálicos, e a geometria ramificada – que justificam investigações dedicadas sobre sua interação com membranas celulares. Uma das primeiras publicações a abordar o tema (115) descreveu uma série de simulações CG, e foi seguida por um trabalho que incorporou as modificações recém-feitas no campo de força Martini ao modelo do dendrímero.(116) Nestes dois estudos, que usaram bicamadas de DPPC e DMPC, respectivamente, os autores testaram os efeitos de diferentes graus de acetilação na capacidade das PAMAMs G3, G5 e G7 de se ligar às membranas. Eles observaram que a presença dos grupos acetila torna o polímero menos propenso a se associar com os lipídeos, enquanto que as nanopartículas contendo aminas protonadas na sua superfície provocam a formação de poros na bicamada, induzem sua curvatura e sofrem internalização muito mais frequentemente do que os dendrímeros com superfície eletricamente neutra. Este resultado apontou que a atração eletrostática é um dos principais fatores nas etapas iniciais de ligação deste nanomaterial à membrana celular. O segundo artigo trata especificamente das consequências da presença de múltiplas cópias de PAMAMs G5 e G7, revelando um efeito cooperativo no mecanismo de penetração do dendrímero que não é observado em sistemas com uma única molécula.

Outro conjunto de estudos seminais sobre a internalização de PAMAMs por membranas biológicas foi desenvolvido por Kelly e colaboradores (117,118), através de

simulações atomísticas. No primeiro trabalho, novamente foram testados diferentes grupos químicos na superfície do dendrímero – aminas protonadas, acetamidas, que são eletricamente neutras, e carboxilas não protonadas –, e cálculos de potencial de força média reforçaram a idéia de que a interação com lipídeos zwitteriônicos é mais favorável quando há cargas na superfície do dendrímero. Já no artigo subsequente os autores reproduziram bicamadas de DMPC nas fases gel e fluida e descreveram as mudanças conformacionais na PAMAM após o contato com a superfície da membrana. Observou-se que o dendrímero sofre um aumento significativo na asfericidade e no raio de giração – eventos que correspondem a um achatamento da molécula – apenas quando interage com a fase fluida, mantendo sua conformação intacta nas proximidades da fase gel. Outro tópico importante desenvolvido neste trabalho foi a medição da entalpia liberada por partes específicas da PAMAM após o contato com a membrana de DMPC. Os resultados mostram que, embora a atração eletrostática entre as aminas protonadas e os grupos fosfato da membrana seja importante para aproximar a nanopartícula da superfície da bicamada, é a interação hidrofóbica entre as camadas internas da PAMAM e as caudas dos lipídeos que de fato mantêm o dendrímero ligado à membrana.

A literatura mais recente desta área tem revelado esforços para incrementar os modelos de membrana, como nos casos que exploram dois tipos de lipídeos em uma distribuição simétrica (87,119,120) ou três lipídeos num arranjo assimétrico (87,121), numa tentativa de obter uma representação mais realista da membrana celular. Tian e colaboradores (119) testaram a influência de três níveis de protonação da PAMAM – pHs 4, 7 e 10 – na capacidade de interação com uma bicamada formada por DPPC e o lipídeo negativo dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG, do inglês *dipalmitoylphosphatidylglycerol*), na proporção respectiva de três para um. Para a geração 3 da PAMAM, nota-se uma mudança conformacional significativa do dendrímero ao interagir com a membrana, mas não há penetração propriamente dita da nanopartícula nos três estados de protonação testados. O comportamento da molécula é drasticamente diferente para a geração 4: para cada pH observa-se uma resposta distinta. Em pH básico, a PAMAM se liga à bicamada mas não sofre modificação significativa de sua forma; em pH neutro, há um achatamento semelhante ao descrito no parágrafo anterior, com a molécula assumindo um formato discóide; e apenas em pH ácido a PAMAM penetra a região hidrofóbica e atinge os grupos fosfato da folha inferior da bicamada. Potenciais de força média mostram que, apesar de a internalização da PAMAM G4 neste tipo de membrana não ser espontânea, ela pode ocorrer mediante a aplicação de

forças de pequena magnitude, como as que podem ser obtidas através de equipamentos de ultrassom – de acordo com os resultados, 70 k_BT de energia seriam suficientes para provocar a entrada de uma molécula de PAMAM G4 não protonada numa membrana com esta composição lipídica.

As gerações mais elevadas de PAMAM (G7 a G9) foram o alvo da investigação conduzida por Xie e coautores.(120) Dois modelos de membrana foram testados: um contendo apenas dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG, do inglês *dimiristoylphosphatidylglycerol*) e outro com uma mistura de DMPC e DMPG na razão correspondente de sete para três. Estes experimentos revelam que estes polímeros de geração maior se comportam como uma nanopartícula rígida e não sofrem alterações conformacionais ao tocarem a superfície da bicamada. Os dendrímeros são internalizados através de um mecanismo de *wrapping*, em que os lipídeos formam um invólucro ao redor do nanomaterial, como ocorre nos estágios iniciais da endocitose. Ao término do processo, ocorre a formação de um microdomínio de DMPG, numa demonstração de como as nanopartículas podem alterar localmente a densidade lipídica da bicamada.

Até o momento, apenas dois artigos descreveram modelos de membrana que reproduzem a assimetria lipídica observada em células de mamíferos. No primeiro destes trabalhos (87), os autores abordaram a liberação da PAMAM dos endossomos, organelas responsáveis pelo transporte de objetos capturados pela célula através de endocitose. Para mimetizar este tipo específico de membrana, os autores usaram três modelos de bicamada, com complexidade crescente, e dois estados de estiramento, para contemplar a elevada pressão osmótica que os endossomos experimentam quando contêm PAMAMs protonadas. Uma das descobertas importantes deste estudo foi a constatação de que a assimetria da composição lipídica facilita a penetração da PAMAM G4, com acentuada curvatura da membrana e migração de lipídeos de uma folha da bicamada para a outra – fenômeno conhecido como *flip-flop*, que reduz a assimetria neste tipo de modelo. Este evento é importante na determinação do comportamento da célula, uma vez que mudanças na assimetria da membrana são um dos fatores que desencadeiam processos de endo/exocitose e de morte celular. Em relação aos diferentes graus de estiramento da bicamada, os autores testaram quatro valores de tensão e observaram que quanto maior este valor, maior é o poro provocado pela ligação do dendrímero. Quando o estiramento da membrana do endossomo atinge um valor extremo, este poro desencadeia uma ruptura que leva à liberação da nanopartícula do endossomo. No segundo artigo (121), são descritas simulações envolvendo

as PAMAMs G4 e G5 com um modelo de membrana cuja finalidade era reproduzir algumas características de eritrócitos humanos. A folha inferior da bicamada, que fica em contato com o citoplasma, apresentava inicialmente 20% de lipídeos aniônicos, e este percentual foi aumentado para 50% e 100% para avaliar o efeito da presença de lipídeos negativamente carregados no processo de internalização do dendrímero. Comparando-se os três conjuntos de experimentos, nota-se que uma maior assimetria provoca uma absorção mais intensa da PAMAM na bicamada e facilita a translação deste nanomaterial em direção ao meio intracelular.

As simulações computacionais também foram usadas para entender o mecanismo de internalização celular, como ocorreu com os nanotubos de carbono. Guo e colaboradores (122) construíram um panorama abrangente da penetração da PAMAM em membranas investigando diversas gerações e tensões superficiais da bicamada e chegaram à conclusão de que há três mecanismos principais de entrada desta nanopartícula em células: penetração passiva, endocitose e um processo cooperativo que mescla difusão e *wrapping*. Os experimentos mostram que a endocitose é restrita a sistemas envolvendo gerações elevadas de PAMAM (6 a 8) e valores negativos de tensão superficial, enquanto que o fenômeno misto é uma transição para a difusão passiva, predominante para gerações menores, porém possível para gerações elevadas e presente em todo o intervalo de tensões superficiais investigado.

4.2 Informações sobre as simulações

Todas as simulações descritas neste capítulo foram feitas com o programa Gromacs 4.5.5 (123), usando-se o ensemble NpT, e visualizadas através do programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*). (124) As análises foram executadas usando-se ferramentas do Gromacs e *scripts* anteriormente desenvolvidos no SBCB ou escritos para este trabalho.

4.2.1 Modelos computacionais

Todas as simulações descritas neste estudo são do tipo *coarse grained*, e o campo de força Martini foi escolhido para modelar todos os sistemas.(125,126) Este campo de força foi parametrizado, originalmente, para reproduzir as energias livres de sistemas bifásicos contendo um solvente polar e outro apolar, e era restrito à aplicação em lipídeos. Com o passar do tempo, introduziram-se novas parametrizações para proteínas, carboidratos, polímeros, DNA, pigmentos e nanopartículas.(127) Em linhas gerais, o Martini propõe um mapeamento de quatro para um para a maioria dos sistemas, ou seja, quatro átomos de uma representação atomística são substituídos por uma única partícula (*bead*) na aproximação *coarse grained*. Atualmente, o modelo apresenta 18 tipos principais de partícula, agrupados em quatro grupos fundamentais: apolares (C), polares (P), não polares (N) e eletricamente carregadas (Q). As não polares e carregadas são divididas em quatro categorias que contemplam a capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio (0 = não realiza este tipo de ligação; a = acceptor; d = doador; da = doador e acceptor), enquanto que as apolares e polares são classificadas em cinco tipos de acordo com o grau de polaridade (1 = pouco polar; 5 = muito polar). A redução drástica no número de partículas do sistema, assim como a adoção de valores de corte para interações de longo alcance – 1,2 nm para os potenciais eletrostático e de Lennard-Jones – fazem com que este campo de força seja muito eficiente computacionalmente.

Para a elaboração do modelo CG dos nanotubos de carbono, utilizou-se uma estrutura inicial atomística fornecida pelo programa VMD.(124) O nanotubo obtido foi (18, 0), do tipo *zigzag*, com diâmetro de 1,4 nm, e através de translações da estrutura inicial produziu-se uma nanopartícula com comprimento de 10 nm. Usando-se um mapeamento de quatro para um que preserva a rede hexagonal característica dos nanomateriais carbonáceos, criou-se um modelo com 432 partículas. Para reproduzir as propriedades físico-químicas do nanotubo mais acuradamente, optou-se por atribuir às suas partículas o tipo CNP, proposto por Monticelli (128) e recentemente incorporado ao conjunto de partículas fundamentais do Martini.

Como foi explicado no capítulo anterior, a síntese do nanocompósito quase sempre envolve o uso de nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxila. Para introduzir este aspecto nos nanotubos simulados, substituíram-se duas ou quatro partículas CNP nas extremidades do nanomaterial por partículas Q_a , com carga elétrica -1, o que conferiu aos

nanotubos correspondentes graus de funcionalização de aproximadamente 1% e 2%, similares aos descritos na literatura experimental.(129) O posicionamento destas partículas negativas não foi aleatório: elas foram dispostas o mais distante possível umas das outras para evitar a repulsão eletrostática. Como todas as simulações foram desenvolvidas para representar as moléculas em pH neutro, semelhante ao fisiológico, todos os grupos carboxílicos deveriam estar na sua forma não protonada.

Embora o estudo de nanotubos de carbono isolados proporcione um entendimento importante sobre a internalização deste tipo de nanopartícula e de nano-objetos unidimensionais em geral, sabe-se que os SWNTs tendem a agregar e formar feixes contendo sete tubos organizados em um arranjo hexagonal. Para tornar as simulações mais realistas, estes feixes também foram modelados, incluindo os três graus de funcionalização com carboxilas – 0%, 1% e 2%. Inicialmente, obteve-se uma estrutura para o feixe puro, sem grupos carboxílicos, trasladando-se sete nanotubos de forma a reproduzir a distância intertubos de 0,34 nm.(130,131) A escolha das partículas que deveriam assumir carga negativa foi pautada novamente pela tentativa de minimizar a repulsão eletrostática, embora para alguns pares de partículas Q_a a distância tenha sido menor do que o valor de corte para interações eletrostáticas estipulado pelo Martini. Os três feixes apresentam diâmetros de aproximadamente 5 nm. Estas três estruturas iniciais foram submetidas a um processo de solvatação. Com isso, totalizaram-se seis tipos de nanotubos de carbono descritos neste estudo: os isolados e os em forma de feixe, com porcentagens de carboxila de 0%, 1% e 2%. A figura 4.1 exibe estas estruturas.

Figura 4.1 – Representação das estruturas dos nanotubos de carbono estudados nas simulações computacionais. Partículas CNP são mostradas em cinza e partículas Q_a são destacadas em vermelho. São exibidos os nanotubos isolados (a-f) e na forma de feixes (g-l), com graus de funcionalização com carboxilas de 0% (a, b, g, h), 1% (c, d, i, j) e 2% (e, f, k, l). Na coluna à esquerda, estão reunidas as vistas laterais das nanopartículas, enquanto que na coluna à direita são exibidas as vistas frontais.

continua

continuação

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

(h)

(i)

(j)

(k)

(l)

Fonte: Elaborada pela autora.

Estas estruturas foram submetidas a quatro etapas curtas de equilíbrio e uma de produção, após o processo de minimização de energia. Os intervalos de tempo de cada etapa e suas durações totais foram, respectivamente, 0,0001 ps, 0,001 ps, 0,005 ps, 0,01 ps, 0,01 ps e 1 ps, 10 ps, 50 ps, 100 ps e 200 ns. Nestes experimentos, assim como em todos os outros relatados neste capítulo, empregaram-se termostatos e barostatos de Berendsen.⁽¹³²⁾ O

acoplamento de temperatura foi realizado com uma temperatura de referência de 300 K e uma constante de tempo de 0,3 ps para as três primeiras etapas e 0,55 ps para as duas últimas. O acoplamento de pressão, por sua vez, foi efetuado isotropicamente com uma pressão de referência de 1 bar, uma constante de tempo de 3 ps e uma compressibilidade de $3 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.

Para o dendrímero PAMAM G2, obteve-se uma estrutura inicial atomística através do programa DBT (*Dendrimer Building Toolkit*).⁽¹³³⁾ Os átomos de nitrogênio desta molécula foram então substituídos por partículas CG, seguindo-se o mapeamento proposto por Lee e Larson.^(115,116) A figura 4.2 descreve em detalhes o mapeamento feito pelos autores e as estruturas atomística e CG da PAMAM G2. Resumidamente, pode-se dizer que nesta aproximação a topologia da molécula consiste numa alternância de partículas N_0 e N_{da} , com 16 partículas Q_d na superfície representando as aminas primárias protonadas, já que o modelo se refere ao estado do dendrímero em pH neutro. As distâncias e ângulos de equilíbrio foram escolhidos como 0,5 nm e 120° e 180° . Algumas características primordiais do modelo Martini foram modificadas pelos autores para aumentar a acurácia da representação CG da PAMAM: as partículas apresentam massas mais realistas – 56,1 Da para N_0 , 72 Da para N_{da} e 29 Da para Q_d , em oposição ao valor de 72 Da para todos os tipos de partícula – e a constante de força do potencial angular foi aumentada de 25 para $150 \text{ kJmol}^{-1}\text{rad}^{-2}$.

Figura 4.2 – (a): Mapeamento para conversão do modelo atômico da PAMAM G2 em um modelo CG. (b): Estrutura atômica da PAMAM G2 gerada pelo programa DBT. Átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio são representados em ciano, azul, vermelho e branco, respectivamente. (c) e (d): Estrutura CG da PAMAM G2, vista de diferentes ângulos, com partículas N_0 , N_{da} e Q_d mostradas em magenta, laranja e verde, respectivamente. (e) e (f): Estrutura CG da PAMAM G2 com as partículas removidas, com exceção do núcleo, para facilitar a visualização das cadeias ramificadas do dendrímero. Em c-f, as duas partículas no núcleo, que são do tipo N_0 , estão destacadas em azul para auxiliar a identificação do centro da molécula.

(a)

(b)

continua

continuação

(c)

(d)

(e)

(f)

Fonte: (a) Adaptado de HASHIMOTO (134) . (b-f) Elaborada pela autora.

A estrutura CG do dendrímero foi submetida a um processo de solvatação idêntico ao que foi aplicado aos nanotubos de carbono, com uma etapa longa de produção de 200 ns. Os resultados destas simulações foram comparados com dados experimentais e simulações atomísticas para avaliar a qualidade do modelo CG.

4.2.2 Simulações da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2

Nos experimentos para o estudo da formação do nanocompósito, os nanotubos de carbono foram posicionados no centro da caixa de simulação, com restrições de posição, de modo a evitar a difusão da nanopartícula no solvente. Moléculas de PAMAM G2, por sua vez, foram distribuídas em posições randômicas determinadas pelo programa Gromacs. Foram testadas três concentrações de PAMAM G2: uma, cinco e dez moléculas, em caixas com as dimensões 15 nm × 15 nm × 15 nm, exceto para os sistemas com dez dendrímeros, cujas caixas tinham 23 nm × 23 nm × 23 nm. Fizeram-se combinações dos seis tipos de nanotubos de carbono e das três concentrações de PAMAM G2, obtendo-se 18 sistemas a serem estudados. Para obter um quadro mais estatístico da evolução das estruturas nos experimentos, foram feitas três réplicas de cada um destes sistemas, a menos da posição inicial das moléculas de dendrímero, definida aleatoriamente pelo programa. Dessa forma, totalizaram-se 54 simulações a serem analisadas.

Como no caso das nanopartículas isoladas, nestas simulações adotou-se o mesmo procedimento de equilibração e produção em cinco etapas. Os intervalos de tempo e as durações totais de cada etapa foram, respectivamente, 0,0001 ps, 0,001 ps, 0,005 ps, 0,01 ps, 0,02 ps e 1 ps, 10 ps, 50 ps, 100 ps e 1 μ s. Para o acoplamento de temperatura, usaram-se uma temperatura de referência de 300 K e uma constante de tempo de 1 ps, enquanto que para o acoplamento isotrópico de pressão, empregaram-se pressão de referência de 1 bar, constante de tempo de 10 ps e uma compressibilidade de $3 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.

4.2.3 Simulações da interação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 com modelos de membrana

Para esta etapa da investigação, foi necessário escolher uma dentre as 18 estruturas de nanocompósitos estudadas e definir modelos de membrana. Optou-se por uma das repetições com nanotubos na forma de feixe, com 2% de carboxilas e cinco exemplares de PAMAM G2. Esta escolha foi guiada pelo fato de este sistema ser um dos mais realistas, tanto em termos de agregação dos SWNTs quanto de porcentagem de funcionalização. Duas bicamadas lipídicas,

cada uma com 1500 moléculas, foram construídas e equilibradas para estas simulações: uma com palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC, do inglês *palmitoyloleoylphosphatidylcholine*) e uma com uma mistura de POPC e palmitoiloleoilfosfatidilserina (POPS, do inglês *palmitoyloleoylphosphatidylserine*), na razão de três para um. O primeiro modelo de membrana consiste em uma bicamada lipídica obtida com uma espécie zwitteriônica, enquanto que o segundo inclui um lipídeo negativamente carregado, para reproduzir qualitativamente a carga da superfície celular.

Novamente, foram simuladas réplicas dos sistemas estudados, com diferentes orientações relativas do nanocompósito em relação à bicamada: em duas simulações, o eixo dos nanotubos foi posicionado paralelamente à membrana, enquanto que em outros dois experimentos o nanocompósito formava um ângulo reto com a superfície da bicamada. Em todos os casos, a distância entre os centros de massa dos dois objetos foi escolhida de modo a garantir que a distância mínima entre eles no início da fase de produção fosse em torno de 4 nm, maior do que os valores de corte para interações de longo alcance do modelo Martini. Dessa forma, assegurou-se que não haveria interações enviesadas nas simulações. A dimensão lateral destas caixas de simulação era 23 nm × 23 nm. Os *scripts* usados para gerar a bicamada com dois tipos de lipídeos e para montar os sistemas contendo o nanomaterial e a membrana foram desenvolvidos no SBCB por Dra. Heidi Koldsoe e Dr. Antreas Kalli, respectivamente.

Primeiramente, os oito sistemas foram submetidos a uma equilibrção curta, com intervalo de tempo de 0,02 ps e duração de 1 ns; na fase de produção, o intervalo de tempo foi novamente de 0,02 ps e a duração total foi de 2 μ s. Para o acoplamento de temperatura, usaram-se uma temperatura de referência de 323 K e uma constante de tempo de 1 ps no termostato de Berendsen. O acoplamento de pressão foi semi-isotrópico, por conta da presença da bicamada lipídica, e os parâmetros relevantes foram: pressão de referência de 1 bar, constante de tempo de 1 ps e compressibilidade de $5 \cdot 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$.

4.3 Resultados e discussões

4.3.1 Aplicação do modelo Martini aos feixes de nanotubos de carbono

Após a etapa de produção de 200 ns, não foi observada nenhuma mudança estrutural considerável nos três feixes de nanotubos com diferentes graus de funcionalização. A forma do feixe foi mantida, inclusive o diâmetro inicial de 5 nm. A única alteração em relação às estruturas iniciais foi um deslocamento de alguns nanotubos na direção do eixo do feixe, como pode ser conferido na figura 4.3. Como esta variação de posição foi muito pequena – correspondente a três anéis de partículas, no máximo –, ela não modificou significativamente a geometria das nanopartículas. Além disso, deve-se ressaltar que a repulsão eletrostática entre partículas negativas não foi suficiente para comprometer a integridade dos feixes. Este resultado revela que as novas partículas CNP do modelo Martini são capazes de reproduzir a interação de van der Waals que mantém os nanotubos de carbono unidos em feixes, a despeito da força coulombiana repulsiva entre as partículas que representam as carboxilas. A estabilidade destes feixes é uma validação notável para as partículas CNP, cuja implementação foi proposta com base em resultados experimentais referentes a fulerenos, apenas.(128)

Figura 4.3 – Ampliação da área próxima à extremidade dos feixes de nanotubos contendo (a) 0%, (b) 1% e (c) 2% de grupos carboxila para visualização do deslocamento de alguns nanotubos na direção do eixo do feixe.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Aplicação do modelo Martini à PAMAM G2

Para avaliar a qualidade do modelo da PAMAM G2 representada com o campo de força Martini, calcularam-se alguns parâmetros associados a características geométricas médias do dendrímero na etapa de produção de 200 ns da solvatação. Embora não haja muitos dados experimentais deste tipo disponíveis para esta geração do polímero, foi possível comparar os resultados das simulações CG com alguns cálculos atomísticos e dados experimentais. Esta comparação está reunida na tabela 4.1. A grandeza asfericidade A é definida como

$$A = 1 - 3 \frac{\langle I_2 \rangle}{\langle I_1^2 \rangle} \quad (1)$$

em que $I_I = I_x + I_y + I_z$ e $I_2 = I_x I_y + I_y I_z + I_x I_z$, sendo I o momento de inércia do dendrímero.(117) A asfericidade é um indicador do quanto o formato de uma molécula difere de uma esfera: quanto maior é o valor, mais esférico é o objeto em questão. Para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico, usou-se a expressão para o raio da PAMAM $R = 1,3R_g$, comumente aplicada a dendrímeros.(135) Nela, R_g representa o raio de giração.

Tabela 4.1 – Parâmetros calculados para caracterizar a PAMAM G2 do modelo Martini e grandezas correspondentes obtidas através de outros métodos. EDL: espalhamento dinâmico de luz; SAXS: espalhamento de raios X a baixo ângulo (do inglês *small angle x-ray scattering*); CVFF: campo de força de valência consistente (do inglês *consistent valence force field*).

	Resultados do modelo Martini	Simulações atomísticas (campo de força)	Dados experimentais (técnica)
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	4,2	2,6 (AMBER) (135)	3 (EDL) (135)
Raio de giração (nm)	1,6	0,8 (GROMMOS) (136) 1,36 (Dreiding) (137) 1,65 (CVFF) (138)	1,18 (SAXS) (139)
Superfície acessível ao solvente (nm²)	50	25 (GROMMOS) (136)	
Asfericidade	0,03	0,013 (GROMMOS) (136)	

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que, de forma geral, há uma concordância qualitativa entre os resultados das simulações e os dados encontrados na literatura. Pode-se dizer que, em relação aos parâmetros observados, o modelo representa adequadamente a PAMAM G2, já que campos de força *coarse grained* não proporcionam a mesma acurácia de modelos atomísticos ou medidas experimentais. É importante ressaltar que pode haver uma variação significativa de resultados mesmo entre simulações atomísticas, como ocorre para o raio de giração, e que medidas de tamanho de nanopartículas com diâmetro reduzido em geral apresentam incerteza elevada. Assim, os valores exibidos nas duas colunas à direita da tabela acima devem apenas nortear a comparação, e não ser usados como referências a ser reproduzidas com exatidão.

Apesar da simplificação espacial que o Martini implica, por agrupar em torno de quatro átomos numa nova unidade estrutural, há uma semelhança significativa entre as geometrias das moléculas representadas nas figuras 4.2 (b) e 4.2 (c) – 4.2 (f). O dendrímero gerado pelo programa DBT tem formato de X, com grandes lacunas entre os quatro dêndrons, e esta característica é reproduzida quando se aplica o modelo Martini.

4.3.3 Simulações da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2

O uso da dinâmica molecular no estudo da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 pode ser útil para revelar alguns aspectos que não podem ser investigados através de técnicas experimentais. Em particular, este método computacional pode mostrar detalhes sobre a morfologia e a conformação do material resultante, a estequiometria, as características termodinâmicas e o mecanismo molecular que faz os dois constituintes se unirem e gerarem um nanocompósito estável.

A figura 4.4 exibe alguns exemplos dos sistemas simulados depois de 1 μ s de produção.

Figura 4.4 – Visão lateral (em cima) e frontal (embaixo) de alguns tipos de nanocompósito SWNT/PAMAM G2 depois da etapa de equilíbrio. Estes sistemas são: SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 (esquerda), SWNT isolado com 1% de COOH e 5 PAMAMs G2 (centro) e feixe de SWNT 0% COOH e uma PAMAM G2 (direita). Os grupos superficiais da PAMAM G2 são destacados em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura acima mostra apenas três sistemas dos 54 simulados, mas eles ilustram as principais características morfológicas observadas em todos os experimentos nos quais a PAMAM G2 se ligou aos SWNTs. A tendência mais marcante que se destaca através da visualização das trajetórias é a considerável mudança conformacional pela qual o dendrímero passa ao atingir as proximidades dos nanotubos de carbono e se ligar a eles. Este processo consiste no envolvimento da PAMAM em torno do SWNT e será denominado *wrapping* neste

texto. Outra propriedade importante da PAMAM G2 nestas simulações é que, depois do contato com os nanotubos, os grupos positivamente carregados na superfície da molécula apontam em direção ao solvente, ao invés de interagir com as paredes ou extremidades do nanomaterial carbonáceo. Há apenas uma publicação descrevendo a automontagem deste tipo de nanocompósito com ferramentas computacionais usando simulações atomísticas, e estruturas similares são relatadas, embora o estudo refira-se somente a nanotubos isolados e sem funcionalização com grupos carboxila.(140)

Este comportamento sistemático da PAMAM G2 proporciona uma informação importante sobre a interação dos componentes do nanocompósito e a sua estabilidade: as paredes apolares dos SWNTs parecem estabelecer interações com as regiões internas da PAMAM e, dada a natureza físico-química desta parte da molécula (partículas N_0 e N_{da} , ambas não polares), pode-se inferir que a interação predominante é provocada pela atração entre partículas apolares dos nanotubos e não polares do dendrímero. Esta descoberta altera a idéia corrente que explica a formação do nanocompósito pela atração eletrostática entre as aminas protonadas da PAMAM e as carboxilas dos SWNTs. Uma análise mais aprofundada, descrita nos parágrafos seguintes, desenvolve este tópico mais detalhadamente.

A visualização das trajetórias com o programa VMD revelou um mecanismo regular de ligação da PAMAM G2 aos nanotubos. Neste padrão, foram observadas três componentes: o *wrapping* da PAMAM G2 em torno dos SWNTs conforme as estruturas se aproximam, e a translação e a rotação do dendrímero ao longo ou em torno do eixo principal dos nanotubos logo após a ligação. Os dois últimos eventos podem ocorrer simultaneamente e em geral sucedem o processo de *wrapping*. Para monitorar a evolução destas três componentes, foi necessário associar cada uma delas a uma métrica específica; sendo assim, os parâmetros apropriados para descrever as três contribuições são as distâncias perpendiculares, a componente da distância no eixo z (também chamada de distância paralela) e a componente da distância no eixo x que separam os centros de massa da PAMAM G2 e do SWNT (ver figuras 4.5 – 4.10 para explicação sobre a orientação relativa dos eixos cartesianos e os nanotubos). Como o número de sistemas estudado é grande, selecionaram-se dois exemplos representativos, usando nanotubos isolados e em forma de feixe, para ilustrar este mecanismo de ligação. O código de cores é o mesmo usado na figura 4.4.

Figura 4.5 – Distância perpendicular entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.6 – Distância paralela entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.7 – Componente x da distância entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT isolado com 1% de COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.8 – Distância perpendicular entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.9 – Distância paralela entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.10 – Componente x da distância entre centros de massa em função do tempo para um sistema contendo SWNT em forma de feixe com 1% COOH e uma PAMAM G2 com quadros referentes a momentos significativos da trajetória. A orientação do SWNT no eixo cartesiano de coordenadas é mostrada no detalhe à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando-se a evolução do movimento relativo do dendrímero e do nanotubo nas figuras 4.5 a 4.10, é possível identificar as três componentes do mecanismo de ligação citados anteriormente. A translação e a rotação para o nanotubo isolado, exibidas nas figuras 4.6 e 4.7, apresentam amplitudes muito maiores do que as registradas para o feixe, ilustradas nas figuras 4.9 e 4.10, e este comportamento foi generalizado em todo o conjunto de simulações. Uma hipótese para explicar esta diferença é o fato de a área de contato disponível para interação com o dendrímero ser significativamente maior no feixe do que no nanotubo isolado, o que faz com que a PAMAM G2 estabeleça um número de contatos ótimo com a nanopartícula carbonácea muito mais rapidamente no caso dos feixes.

Outro fenômeno importante revelado por estes resultados é a natureza unidirecional da translação executada pela PAMAM G2: em todos os exemplos envolvendo dendrímeros

ligados ao SWNT nas 54 simulações, o movimento da PAMAM G2 é sempre em direção ao centro do nanotubo, ou seja, a sua região mais hidrofóbica. A trajetória na direção contrária nunca foi observada, uma evidência de que a atração entre partículas apolares dos SWNTs e não polares da PAMAM G2 pode ser o principal fator que mantém a estrutura do nanocompósito. Forças coulombianas entre as aminas e as carboxilas parecem ser cruciais nos primeiros estágios da interação – a aproximação dos nanomateriais e a formação dos primeiros contatos –, mas a tendência notável que a PAMAM G2 apresenta de “tatear” em busca de regiões apolares mostra que estas forças podem não deter com exclusividade a função de manter a estrutura do nanocompósito.

Ainda não é clara a causa deste mecanismo de ligação com três componentes, mas uma comparação dos gráficos de distância com os de número de contatos entre a PAMAM G2 e o SWNT em função do tempo sugere que, uma vez que a ligação ocorre, ou seja, que o número de contatos cresce abruptamente, a PAMAM G2 testa diferentes conformações e posições ao longo do nanotubo numa tentativa de encontrar aquela que maximize este número de contatos. O valor estacionário é em torno de 150 para os nanotubos isolados e 200 para os feixes – por definição, um contato é estabelecido quando a distância entre duas partículas é menor do que 0,6 nm. A descrição detalhada do movimento que a PAMAM G2 executa na superfície dos nanotubos de carbono pode ser útil no desenvolvimento de motores moleculares artificiais.

Nem todas as moléculas de PAMAM G2 que não se ligaram aos nanotubos de carbono permaneceram isoladas no solvente aquoso. Algumas delas formaram dímeros e trímeros, que podem ser vistos na figura 4.11. Tian e coautores (141) publicaram uma descrição detalhada da formação de dímeros de PAMAM G4 com topologias baseadas no modelo Martini; neste trabalho, os autores desenvolveram cálculos de potencial de força média de dois dendrímeros interagindo entre si testando os três estados de protonação e concluíram que ocorre um emaranhamento espontâneo das ramificações do dendrímero para um intervalo considerável de distância entre centros de massa. As estruturas mostradas neste artigo são semelhantes às da figura 4.11: os núcleos das moléculas estão próximos e há um nível elevado de interpenetração entre os dendrímeros. A presença destes agregados nas simulações corrobora a validade do modelo Martini para esta geração específica de PAMAMs.

Figura 4.11 – Imagens de um dímero (esquerda) e um trímero (direita) de PAMAM G2 em solução aquosa depois de 1 μ s de produção. Moléculas distintas são mostradas em verde claro, roxo e laranja. As duas partículas que constituem o núcleo do dendrímero são destacadas com esferas azuis para facilitar a identificação de cada unidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

As simulações de automontagem também foram usadas para determinar a estequiometria dos nanocompósitos. O último quadro de cada trajetória de 1 μ s foi analisado e o número de dendrímeros ligados ao nanotubo foi registrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Estequiometria dos nanocompósitos após 1 μ s de produção. As células exibem o número de moléculas de PAMAM G2 ligadas aos nanotubos de carbono versus o número de moléculas não ligadas.

	Simulação 1	Simulação 2	Simulação 3
Individual 0% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Individual 0% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0
Individual 0% COOH, 10 PAMAM	6 $\times$ 4	3 $\times$ 7	3 $\times$ 7
Individual 1% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Individual 1% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0
Individual 1% COOH, 10 PAMAM	5 $\times$ 5	6 $\times$ 4	4 $\times$ 6
Individual 2% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Individual 2% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	3 $\times$ 2	5 $\times$ 0
Individual 2% COOH, 10 PAMAM	6 $\times$ 4	7 $\times$ 3	4 $\times$ 6
Feixe 0% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Feixe 0% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0
Feixe 0% COOH, 10 PAMAM	3 $\times$ 7	7 $\times$ 3	7 $\times$ 3
Feixe 1% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Feixe 1% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0	3 $\times$ 2
Feixe 1% COOH, 10 PAMAM	5 $\times$ 5	6 $\times$ 4	8 $\times$ 2
Feixe 2% COOH, 1 PAMAM	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0	1 $\times$ 0
Feixe 2% COOH, 5 PAMAM	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0	5 $\times$ 0
Feixe 2% COOH, 10 PAMAM	10 $\times$ 0	7 $\times$ 3	9 $\times$ 1

Fonte: Elaborada pela autora.

Estes resultados podem ser influenciados, em sistemas não equilibrados, pelo limite imposto ao tempo total de simulação. Para determinar se alguns sistemas deveriam ter suas simulações estendidas, foram observadas as curvas de energia potencial em função do tempo para cada um dos 54 exemplares. Os sistemas cuja curva não apresentava um *plateau* tiveram

seus cálculos estendidos até 2 μ s e as novas estequiometrias, destacadas em cinza, foram registradas na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Estequiometria dos nanocompósitos após 2 μ s de produção, para sistemas não equilibrados, destacados em verde. As células exibem o número de moléculas de PAMAM G2 ligadas aos nanotubos de carbono versus o número de moléculas não ligadas.

	Simulação 1	Simulação 2	Simulação 3
Individual 0% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Individual 0% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	5 × 0	5 × 0
Individual 0% COOH, 10 PAMAM	6 × 4	3 × 7	3 × 7
Individual 1% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Individual 1% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	5 × 0	5 × 0
Individual 1% COOH, 10 PAMAM	5 × 5	7 × 3	7 × 3
Individual 2% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Individual 2% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	3 × 2	5 × 0
Individual 2% COOH, 10 PAMAM	6 × 4	7 × 3	7 × 3
Feixe 0% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Feixe 0% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	5 × 0	5 × 0
Feixe 0% COOH, 10 PAMAM	3 × 7	7 × 3	7 × 3
Feixe 1% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Feixe 1% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	5 × 0	3 × 2
Feixe 1% COOH, 10 PAMAM	5 × 5	6 × 4	8 × 2
Feixe 2% COOH, 1 PAMAM	1 × 0	1 × 0	1 × 0
Feixe 2% COOH, 5 PAMAM	5 × 0	5 × 0	5 × 0
Feixe 2% COOH, 10 PAMAM	10 × 0	10 × 0	10 × 0

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados nas tabelas 4.2 e 4.3 revelam que para praticamente todos os sistemas contendo um ou cinco dendrímeros não há PAMAMs G2 livres em solução depois de 1 μ s. Por outro lado, uma tendência clara não foi observada para os sistemas com dez dendrímeros. O único padrão bem definido para sistemas com dez dendrímeros pode ser observado na última linha da tabela 4.3, segundo a qual todas as PAMAMs G2 se ligam ao nanotubo de carbono. Aparentemente, este resultado é provocado tanto pela existência de um feixe, em detrimento de um nanotubo isolado, quanto pelo aumento da concentração de carboxilas nas extremidades do material carbonáceo. O aumento na concentração de PAMAMs na caixa de simulação pode fazer com que um padrão de estequiometria seja menos provável, por conta da concentração mais elevada de dímeros e trímeros de PAMAM, que podem ocupar um sítio de ligação da mesma forma que um dendrímero isolado.

4.3.4 Simulações da interação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 com modelos de membrana

A observação das trajetórias dos oito sistemas simulados para compreender a interação do nanocompósito com as bicamadas revela que não houve ligação permanente entre o nanomaterial e os lipídeos em nenhum dos quatro exemplares com a membrana que continha apenas POPC. Nas réplicas com a membrana negativamente carregada, contendo uma mistura de POPC e POPS, ocorreram dois eventos de ligação permanente nas quatro trajetórias estudadas. A figura 4.12 exhibe quadros referentes ao final de uma destas simulações.

Figura 4.12 – Nanocompósito SWNT/PAMAM G2 interagindo com uma bicamada lipídica de POPC e POPS. O lipídeo zwitteriônico está representado em branco e o negativo em verde, e o código de cores para o nanomaterial é o mesmo da figura 4.4. (a) Vista superior; (b-c) vista lateral.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fato de os contatos permanentes terem sido observados apenas quando a bicamada apresentou um lipídeo negativamente carregado sugere que a atração eletrostática entre as aminas protonadas na superfície da PAMAM G2 e as serinas na superfície da membrana pode ser uma das causas da ligação deste nanocompósito à membrana celular. Entretanto, os quadros da figura anterior mostram que os lipídeos estabelecem contatos apenas nas regiões que não estão recobertas com o dendrímero, ou seja, tanto a POPC quanto a POPS parecem ter mais afinidade com o SWNT do que com a PAMAM G2. A interação entre os lipídeos e o

nanomaterial carbonáceo foi intensa o suficiente para superar a interação hidrofóbica que mantém a estrutura de bicamada lipídica típica das membranas celulares. Um fenômeno semelhante a este foi descrito por Tu e colaboradores em simulações computacionais com grafeno e derivados.(108) A migração de lipídeos da membrana para a superfície do nanomaterial foi denominada extração destrutiva de lipídeos e definida como o estabelecimento de forças de dispersão de London entre a superfície apolar do nanomaterial carbonáceo e as caudas apolares dos fosfolipídeos. A visualização da trajetória permitiu verificar que vários lipídeos em contato com os nanotubos estavam localizados inicialmente na folha interna da membrana, que fica em contato com o citoplasma. Trata-se de uma modificação deletéria na estrutura da membrana, que pode desencadear a desintegração da bicamada e iniciar um processo de morte celular.

Embora o segundo modelo de membrana testado neste estudo seja extremamente simplificado, por ser composto por somente dois tipos de lipídeos e nenhuma proteína, ele apresenta uma característica que pode ser útil para prever o comportamento de células tumorais ao entrarem em contato com o nanocompósito. Entre outras modificações na composição da membrana plasmática, muitos tipos de células tumorais contêm fosfatidilserinas na camada externa da bicamada, enquanto que membranas de células saudáveis em geral abrigam fosfatidilserinas apenas na folha interna.(142) Este fato pode ser uma das explicações para a considerável capacidade deste nanomaterial de adentrar células tumorais de diferentes linhagens, como exemplificam os artigos citados na introdução do capítulo 3.

4.4 Conclusões parciais

Modelagem computacional e simulações computacionais por dinâmica molecular foram empregadas como ferramentas para investigar a formação do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e sua potencial internalização por bicamadas lipídicas. Usando-se o modelo *coarse grained* Martini, desenvolveram-se estruturas para a PAMAM G2 e seis variações de nanotubos de carbono de parede simples, contemplando três graus de funcionalização e dois de agregação. As simulações para investigar a automontagem do nanocompósito proporcionaram informações sobre as alterações conformacionais que a PAMAM G2 sofre ao entrar em contato com o SWNT, bem como sobre o mecanismo de

ligação destes nano-objetos. Os resultados indicam que a atração eletrostática entre as regiões eletricamente carregadas dos componentes do nanomaterial atuam num primeiro estágio da ligação, enquanto que forças entre a parede apolar do SWNT e a estrutura interna não polar da PAMAM G2 mantêm a estabilidade da interação. O estudo ajudou a validar a nova partícula CNP, incorporada recentemente ao Martini, por revelar que ela é capaz de reproduzir as forças de van der Waals que mantêm nanotubos unidos em feixes hexagonais. As simulações incluindo modelos de membrana ajudaram a elucidar o papel de diferentes tipos de lipídeos no processo de internalização do nanocompósito: as fosfatidilserinas, ao contrário das fosfatidilcolinas, parecem ser cruciais para o estabelecimento de uma interação permanente com a nanopartícula. A ligação do nanocompósito à bicamada mista levou à extração destrutiva de lipídeos da membrana, que culmina com o surgimento de danos estruturais na bicamada.

5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento da nanociência depende de esforços em várias frentes de estudo. Esta tese oferece contribuições ao entendimento de interações entre nanotubos de carbono e outros nanomateriais e estruturas biológicas. No capítulo 2, foi descrito um estudo cujo objetivo foi entender as interações entre nanotubos de carbono e metaloftalocianinas organizados na forma de filmes finos. Para tanto, foi realizada uma caracterização eletroquímica para determinar características que melhorem o desempenho destes transdutores, como a combinação de polieletrólitos e o número de bicamadas nos filmes finos. Em relação ao campo da nanotoxicologia, observou-se que fibroblastos saudáveis de fígado humano apresentam baixa viabilidade celular após serem incubados com nanocompósitos feitos de nanotubos de carbono e o dendrímero poli(amidoamina) de diferentes gerações. Este ensaio biológico foi apresentado no capítulo 3, juntamente com uma extensa caracterização físico-química das nanopartículas. O conjunto de informações obtidas neste estudo mostrou também a reduzida influência da geração do dendrímero em propriedades do nanocompósito, como potencial ζ e diâmetro, e na toxicidade observada nas células, ao contrário do que é frequentemente relatado para a poli(amidoamina) isolada. O uso de modelagem e simulação computacional para investigar nano-bio interfaces foi o tópico do capítulo 4. Através desta técnica, recentemente incorporada ao ramo da nanotoxicologia, desenvolveu-se um estudo abrangente sobre a automontagem do nanocompósito de nanotubos de carbono e poli(amidoamina), com a descrição dos mecanismos moleculares que regem a interação destes componentes. Simulações por dinâmica molecular proporcionaram informações sobre o papel de lipídeos distintos no processo de ligação deste nanomaterial à membrana celular: as fosfatidilserinas capturam a nanopartícula, transformando uma interação transiente com a bicamada lipídica em uma ligação permanente, enquanto que as fosfatidilcolinas estabelecem um grande número de contatos com a superfície apolar das paredes dos nanotubos de carbono, gerando assim um processo de extração de lipídeos que afeta a estrutura primordial da membrana celular. O conjunto de simulações descritas no capítulo 4 foi um importante teste de validação das novas partículas Martini denominadas CNP, que reproduziram a força de van der Waals necessária para manter nanotubos unidos num feixe hexagonal.

Alguns tópicos relatados nesta tese devem ser aprofundados. Para a finalização dos estudos e a escrita de artigos científicos, pretendemos desenvolver as atividades listadas a seguir.

- Desenvolver uma detalhada análise de contatos para determinar com maior exatidão a causa da ligação permanente entre o nanocompósito e a bicamada de POPC e POPS.
- Obter simulações de controle com feixes de nanotubos de carbono contendo 2% de carboxilas e PAMAM G2 interagindo com os modelos de membrana separadamente.
- Explorar, com ferramentas computacionais, as características termodinâmicas da automontagem do nanocompósito SWNT/PAMAM G2 e da sua interação com as bicamadas lipídicas.
- Comparar esta caracterização termodinâmica da automontagem do nanocompósito com os dados experimentais obtidos por ITC para testar a validade da partícula CNP do modelo Martini.
- Caracterizar detalhadamente o movimento de translação da PAMAM G2 sobre os nanotubos de carbono.
- Estudar a interação do nanocompósito com um modelo de membrana contendo outros tipos de lipídeos, como o gangliosídeo GM3.

REFERÊNCIAS

- 1 DEFINITION of a nanomaterial. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>. Acesso em: 17 mar. 2015.
- 2 RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583-592, 2006. doi: 10.1039/b502142c.
- 3 ETHERIDGE, M. L. et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2013. doi: 10.1016/j.nano.2012.05.013.
- 4 SUN, T. M. et al. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 53, n. 46, p. 12320-12364, 2014. doi: 10.1002/anie.201403036.
- 5 HEISTER, E. et al. Are carbon nanotubes a natural solution? applications in biology and medicine. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 6, p. 1870-1891, 2013. doi: 10.1021/am302902d.
- 6 FISHER, C. et al. Applications and nanotoxicity of carbon nanotubes and graphene in biomedicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-19, 2012. doi: 10.1155/2012/315185.
- 7 MONTHIOUX, M.; KUZNETSOV, V. L. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? **Carbon**, v. 44, n. 9, p. 1621-1623, 2006. doi: 10.1016/j.carbon.2006.03.019.
- 8 IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991. doi: 10.1038/354056a0.
- 9 CHARLIER, J. C. Defects in carbon nanotubes. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1063-1069, 2002. doi: 10.1021/ar010166k.
- 10 YANG, W. R. et al. Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene? **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 49, n. 12, p. 2114-2138, 2010. doi: 10.1002/anie.200903463.
- 11 BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering B: solid state materials for advanced technology**, v. 119, n. 2, p. 105-118, 2005. doi: 10.1016/j.mseb.2005.02.046.

12 YANG, N. et al. Carbon nanotube based biosensors. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 207, p. 690-715, 2015. doi: 10.1016/j.snb.2014.10.040.

13 BRAUN, A.; TCHERNIAC, J. The products of the action of acet-anhydride on phthalamide. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 40, p. 2709-2714, 1907. doi: 10.1002/cber.190704002202.

14 KASUGA, K.; TSUTSUI, M. Some new developments in the chemistry of metallophthalocyanines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 32, n. 1, p. 67-95, 1980. doi: 10.1016/s0010-8545(00)80370-7.

15 LEVER, A. B. P.; MILAEVA, E. R.; SPEIER, G. The redox chemistry of metallophthalocyanines in solution. In: LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. (Ed.). **Phthalocyanines: properties and applications**. New York: VCH Publishers, 1989. v. 3. cap. 1, p. 5-69.

16 GUILLAUD, G.; SIMON, J.; GERMAIN, J. P. Metallophthalocyanines - gas sensors, resistors and field effect transistors. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 178, p. 1433-1484, 1998. doi: 10.1016/s0010-8545(98)00177-5.

17 FERREIRA, M. et al. 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, 2004. v. 4. cap. 23, p. 441-466.

18 CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: from outstanding electronic properties to emerging applications. **Chemical Record**, v. 8, n. 2, p. 75-97, 2008. doi: 10.1002/tcr.20139.

19 LUTT, M.; FITZSIMMONS, M. R.; LI, D. Q. X-ray reflectivity study of self-assembled thin films of macrocycles and macromolecules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 2, p. 400-405, 1998. doi: 10.1021/jp9723473.

20 LI, D. Q. et al. Preparation, characterization, and properties of mixed organic and polymeric self-assembled multilayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 34, p. 8797-8804, 1998. doi: 10.1021/ja981232p.

21 LI, D. Q. et al. Conduction properties of metal organic monolayer semiconductor heterostructures. **Applied Physics Letters**, v. 73, n. 18, p. 2645-2647, 1998. doi: 10.1063/1.122540.

22 SIQUEIRA, J. R. et al. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 45, p. 22690-22694, 2006. doi: 10.1021/jp0649089.

-
- 23 SIQUEIRA JUNIOR, J. R. et al. Carbon nanotubes in nanostructured films: potential application as amperometric and potentiometric field-effect (bio-)chemical sensors. **Physica Status Solid A: applications and materials science**, v. 206, n. 3, p. 462-467, 2009.
- 24 ISIK, S. et al. Cell-compatible array of three-dimensional tip electrodes for the detection of nitric oxide release. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1566-1572, 2005. doi: 10.1016/j.bios.2004.08.022.
- 25 PEETERS, K. et al. The electrochemical detection of 4-chlorophenol at gold electrodes modified with different phthalocyanines. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 128, n. 2, p. 494-499, 2008. doi: 10.1016/j.snb.2007.07.039.
- 26 ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. Nanocarrier systems for transdermal drug delivery. In: SEZER, A. D. (Ed.). **Recent advances in novel drug carrier systems**. Rijeka: Intech, 2012. cap. 8, p. 201-240.
- 27 JANG, W. D. et al. Bioinspired application of dendrimers: from bio-mimicry to biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 1, p. 1-23, 2009. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.08.003.
- 28 KANNAN, R. M. et al. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, n. 6, p. 579-617, 2014. doi: 10.1111/joim.12280.
- 29 POURIANAZAR, N. T.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, p. 1-38, 2014. doi: 10.1007/s11051-014-2342-1.
- 30 TIRIVEEDHI, V. et al. Kinetic analysis of the interaction between poly(amidoamine) dendrimers and model lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta: biomembranes**, v. 1808, n. 1, p. 209-218, 2011. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.08.017.
- 31 SIQUEIRA, J. R. et al. 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. doi: 10.1021/jp800976f.
- 32 BORGES, J.; MANO, J. F. Molecular interactions driving the layer-by-layer assembly of multilayers. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 18, p. 8883-8942, 2014. doi: 10.1021/cr400531v.
- 33 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997. doi: 10.1126/science.277.5330.1232.

- 34 DECHER, G.; LVOV, Y.; SCHMITT, J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation polyanion molecular films. **Thin Solid Films**, v. 244, n. 1-2, p. 772-777, 1994. doi: 10.1016/0040-6090(94)90569-x.
- 35 TANG, Z. Y. et al. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 2006. doi: 10.1002/adma.200600113.
- 36 BERTRAND, P. et al. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 7, p. 319-348, 2000. doi: 10.1002/(sici)1521-3927(20000401)21:7<319::aid-marc319>3.0.co;2-7.
- 37 CARBON nanotube, single-walled, carboxylic acid functionalized. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/652490?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- 38 DENDRITECH. Disponível em: <<http://www.dendritech.com/pamam.html>>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- 39 NICKEL(II) phthalocyanine-tetrasulfonic acid tetrasodium salt. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274909?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- 40 SUPATTAPONE, S. et al. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14529-14534, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.25.14529.
- 41 DR. HAYES' research activities. Disponível em: <<http://www.andrews.edu/cas/chemistry/research/hayes-research.html>>. Acesso em: 25 ago. 2015.
- 42 CRESPILO, F. N.; SILVA, W. C.; ZUCOLOTO, V. Supramolecular assemblies of metallophthalocyanines: physicochemical properties and applications. In: NANTES, I. L.; BROCHSZTAIN, S. (Ed.). **Catalysis and photochemistry in heterogeneous media**. Kerala: Research Signpost, 2007. p. 59-73.
- 43 ARTETA, M. Y. et al. On the formation of dendrimer/nucleolipids surface films for directed self-assembly. **Soft Matter**, v. 11, n. 10, p. 1973-1990, 2015. doi: 10.1039/c4sm02712d.
- 44 SILVA, H. S. et al. Molecular ordering in layer-by-layer polyelectrolyte films studied by sum-frequency vibrational spectroscopy: the effects of drying procedures. **Journal of**

Nanoscience and Nanotechnology, v. 8, n. 7, p. 3399-3405, 2008. doi: 10.1166/jnn.2008.125.

45 LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. **Phthalocyanines: properties and applications**. New York-NY: John Wiley & Sons. 1989. v. 3.

46 PICART, C. et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12531-12535, 2002. doi: 10.1073/pnas.202486099.

47 GARZA, J. M. et al. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. **Langmuir**, v. 20, n. 17, p. 7298-7302, 2004. doi: 10.1021/la049106o.

48 ITKIS, M. E. et al. Comparison of analytical techniques for purity evaluation of single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 10, p. 3439-3448, 2005. doi: 10.1021/ja043061w.

49 ISHIKAWA, F. N. et al. Importance of controlling nanotube density for highly sensitive and reliable biosensors functional in physiological conditions. **ACS Nano**, v. 4, n. 11, p. 6914-6922, 2010. doi: 10.1021/nn101198u.

50 CENTURION, L.; MOREIRA, W. C.; ZUCOLOTTI, V. Tailoring molecular architectures with cobalt tetrasulfonated phthalocyanine: immobilization in layer-by-layer films and sensing applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2399-2405, 2012. doi: 10.1166/jnn.2012.5782.

51 INTERPRETATION of infrared spectra. Disponível em: <<http://wwwchem.csustan.edu/Tutorials/INFRARED.HTM>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

52 ZUCOLOTTI, V. et al. Unusual interactions binding iron tetrasulfonated phthalocyanine and poly(allylamine hydrochloride) in layer-by-layer films. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 16, p. 3733-3737, 2003. doi: 10.1021/jp027573d.

53 CUI, X. W.; YAN, D. Y. Preparation, characterization and crystalline transitions of odd-even polyamides 11,12 and 11,10. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 4, p. 863-870, 2005. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.045.

54 DEUTSCH, D. S. et al. FT-IR investigation of the thermal decomposition of poly(amidoamine) dendrimers and dendrimer-metal nanocomposites supported on Al₂O₃ and ZrO₂. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 11, p. 4246-4255, 2007. doi: 10.1021/jp065853d.

55 GRABCHEV, I.; PETKOV, C.; BOJINOV, V. Infrared spectral characterization of poly(amidoamine) dendrimers peripherally modified with 1,8-naphthalimides. **Dyes and Pigments**, v. 62, n. 3, p. 229-234, 2004. doi: 10.1016/j.dyepig.2003.12.004.

56 IR band positions. Disponível em: <<http://infrared.als.lbl.gov/content/web-links/91-ir-band-positions>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

57 SEOUDI, R.; EL-BAHY, G. S.; EL SAYED, Z. A. FTIR, TGA and DC electrical conductivity studies of phthalocyanine and its complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 753, n. 1-3, p. 119-126, 2005. doi: 10.1016/j.molstruc.2005.06.003.

58 SIQUEIRA, J. R. et al. Bifunctional electroactive nanostructured membranes. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 11, p. 2676-2680, 2007. doi: 10.1016/j.elecom.2007.08.009.

59 JORIO, A. et al. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. **New Journal of Physics**, v. 5, p. 1-17, 2003. doi: 10.1088/1367-2630/5/1/139.

60 LOBO, R. F. M. et al. The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 101-108, 2003. doi: 10.1088/0957-4484/14/1/322.

61 GONG, K. P. et al. Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: a review. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1383-1393, 2005. doi: 10.2116/analsci.21.1383.

62 ONI, J. et al. Metallophthalocyanine-modified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 105, n. 2, p. 208-213, 2005. doi: 10.1016/j.snb.2004.06.002.

63 KADISH, K. M. et al. First reversible electrogeneration of triply oxidized nickel porphyrins and porphycenes - formation of nickel(III) pi-dications. **Inorganic Chemistry**, v. 32, n. 20, p. 4177-4178, 1993. doi: 10.1021/ic00072a005.

64 WOLBERG, A.; MANASSEN, J. Electrochemical and electron paramagnetic resonance studies of metalloporphyrins and their electrochemical oxidation products. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 10, p. 2982-&, 1970. doi: 10.1021/ja00713a010.

65 MUGADZA, T.; ARSLANOGLU, Y.; NYOKONG, T. Characterization of 2,(3)-tetra-(4-oxo-benzamide) phthalocyaninato cobalt (II)-single walled carbon nanotube conjugate platforms and their use in electrocatalysis of amitrole. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 44-51, 2012. doi: 10.1016/j.electacta.2012.02.041.

-
- 66 SUN, Y. P. et al. Soluble dendron-functionalized carbon nanotubes: preparation, characterization, and properties. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 9, p. 2864-2869, 2001. doi: 10.1021/cm010069l.
- 67 SUN, J. T.; HONG, C. Y.; PAN, C. Y. Surface modification of carbon nanotubes with dendrimers or hyperbranched polymers. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 998-1007, 2011. doi: 10.1039/c0py00356e.
- 68 CAMINADE, A. M.; MAJORAL, J. P. Dendrimers and nanotubes: a fruitful association. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2034-2047, 2010. doi: 10.1039/b926408f.
- 69 ZENG, Y. L. et al. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly(amidoamine) dendrimer for mediator-free glucose biosensor. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 1, p. 185-190, 2007. doi: 10.1016/j.elecom.2006.08.052.
- 70 YUAN, W. et al. Deposition of silver nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes grafted with hyperbranched poly(amidoamine) and their antimicrobial effects. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 48, p. 18754-18759, 2008. doi: 10.1021/jp807133j.
- 71 FROHLICH, E. et al. Combination of small size and carboxyl functionalisation causes cytotoxicity of short carbon nanotubes. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1211-1224, 2013. doi: 10.3109/17435390.2012.729274.
- 72 HERRERO, M. A. et al. Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 28, p. 9843-9848, 2009. doi: 10.1021/ja903316z.
- 73 PAN, B. F. et al. Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimer-coated multi-walled carbon nanotubes and their application in gene delivery systems. **Nanotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1-9, 2009. doi: 10.1088/0957-4484/20/12/125101.
- 74 QIN, W. L. et al. Improved GFP gene transfection mediated by polyamidoamine dendrimer-functionalized multi-walled carbon nanotubes with high biocompatibility. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 206-213, 2011. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.001.
- 75 YANG, K. Q. et al. Polyamidoamine dendrimer-functionalized carbon nanotubes-mediated GFP gene transfection for HeLa cells: Effects of different types of carbon nanotubes. **Journal of Biomedical Materials Research: part A**, v. 99A, n. 2, p. 231-239, 2011. doi: 10.1002/jbm.a.33180.

76 PAN, B. F. et al. Design of dendrimer modified carbon nanotubes for gene delivery. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2007. doi: 10.1007/s11670-007-0001-0.

77 AL-JAMAL, K. T. et al. Enhanced cellular internalization and gene silencing with a series of cationic dendron-multiwalled carbon nanotube: siRNA complexes. **Faseb Journal**, v. 24, n. 11, p. 4354-4365, 2010. doi: 10.1096/fj.09-141036.

78 SHI, X. Y. et al. Multifunctional dendrimer-modified multiwalled carbon nanotubes: synthesis, characterization, and in vitro cancer cell targeting and imaging. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1744-1750, 2009. doi: 10.1021/bm9001624.

79 WEN, S. H. et al. Targeted and pH-responsive delivery of doxorubicin to cancer cells using multifunctional dendrimer-modified multi-walled carbon nanotubes. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 9, p. 1267-1276, 2013. doi: 10.1002/adhm.201200389.

80 TAY, C. Y. et al. Back to basics: exploiting the innate physico-chemical characteristics of nanomaterials for biomedical applications. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 38, p. 5936-5955, 2014. doi: 10.1002/adfm.201401664.

81 Join the dialogue. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 9, p. 545-545, 2012.

82 ZHANG, B. L. et al. Characterization of and biomolecule immobilization on the biocompatible multi-walled carbon nanotubes generated by functionalization with polyamidoamine dendrimers. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 18-25, 2010. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.05.023.

83 WU, P. et al. Biocompatible carbon nanotubes generated by functionalization with glycodendrimers. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 27, p. 5022-5025, 2008. doi: 10.1002/anie.200705363.

84 CANCINO, J. et al. In vitro nanotoxicity of single-walled carbon nanotube-dendrimer nanocomplexes against murine myoblast cells. **Toxicology Letters**, v. 219, n. 1, p. 18-25, 2013. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.02.009.

85 DAVOREN, M. et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 3, p. 438-448, 2007. doi: 10.1016/j.tiv.2006.10.007.

86 PEIGNEY, A. et al. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 39, n. 4, p. 507-514, 2001. doi: 10.1016/s0008-6223(00)00155-x.

87 TIAN, W. D.; MA, Y. Q. Insights into the endosomal escape mechanism via investigation of dendrimer-membrane interactions. **Soft Matter**, v. 8, n. 23, p. 6378-6384, 2012. doi: 10.1039/c2sm25538c.

88 KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 2008. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001.

89 XIA, J. L. et al. Preparation, optical properties and cell staining of water soluble amine-terminated PAMAM G2.0-Au nanocomposites. **Journal of Central South University of Technology**, v. 12, n. 6, p. 641-646, 2005. doi: 10.1007/s11771-005-0061-6.

90 LUO, X. H.; IMAE, T. Photochemical synthesis of crown-shaped platinum nanoparticles using aggregates of G4-NH₂ PAMAM dendrimer as templates. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 567-571, 2007. doi: 10.1039/b611867b.

91 ZETA sizer nano series user manual. Disponível em: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf. Acesso em: 26 jan. 2015.

92 RAUTARAY, D.; MANDAL, S.; SASTRY, M. Synthesis of hydroxyapatite crystals using amino acid-capped gold nanoparticles as a scaffold. **Langmuir**, v. 21, n. 11, p. 5185-5191, 2005. doi: 10.1021/la048541f.

93 BRUNNER, T. J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006. doi: 10.1021/es052069i.

94 MAILANDER, V.; LANDFESTER, K. Interaction of nanoparticles with cells. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 9, p. 2379-2400, 2009. doi: 10.1021/bm900266r.

95 GARZA, K. M.; SOTO, K. F.; MURR, L. E. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 83-94, 2008.

96 LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008. doi: 10.1002/smll.200700595.

97 FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565-571, 2007. doi: 10.1016/j.copbio.2007.11.008.

- 98 MAKARUCHA, A. J.; TODOROVA, N.; YAROVSKY, I. Nanomaterials in biological environment: a review of computer modelling studies. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 40, n. 2, p. 103-115, 2011. doi: 10.1007/s00249-010-0651-6.
- 99 SHI, X. H. et al. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 11, p. 714-719, 2011. doi: 10.1038/nnano.2011.151.
- 100 NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009. doi: 10.1038/nmat2442.
- 101 YANAMALA, N.; KAGAN, V. E.; SHVEDOVA, A. A. Molecular modeling in structural nano-toxicology: Interactions of nano-particles with nano-machinery of cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 15, p. 2070-2077, 2013. doi: 10.1016/j.addr.2013.05.005.
- 102 JIMENEZ-CRUZ, C. A.; KANG, S. G.; ZHOU, R. H. Large scale molecular simulations of nanotoxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: systems biology and medicine**, v. 6, n. 4, p. 265-279, 2014. doi: 10.1002/wsbm.1271.
- 103 KANG, S. G. et al. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C-82(OH)(22) and its implication for de novo design of nanomedicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 38, p. 15431-15436, 2012. doi: 10.1073/pnas.1204600109.
- 104 YANG, K.; MA, Y. Q. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 8, p. 579-583, 2010. doi: 10.1038/nnano.2010.141.
- 105 VACHA, R.; MARTINEZ-VERACOECHEA, F. J.; FRENKEL, D. Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes. **Nano Letters**, v. 11, n. 12, p. 5391-5395, 2011. doi: 10.1021/nl2030213.
- 106 LI, Y.; GU, N. Computer simulation of the inclusion of hydrophobic nanoparticles into a lipid bilayer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 11, p. 7616-7619, 2010. doi: 10.1166/jnn.2010.2932.
- 107 LIN, J. Q.; ALEXANDER-KATZ, A. Cell membranes open "doors" for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. **ACS Nano**, v. 7, n. 12, p. 10799-10808, 2013. doi: 10.1021/nn4040553.

-
- 108 TU, Y. S. et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 8, p. 594-601, 2013. doi: 10.1038/nnano.2013.125.
- 109 MONTICELLI, L. et al. Effects of carbon nanoparticles on lipid membranes: a molecular simulation perspective. **Soft Matter**, v. 5, n. 22, p. 4433-4445, 2009. doi: 10.1039/b912310e.
- 110 WALLACE, E. J.; SANSOM, M. S. P. Blocking of carbon nanotube based nanoinjectors by lipids: a simulation study. **Nano Letters**, v. 8, n. 9, p. 2751-2756, 2008. doi: 10.1021/nl801217f.
- 111 WONG-EKKABUT, J. et al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 6, p. 363-368, 2008. doi: 10.1038/nnano.2008.130.
- 112 LELIMOUSIN, M.; SANSOM, M. S. P. Membrane perturbation by carbon nanotube insertion: pathways to internalization. **Small**, v. 9, n. 21, p. 3639-3646, 2013. doi: 10.1002/sml.201202640.
- 113 LI, X. Y. et al. Effects of embedded carbon nanotube on properties of biomembrane. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 18, p. 5391-5397, 2012. doi: 10.1021/jp301864z.
- 114 SHI, X. H.; KONG, Y.; GAO, H. J. Coarse grained molecular dynamics and theoretical studies of carbon nanotubes entering cell membrane. **Acta Mechanica Sinica**, v. 24, n. 2, p. 161-169, 2008. doi: 10.1007/s10409-007-0131-0.
- 115 LEE, H.; LARSON, R. G. Molecular dynamics simulations of PAMAM dendrimer-induced pore formation in DPPC bilayers with a coarse-grained model. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 37, p. 18204-18211, 2006. doi: 10.1021/jp0630830.
- 116 LEE, H.; LARSON, R. G. Coarse-grained molecular dynamics studies of the concentration and size dependence of fifth- and seventh-generation PAMAM dendrimers on pore formation in DMPC bilayer. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 26, p. 7778-7784, 2008. doi: 10.1021/jp802606y.
- 117 KELLY, C. V. et al. Poly(amidoamine) dendrimers on lipid bilayers I: free energy and conformation of binding. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 31, p. 9337-9345, 2008. doi: 10.1021/jp801377a.
- 118 KELLY, C. V. et al. Poly(amidoamine) dendrimers on lipid bilayers II: effects of bilayer phase and dendrimer termination. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 31, p. 9346-9353, 2008. doi: 10.1021/jp8013783.

119 TIAN, W. D.; MA, Y. Q. pH-responsive dendrimers interacting with lipid membranes. **Soft Matter**, v. 8, n. 9, p. 2627-2632, 2012. doi: 10.1039/c2sm06624f.

120 XIE, L. Q.; TIAN, W. D.; MA, Y. Q. Computer simulations of the interactions of high-generation polyamidoamine dendrimers with electronegative membranes. **Soft Matter**, v. 9, n. 39, p. 9319-9325, 2013. doi: 10.1039/c3sm51572a.

121 HE, X. C. et al. Molecular analysis of interactions between dendrimers and asymmetric membranes at different transport stages. **Soft Matter**, v. 10, n. 1, p. 139-148, 2014. doi: 10.1039/c3sm51990b.

122 GUO, R. H.; MAO, J.; YAN, L. T. Unique dynamical approach of fully wrapping dendrimer-like soft nanoparticles by lipid bilayer membrane. **Acs Nano**, v. 7, n. 12, p. 10646-10653, 2013. doi: 10.1021/nm4033344.

123 GROMACS. Disponível em: <<http://www.gromacs.org/>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

124 HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

125 MARRINK, S. J.; DE VRIES, A. H.; MARK, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 2, p. 750-760, 2004. doi: 10.1021/jp036508g.

126 MARRINK, S. J. et al. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812-7824, 2007. doi: 10.1021/jp071097f.

127 MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Perspective on the Martini model. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 16, p. 6801-6822, 2013. doi: 10.1039/c3cs60093a.

128 MONTICELLI, L. On atomistic and coarse-grained models for C-60 fullerene. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 4, p. 1370-1378, 2012. doi: 10.1021/ct3000102.

129 DATSYUK, V. et al. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 6, p. 833-840, 2008. doi: 10.1016/j.carbon.2008.02.012.

130 DUMLICH, H. et al. Bundle and chirality influences on properties of carbon nanotubes studied with van der Waals density functional theory. **Physica Status Solidi B: basic solid state physics**, v. 248, n. 11, p. 2589-2592, 2011. doi: 10.1002/pssb.201100212.

-
- 131 KIS, A. et al. Reinforcement of single-walled carbon nanotube bundles by intertube bridging. **Nature Materials**, v. 3, n. 3, p. 153-157, 2004. doi: 10.1038/nmat1076.
- 132 BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984. doi: 10.1063/1.448118.
- 133 MAINGI, V. et al. Dendrimer building toolkit: model building and characterization of various dendrimer architectures. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 25, p. 1997-2011, 2012. doi: 10.1002/jcc.23031.
- 134 HASHIMOTO, T. et al. A combined small-angle scattering study of a chemical reaction at specific sites and reaction-induced self-assembly as a problem in open non-equilibrium phenomena. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. S73-S77, 2007. doi: 10.1107/a0032889807003445.
- 135 PAVAN, G. M. et al. Combining metadynamics simulation and experiments to characterize dendrimers in solution. **Soft Matter**, v. 9, n. 9, p. 2593-2597, 2013. doi: 10.1039/c3sm27706b.
- 136 HAN, M.; CHEN, P. Q.; YANG, X. Z. Molecular dynamics simulation of PAMAM dendrimer in aqueous solution. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3481-3488, 2005. doi: 10.1016/j.polymer.2005.02.107.
- 137 MAITI, P. K.; MESSINA, R. Counterion distribution and zeta-potential in PAMAM dendrimer. **Macromolecules**, v. 41, n. 13, p. 5002-5006, 2008. doi: 10.1021/ma7025435.
- 138 LEE, I. et al. Structural molecular dynamics studies on polyamidoamine dendrimers for a therapeutic application: effects of pH and generation. **Macromolecules**, v. 35, n. 11, p. 4510-4520, 2002. doi: 10.1021/ma010354q.
- 139 RATHGEBER, S. et al. Dynamics of star-burst dendrimers in solution in relation to their structural properties. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, n. 8, p. 4047-4062, 2002. doi: 10.1063/1.1493771.
- 140 VASUMATHI, V. et al. Structure of a carbon nanotube-dendrimer composite. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1372-1380, 2013. doi: 10.1039/c2sm26804c.
- 141 TIAN, W. D.; MA, Y. Q. Coarse-grained molecular simulation of interacting dendrimers. **Soft Matter**, v. 7, n. 2, p. 500-505, 2011. doi: 10.1039/c0sm00696c.
- 142 KLAHN, M.; ZACHARIAS, M. Transformations in plasma membranes of cancerous cells and resulting consequences for cation insertion studied with molecular dynamics.

Physical Chemistry Chemical Physics, v. 15, n. 34, p. 14427-14441, 2013. doi: 10.1039/c3cp52085d.

APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO GERADA DURANTE O DOUTORAMENTO

CENTURION, Lilian M. P. C.; ZUCOLOTTI, Valtencir. *Escrita científica: como organizar e escrever bons artigos*. In: ISHIKAWA, T. T.; LEIVA, R. (Org.). **Aspectos fundamentais na formação do aluno de pós-graduação**. São Carlos: EdUFSCar, 2015. No prelo.