

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

NATHÁLIA OLIVEIRA BRAGA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS LUMINESCENTES À BASE DE POLI [2-METOXI-5- (2-ETIL-HEXILOXI) -1,4-FENILENEVINILENO - MEH-PPV EM MATRIZ DE BORRACHA NATURAL: RUMO A CONSTRUÇÃO DE SENSORES BIOCMPATIVEIS PARA O MONITORAMENTO DE ICTERÍCIA NEONATAL.

Presidente Prudente

2019

NATHÁLIA OLIVEIRA BRAGA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS LUMINESCENTES À BASE DE POLI [2-METOXI-5-(2-ETIL-HEXILOXI)-1,4-FENILENEVINILENO - MEH-PPV EM MATRIZ DE BORRACHA NATURAL: RUMO A CONSTRUÇÃO DE SENSORES BIOCOMPATÍVEIS PARA O MONITORAMENTO DE ICTERÍCIA NEONATAL.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração em Química dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.

Presidente Prudente

2019

Ficha catalográfica elaborada por

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO

UNESP – Bauru

Braga, Nathália Oliveira.

Desenvolvimento de membranas luminescentes à base de poli [2-metoxi-5- (2-etil-hexiloxi) -1,4-fenilenevinileno - meh-ppv em matriz de borracha natural: rumo a construção de sensores biocompatíveis para o monitoramento de icterícia neonatal./ Nathália Oliveira Braga, 2019

125 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2019

I. Icterícia. 2. Biocompatível. 3. Fototerapia. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE NATHÁLIA OLIVEIRA BRAGA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS , DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 13 dias do mês de setembro do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) FCT - Campus de Presidente Prudente - Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP - Presidente Prudente, Prof. Dr. FELIPE SILVA BELLUCCI do(a) Secretaria de Empreendedorismo e Inovação - SEMPI / Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, Profª. Drª. ANA MARIA PIRES do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP - Presidente Prudente, Prof. Dr. LUIS VICENTE DE ANDRADE SCALVI do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. EDGARDO ALFONSO GOMEZ PINEDA do(a) Departamento de Química / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de NATHÁLIA OLIVEIRA BRAGA, intitulada **Desenvolvimento de membranas luminescentes à base poli(2-metoxi-5- (2 etil-hexilóxi) -1,4-fenilenovinileno - meh-ppv em matriz de borracha natural: rumo a construção de sensores biocompatíveis para o monitoramento de icterícia..** Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB 

Prof. Dr. FELIPE SILVA BELLUCCI 

Profª. Drª. ANA MARIA PIRES 

Prof. Dr. LUIS VICENTE DE ANDRADE SCALVI 

Prof. Dr. EDGARDO ALFONSO GOMEZ PINEDA 

NATHÁLIA OLIVEIRA BRAGA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS LUMINESCENTES À BASE DE POLI [2-METOXI-5- (2-ETIL-HEXILOXI) -1,4-FENILENEVINILENO - MEH-PPV EM MATRIZ DE BORRACHA NATURAL: RUMO A CONSTRUÇÃO DE SENSORES BIOCMPATIVEIS PARA O MONITORAMENTO DE ICTERÍCIA NEONATAL.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração em Química dos Materiais

Data de aprovação:

Prof. Dr. Aldo Eloizo Job – UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Bianchi - UFOP

Dedico este trabalho a todos que acreditaram na concretização deste sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho, que considero uma conquista grandiosa, aos verdadeiros incentivadores e professores de vida: Meus pais. Sem eles nada seria possível e nada teria acontecido. Com a benção de Deus e amor incondicional, meus pais me educaram com valores e princípios com os quais seguirei meu caminho de maneira honesta e honrosa. Agradeço também aos meus irmãos pelo carinho, atenção e toda cumplicidade. Às minhas avós e avôs pelas orações e sabedoria concedida e ao Juarez pela paciência, companheirismo e dedicação.

Ao professor Dr. Aldo E. Job pela confiança e pela acolhida em seu lar com sua família.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Bianchi pela coorientação e auxílio para a execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Polímeros e Propriedades Eletrônicas de Materiais – LAPPEM pelas discussões enriquecedoras.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Borracha e Aplicações – LTBA/UNESP, que para mim foram verdadeiros anjos enviados por Deus para me oferecer as palavras e o caminho certo a ser conduzido. Gratidão eterna.

Ao Instituto Nacional da Eletrônica Orgânica - INEO, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte acadêmico e financeiro.

Aos professores, técnicos e corpo administrativo de toda a UNESP e UFOP.

E a Deus, por toda luz que me guia.

*“Remember your intrinsic motivating reasons for doing what you do.”*

*Neil Parischa*



## RESUMO

As vantagens do uso de dispositivos ópticos na área das ciências da vida são amplamente exploradas, especialmente para o diagnóstico médico e protocolos de tratamento em uma prática de cuidados de saúde. Além disso, alguns pesquisadores têm atraído muita atenção ao desenvolvimento de materiais biocompatíveis e vestíveis para melhorar a segurança de dispositivos médicos, bem como para estabelecer novos procedimentos para monitorar a resposta de terapia e diagnóstico clínico. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma membrana biocompatível-luminescente não invasiva para reduzir os erros mais comuns relatados em fototerapia convencional de luz azul para icterícia neonatal. Dentre estes erros destacam-se: intensidade de irradiância que chega ao recém-nascido bem como seu posicionamento frente a fonte de radiação e qualidade das lâmpadas dos aparelhos fototerápicos. Neste contexto, a membrana foi confeccionada como um filme de sensor de luz azul, fluorescente e colorimétrico a partir de polímeros: poli [2-metoxi, 5-(2'etilhexyloxy)-p-fenilenovileno (MEH-PPV) em uma matriz de borracha natural. Para tal, as membranas de borracha natural (BN) foram obtidas utilizando o látex, extraído das árvores *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600), por *casting*, com posterior tratamento térmico em estufa. Em seguida, também por *casting*, a solução de MEH-PPV/BN, razão igual a 4000, foi depositada na membrana BN para fazer uma camada fina de material luminescente. A membrana de MEH-PPV/BN foi submetida às mesmas condições utilizadas para o tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal ( $40 \mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$ , 460 nm). As propriedades das membranas foram caracterizadas por espectroscopia óptica (UV-Vis, PL) e de infravermelho (FTIR), microscopias confocal (MC), eletrônica de varredura (MEV) de força atômica (AFM) e seu potencial toxicológico por extração e teste de contato direto, usando a linha de células CHO-k1. A partir dos resultados encontrados, foi possível compreender os efeitos da fototerapia de luz azul sob a membrana de MEH-PPV/BN bem como nos permite sugerir que a membrana de MEH-PPV/BN poderia ser usada como um sensor visual, qualitativo e quantitativo e biocompatível de acúmulo de dose de radiação para tratamentos médico-hospitalares, especialmente para a icterícia neonatal.

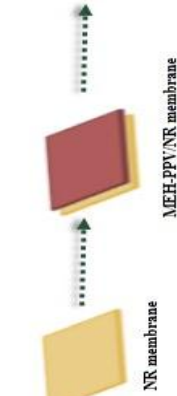
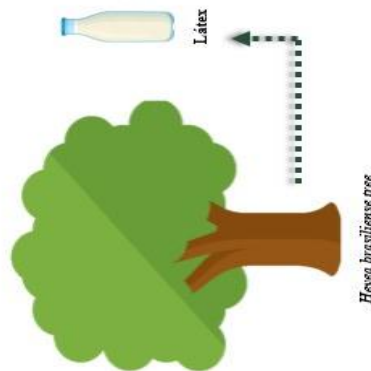
**Palavras-chave:** Icterícia, biocompatível, fototerapia, sensor, dispositivos médicos.

## ABSTRACT

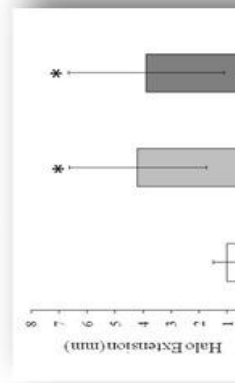
The advantages of optical devices in the life sciences are widely exploited, especially for medical diagnosis and treatment protocols in a health care practice. In addition, some researchers have attracted much attention to development flexible and biocompatible materials to improve security of medical devices, as well as to establish new procedures for monitoring therapy response and clinical diagnosis. The present paper aims to develop a new noninvasive biocompatible-luminescent membrane to reduce the most common user errors with conventional blue-light phototherapy of neonatal jaundice. The membrane was design based on a polymer-based fluorescent and colorimetric blue-light sensor film. This material was based on poly[2-methoxy,5-(2'etilhexyloxy)-p-fenilenovileno (MEH-PPV) in a natural rubber matrix. Natural rubber membranes (BN) were obtained using latex from *Hevea brasiliensis* trees (clone RRIM 600) by casting, with the time and temperature of thermal treatment fixed on 65°C for 10h. Then, also by casting, MEH-PPV/NR solution, ratio equal to 4000, was deposited on NR membrane for make thin-layer of luminescent material. The MEH-PPV/NR membrane was submitted to the same conditions used for neonatal hyperbilirubinemia treatment (Blue light phototherapy, 40  $\mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$ , 460nm). The proprieties of membranes were characterized by optical (UV-Vis, PL) and infrared (FTIR) spectroscopy confocal microscopy (MC), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) and its toxicological potential by Extraction and Direct Contact Test using CHO-k1 cell line. From the results found, it was possible to understand the blue light phototherapy effects on MEH-PPV/NR membrane as well this allows us to suggest that MEH-PPV/NR membrane could be used as a qualitative and quantitative visual biocompatible-sensor of radiation dose accumulation for medical-hospital treatments, especially for neonatal jaundice.

**Keywords:** *Jaundice, biocompatible, phototherapy, sensor, medical-devices.*

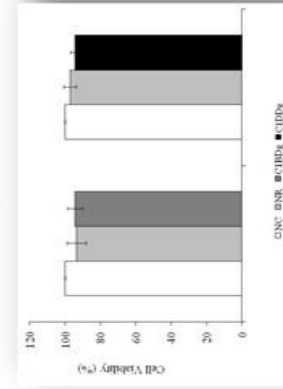
# Colorimetric patch for real-time light dosimetry



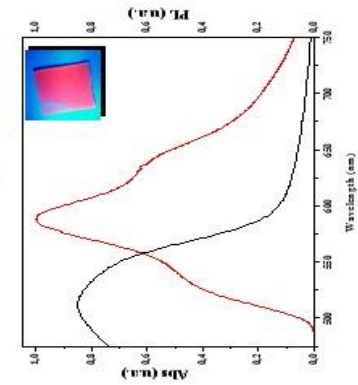
## GRAPHICAL ABSTRACT



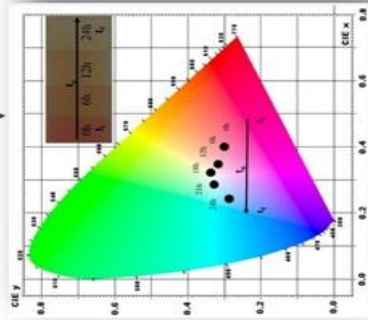
Graph of Extension of the halo formed between the CHO - KI cells and the fragments (CIBDg) after exposure of 24 hours. The horizontal bars represent the mean and the vertical line the standard deviation. \*: Indicates significant difference in relation to the respective negative control (NC) ( $p \leq 0.05$ ).



Extension Graph of the halo formed between the CHO - KI cells and the fragments (CIBDg) after exposure of 24 hours. The horizontal bars represent the mean and the vertical line the standard deviation. \*: Indicates significant difference in relation to the respective negative control (NC) ( $p \leq 0.05$ ).



ABS and PL spectra of MEH-PPV/NR membrane.



Chromaticity diagram of MEH-PPV/NR membrane.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	7
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
GRAPHICAL ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	14
ÍNDICE DE TABELAS .....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Motivação .....	20
1.2 Objetivo .....	23
1.3 Estrutura da tese.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
2.1 Hiperbilirrubinemia neonatal no contexto global.....	24
2.2 Hiperbilirrubinemia neonatal versus tratamento .....	26
2.3 Sistemas de detecção e monitoramento para hiperbilirrubinemia neonatal .....	30
2.4 Dosimetria de radiações.....	35
2.5 Polímeros .....	36
2.5.1. Polímero natural: Borracha Natural (BN) .....	41
2.5.2. Polímeros luminescentes: Poli[2-metóxi,5-(2'-etil-hexiloxi)-p-fenilenovinileno]-MEH-PPV.....	45
2.6 Dispositivos biocompatíveis (sensores) .....	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Coleta do látex .....	53
3.2 Preparo das Membranas de Borracha Natural .....	54
3.3 Poli[2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)parafenilenovinileno] - MEH-PPV .....	55
3.4 Solução de BN/MEH-PPV .....	55
3.5 Membranas luminescentes de MEH-PPV/BN.....	58
3.6 Técnicas de Caracterização .....	59
3.6.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis .....	59
3.6.2 Espectroscopia de Luminescência .....	59
3.6.4 Medidas de Cromaticidade .....	61
3.6.5 Espectroscopia de absorção no infravermelho- <i>FTIR modo ATR</i> .....	62
3.6.6 Microscopia Confocal .....	62
3.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
3.6.8 Microscopia de Força Atômica.....	63
3.6.9 Testes de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	63

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	66
4.1 Caracterização Ótica.....	66
4.1.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis .....	66
4.1.2 Espectroscopia Luminescência.....	68
<b>4.2 Caracterização Química.....</b>	<b>78</b>
4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho .....	79
4.3 Caracterização Morfológica .....	81
4.3.1 Microscopia confocal .....	81
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	82
4.3.3 Microscopia de Força Atômica.....	86
4.5 Caracterização Citotóxica.....	86
4.5.1 Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	87
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92
6. PRINCIPAIS RESULTADOS GERADOS .....	95
7. REFERÊNCIAS .....	96
Anexo I.....	112
Estudo do efeito da radiação não ionizante nas propriedades óticas e toxicológicas de nanopartículas de MEH-PPV hidrofílicas .....	112
Resumo .....	113
Introdução.....	113
Materiais e Métodos .....	114
Resultados preliminares e Discussão.....	116
Conclusão .....	120
Referências Bibliográficas.....	121

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EXEMPLO DE DOSÍMETROS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE POLÍMEROS CONJUGADOS, (A) EM SOLUÇÃO <sup>197</sup> , (B) GEL 3D <sup>198</sup> , (C) FILME (2D) <sup>199</sup> , (D) FIBRAS (1D) <sup>200</sup> E (E) ADESIVOS PARA USO JUNTO A FRALDA - PRODUÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL ( <i>STARTUP LIFEE</i> ). .....	22
FIGURA 2: FÓRMULA ESTRUTURAL DA MOLÉCULA DE BILIRRUBINA <sup>4</sup> .....	26
FIGURA 3: MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO DA MOLÉCULA DE BILIRRUBINA EM UM COMPOSTO SOLÚVEL EM ÁGUA. FONTE: MAISELS, M. J. E MCDONAGH, A. F., 2008 .....	29
FIGURA 4: (A) PROCESSO DE SEGMENTAÇÃO USANDO O CARTÃO DE CALIBRAÇÃO DE COR (B) IMAGENS DE ENTRADA DO SISTEMA (C) RESULTADOS DA SEGMENTAÇÃO DE IMAGEM. (IMAGEM ADAPTADA DE AYDIN M (2016). REF. 92). .....	31
FIGURA 5: IMAGEM DO SENSOR DE COLOCADO SOBRE UM BONECO EXPOSTO À LUZ AZUL, ILUSTRANDO A APLICAÇÃO DO SENSOR DE RADIAÇÃO DESENVOLVIDO NESTE TRABALHO. IMAGEM EXTRAÍDA DE FERREIRA ET AL (2013) <sup>98</sup> . .....	32
FIGURA 6: MAPA DA INTENSIDADE DA LUZ AZUL NA SUPERFÍCIE DO CORPO DE UM RECÉM-NASCIDO SOB FOTOTERAPIA. (IMAGEM ADAPTADA DA REF. 103). .....	33
FIGURA 7: ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO DISTINGUINDO AS REGIÕES ONDE ESTÃO AS RADIAÇÕES IONIZANTES E AS NÃO IONIZANTES <sup>47</sup> .....	35
FIGURA 8: ESTRUTURA QUÍMICA DO POLIETILENO E SEU MONÔMERO. <sup>124</sup> .....	37
FIGURA 9: GRÁFICO DO PREÇO MÉDIO DO COÁGULO (PRC) PARA TBS IGUAL A 53%. LEGENDA: PREÇO DE REFERÊNCIA DO COÁGULO (PRC), TEOR DE BORRACHA SECA (TBS). FONTE: APABOR; COMPILADO PELA SCOT CONSULTORIA <sup>125-126</sup> . .....	42
FIGURA 10: ESTRUTURA QUÍMICA DA PARTE ISOPRÊNICA DA BORRACHA NATURAL. SÃO APROXIMADAMENTE 3 UNIDADES TRANS ISOPRÊNICAS (PARTE CRISTALINA), 10.000 UNIDADES CIS ISOPRÊNICAS (PARTE AMORFA, TIPO CABEÇA-CAUDA) E UM GRUPO A TERMINAL <sup>137</sup> .....	43
FIGURA 11: ESTRUTURA MOLECULAR DO POLI(P-FENILENO VINILENO)-PPV <sup>155</sup> .....	47
FIGURA 12: ESTRUTURA MOLECULAR DO POLI (2,5-DIMETOXI-PARA FENILENO VINILENO)-MEH-PPV <sup>121</sup> .....	47
FIGURA 13: MECANISMO DE FOTOOXIDAÇÃO DO PPV PROPOSTO POR CUMPSTON ET AL EM 1997 <sup>160</sup> .....	49
FIGURA 14: O FLUXOGRAMA ACIMA ILUSTRA O RACIOCÍNIO ABORDADO PARA CONFECÇÃO DAS MEMBRANAS LUMINESCENTES A PARTIR DE POLÍMEROS CONJUGADOS. ....	51
FIGURA 15: O FLUXOGRAMA ACIMA ILUSTRA RACIOCÍNIO ABORDADO PARA CONFECÇÃO DESSES SISTEMAS LUMINESCENTES BIOCOMPATÍVEIS, A PARTIR DA INCORPORAÇÃO DA BORRACHA NATURAL, PARA IMPLEMENTAÇÃO EM FOTOTERAPIA.....	52
FIGURA 16: MÉTODO SANGRIA PARA COLETA DE LÁTEX. ....	53
FIGURA 17: (A) CADA LÂMINA COTEM 2 ML DE LÁTEX DEPOSITADO E (B) LÂMINAS COM LÁTEX SECO APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO PARA OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE MATRIZ POLIMÉRICA DE BORRACHA NATURAL. ....	54
FIGURA 18: SOLUÇÃO LUMINESCENTE DE BN/MEH-PPV EM TOLUENO SOB LUZ AMBIENTE. ...	56

FIGURA 19: MEMBRANA LUMINESCENTE ULTRAFINA OBTIDA A PARTIR DA SOLUÇÃO LUMINESCENTE DE BN/MEH-PPV SOB LUZ AMBIENTE.....	56
FIGURA 20: ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS SOLUÇÕES DE BN (20 G/L), MEH-PPV (2,5 MG/L) E BN/MEH-PPV (1: 400 M/M) . .....	57
FIGURA 21: (A) MEMBRANA DE BORRACHA NATURAL E (B) MEMBRANA LUMINESCENTE DE BN/MEH-PPV. AMBAS SOB LUZ AMBIENTE. ....	58
FIGURA 22: ESPECTRO DE EMISSÃO DO LED AZUL UTILIZADO PARA EXCITAÇÃO DAS MEMBRANAS LUMINESCENTES BIOCMPATÍVEIS DE BN/MEH-PPV. ....	60
FIGURA 23: SISTEMA ADAPTADO PARA INVESTIGAÇÃO DA LUMINESCÊNCIAS DAS MEMBRANAS DE BN/MEH-PPV EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE (AZUL). ....	61
FIGURA 24: MODELO PARA CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE CROMATICIDADE <sup>173</sup> . ....	62
FIGURA 25: ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MEMBRANAS DE BN E MEH-PPV/BN. ....	67
FIGURA 26: (A) IMAGEM DA MEMBRANA DE BN OBTIDA SOB RADIAÇÃO UV E (B) ESPECTROS DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO DA MEMBRANA DE BN OBTIDOS POR FLUORESCÊNCIA. ....	68
FIGURA 27: ESPECTRO DE EMISSÃO DA SOLUÇÃO DE MEH-PPV 2,5 (MG/L) OBTIDO POR FLUORESCÊNCIA. ....	70
FIGURA 28: (A) IMAGEM DA MEMBRANA DE MEH-PPV/BN OBTIDA SOB RADIAÇÃO AZUL-460NM E (B) ESPECTROS DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO DA MEMBRANA LUMINESCENTE DE MEH-PPV/BN OBTIDOS POR FLUORESCÊNCIA. ....	71
FIGURA 29: ESPECTROS DE EMISSÃO DA MEMBRANA LUMINESCENTE DE MEH-PPV/BN OBTIDOS POR FLUORESCÊNCIA COM DIFERENTES CAMADAS DE MATERIAL LUMINESCENTE. LEGENDA: C (CAMADA). ....	72
FIGURA 30: IMAGEM OBTIDA DAS MEMBRANAS DE BN E MEH-PPV/BN SOB EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO FOTOTERÁPICO PARA ICTERÍCIA NEONATAL. ....	73
FIGURA 31: EFEITO DA LUZ AZUL (40 $\mu$ W/CM <sup>2</sup> , 460 NM) POR TEMPO DE EXPOSIÇÃO (TE = 24 H) SOBRE A MEMBRANA DO MEH-PPV/BN. ....	73
FIGURA 32: VISÃO TRIDIMENSIONAL DOS ESPECTROS DE PL PARA O EFEITO DA RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE (LUZ AZUL) SOBRE A MEMBRANA DE MEHPPV/BN. ....	74
FIGURA 33: (A) GRÁFICO DO COMPORTAMENTO DE INTENSIDADE E (B) E DO COMPRIMENTO DE ONDA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À LUZ AZUL POR 24 H. ....	75
FIGURA 34: DIAGRAMA DE CROMATICIDADE CIE (1931) REPRESENTANDO AS MUDANÇAS DE COR EMISSÃO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO À LUZ AZUL. O DIAGRAMA FOI OBTIDO USANDO OS ESPECTROS DE PL MOSTRADOS NA FIGURA 31. E O RADIANT IMAGING COLOR CALCULATOR SOFTWARE LIVRE. NOTA: TEMPO DE EXPOSIÇÃO (T <sub>E</sub> ), TEMPO INICIAL (T <sub>I</sub> ), HORA FINAL (T <sub>F</sub> ). ....	77
FIGURA 35: IMAGEM DA MEMBRANA LUMINESCENTE SOB LUZ AMBIENTE, OBTIDA EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO FOTOTERÁPICO COM LUZ AZUL.....	78
FIGURA 36: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA AS MEMBRANAS DE BN, MEH-PPV E MEHPPV/BN DURANTE EXPOSIÇÃO À LUZ AZUL (40 $\mu$ W / CM <sup>2</sup> , 460 NM) EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO 0, 12 E 24 H. ....	79

FIGURA 37: IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA MEMBRANA DE (A) BN E (B) MEH-PPV/BN, USANDO LASER $\lambda = 640$ NM. O DIÂMETRO DO PONTO ILUMINADO FOI DE 0,25 MICRÔMETROS. ....	81
FIGURA 38: IMAGEM DA MEMBRANA DE BORRACHA NATURAL TRATADA A 60°C. AUMENTO DE 5000 VEZES.....	82
FIGURA 39: IMAGEM DA MEMBRANA DE BORRACHA NATURAL TRATADA A 60°C. AUMENTO DE 10000 VEZES.....	83
FIGURA 40: IMAGEM DA MEMBRANA DE BORRACHA NATURAL TRATADA A 60°C. AUMENTO DE 15000 VEZES.....	83
FIGURA 41: IMAGEM DA MEMBRANA LUMINESCENTE DE MEH-PPV/BN. AUMENTO DE 15000 VEZES. ....	84
FIGURA 42: IMAGEM DA MEMBRANA LUMINESCENTE DE MEH-PPV/BN. AUMENTO DE 10000 VEZES. ....	84
FIGURA 43: IMAGEM DA MEMBRANA LUMINESCENTE DE MEH-PPV/BN. AUMENTO DE 15000 VEZES. ....	85
FIGURA 44: IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA (A) A MEMBRANA DE BORRACHA NATURAL (B) E A MEMBRANA MEH-PPV /BN COM TEMPO DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IGUAL A ZERO.....	86
FIGURA 45: VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CHO-K1 EXPOSTAS A DIFERENTES EXTRATOS OU APENAS AO MEIO DE CULTURA (NC) POR 24 HORAS, QUANTIFICADO PELO ENSAIO DE MTT. AS BARRAS HORIZONTAIS REPRESENTAM AS MÉDIAS E LINHAS VERTICAIS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO. ....	87
FIGURA 46: EXTENSÃO DO HALO FORMADO ENTRE AS CÉLULAS CHO - K1 E OS FRAGMENTOS (C1BDG) APÓS EXPOSIÇÃO DE 24 HORAS. AS BARRAS HORIZONTAIS REPRESENTAM A MÉDIA E A LINHA VERTICAL O DESVIO PADRÃO. *: INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO CONTROLE NEGATIVO (NC) ( $p \leq 0,05$ ). ....	88
FIGURA 47: DEMONSTRAÇÃO ILUSTRATIVA DO DESEMPENHO DO SENSOR BIOCAMPATÍVEL LUMINESCENTE EM FOTOTERAPIA JUNTO AO RECÉM-NASCIDO.....	94



## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DA HIPERBILIRRUBINEMIA DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE BILIRRUBINA E OCORRÊNCIAS RESPECTIVAMENTE. ....	27
TABELA 2: CLASSIFICAÇÃO DE POLÍMEROS <sup>125</sup> . ....	39
TABELA 3: RELAÇÃO ENTRE OS COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO. ....	69
TABELA 4: RELAÇÃO ENTRE OS MODOS VIBRACIONAIS E SUAS RESPECTIVAS ATRIBUIÇÕES. ....	80
<b>TABELA 5:</b> VALORES EM CM DO TAMANHO DOS HALOS ENCONTRADOS ENTRE AS CÉLULAS E AS MEMBRANAS TESTADAS E A CLASSIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CORRESPONDENTE BASEADA NA ISO 10993/2009. ....	90
TABELA 6: RESULTADO DAS OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS DAS CÉLULAS EM TODAS AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, BASEANDO NA CLASSIFICAÇÃO DE GRAU DE CITOTOXICIDADE DA ISO 10993/2009. ....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAP - Associação Americana de Pediatria

ABS - Absorção

BI - Bilirrubina Indireta

DMM -Distribuição de Massa Molar

FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier / (Fourier Transform Infrared).

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital* - Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

$I(\lambda_{\max})$  - Intensidade no comprimento de onda de maior intensidade de absorção e/ou luminescência

LED - *Light Emitting Diode* - Diodo Emissor de Luz

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*- Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

$(\bar{M}_n)$  - Massa Molar Numérica Média

$(\bar{M}_w)$  - Massa Molar Viscosimétrica Média

$(\bar{M}_z)$  - Massa Molar Ponderal Média

HB - Hiperbilirrubinemia

MEH-PPV - Poli(2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)*p*-fenilenovinileno)

PL - *Photoluminescence* - Fotoluminescência

PPV - *p*-fenilenovinileno

Q = Polidispersividade ou polidispersão

RN - Recém Nascido

UV - Ultravioleta

$\lambda_{\max}$  - comprimento de onda de maior intensidade de absorção e/ou luminescência

$\pi, \sigma$  - Orbitais moleculares ligantes.

$\pi^*, \sigma^*$  - Orbitais moleculares anti-ligantes.

$\pi-\pi^*, \sigma-\sigma^*$  - Transições entre orbitais moleculares

$\beta$  - Deformação fora do plano,

$\nu_a$  - Estiramento da ligação antissimétrica

$\nu_s$  - Estiramento da ligação simétrica.

$t_e$  - Tempo de exposição à radiação

## 1. INTRODUÇÃO

As vantagens dos dispositivos ópticos em ciências da vida são amplamente exploradas, especialmente para diagnósticos médicos e monitoramento de tratamentos.<sup>1-3</sup> Em particular, os dosímetros de radiação estão transformando e revolucionando os cuidados com a saúde<sup>4</sup> porque permitem análises qualitativas e quantitativas simultâneas. Além disso, a maioria dos dispositivos sensíveis à luz é baseada em pontos quânticos contendo cádmio ou materiais orgânicos incorporados em matrizes de polímeros sintéticos, que não são tecnologias que garantem sanidade recomendada para o ser humano e organismos vivos. No entanto, a comunidade científica têm dedicado muita atenção ao desenvolvimento de dispositivos ópticos biocompatíveis<sup>5</sup>, a fim de eliminar os riscos associados ao uso desses tipos de dispositivos e prover uma tecnologia mais segura.

Neste contexto, alguns polímeros conjugados têm sido de grande interesse para aplicações médicas devido às suas capacidades biomédicas e sua biocompatibilidade.<sup>6</sup> Esses polímeros apresentam interações versáteis entre as células e materiais flexíveis processáveis que promovem a adesão celular.<sup>7</sup> Em particular, poli (2-metoxi-5 (2'-etil) hexiloxifenileno vinileno) (MEH-PPV) é um polímero conjugado luminescente usado em diodos emissores de luz (LEDs)<sup>8</sup>, transistores de efeito de campo<sup>9</sup> e dispositivos fotovoltaicos.<sup>10</sup> Além disso, embora as aplicações em campos biológicos ainda sejam escassas, alguns relatos científicos demonstram que nanopartículas de MEH-PPV poderiam ser usadas para imageamento celular<sup>15-18</sup> e para a estimulação elétrica de células neurais.<sup>7</sup>

Neste cenário biomédico, Ferreira et al. (2017) propuseram o uso de filmes MEH-PPV como possíveis dosímetros colorimétricos para o monitoramento da fototerapia neonatal.<sup>4</sup> Essa terapia fotodinâmica é a principal forma de tratamento da icterícia<sup>19</sup> e consiste em expor os recém-nascidos à luz azul.<sup>20</sup> A luz favorece a excreção da bilirrubina através da fotoisomerização, que altera a estrutura da bilirrubina em uma forma solúvel.<sup>21</sup> Entretanto, evidências mostram que muitos recém-nascidos ainda estão expostos a doses de fototerapia sub terapêuticas devido a várias razões, como: número insuficiente de lâmpadas por aparelho, lâmpadas fluorescentes de baixa qualidade e posicionamento da fonte de luz longe do paciente.<sup>22</sup> Consequentemente, a hiperbilirrubinemia, quando não tratada de maneira eficaz, pode levar a sérios problemas de saúde, incluindo o risco de neurotoxicidade, autismo, surdez,

cegueira, *kernicterus* e morte.<sup>23</sup> Portanto, é essencial desenvolver dispositivos médicos utilizando materiais não tóxicos, fotoativos, flexíveis e biocompatíveis.<sup>24,25</sup>

Diante da necessidade de se desenvolver dispositivos biocompatíveis, o uso da matriz polimérica de Borracha natural, extraído do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, tem se destacando no setor de saúde desde a década de 1990<sup>26</sup> e se mostrado bastante promissora para vários tipos de aplicações médicas, como regeneração tecidual<sup>26</sup>, atividade angiogênica<sup>27</sup>, cicatrização conjuntival e neoangiogênese<sup>28</sup>, baixa antigenicidade<sup>29-31</sup>, aceleração da neoformação óssea e cicatrização.<sup>31</sup> Além disso, o interesse científico em polímeros naturais é estimulado não apenas por suas propriedades térmicas e mecânicas únicas, mas também por seu fácil acesso, relativo baixo custo e por ser extraída de fontes renováveis o que contribui assim com a sustentabilidade de nosso planeta.<sup>32-35</sup>

Portanto, este trabalho descreve a produção e caracterização de membranas biocompatíveis luminescentes de MEH-PPV/BN com potencial aplicação em dosímetros colorimétricos para monitoramento de fototerapia neonatal. O desempenho óptico do MEH-PPV/BN foi investigado usando as mesmas condições para o tratamento da icterícia neonatal sob irradiação de luz azul. Além disso, estudos iniciais do potencial citotóxico dessas membranas foram realizados uma vez que o tratamento da icterícia requer o uso de um dispositivo biomédico seguro que possa entrar em contato direto com a pele dos recém-nascidos.

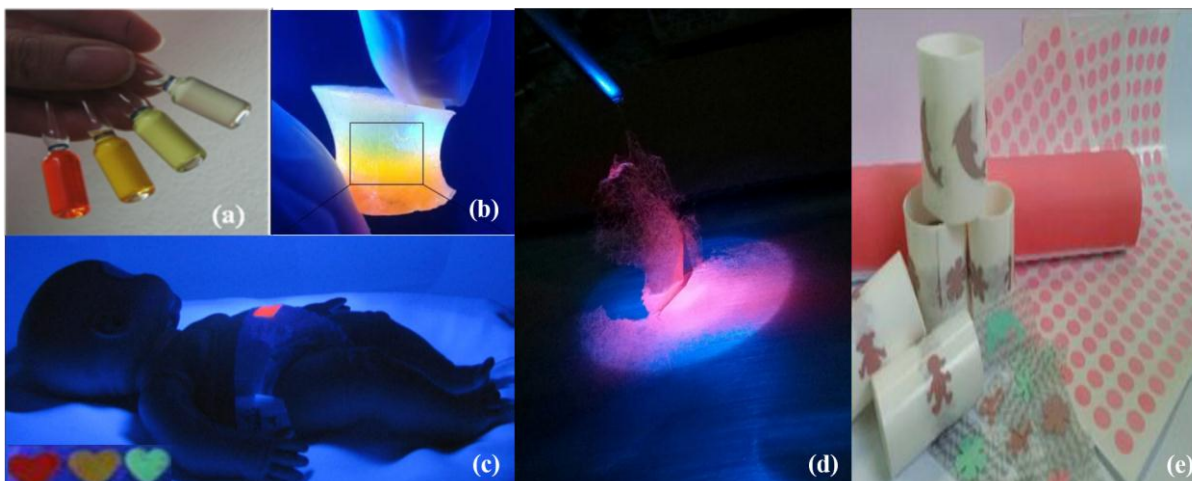
## 1.1 Motivação

A hiperbilirrubinemia ou icterícia é uma das patologias neonatais que têm recebido grande atenção nos últimos anos<sup>23</sup>, ocorrendo em *ca.* 80% dos recém-nascidos (RN)<sup>20</sup>. Esta doença é encontrada praticamente em todos os neonatos pré-termo de muito baixo peso e pode apresentar-se clinicamente como uma coloração amarelada da pele, escleróticas e membranas mucosas consequentes da deposição do pigmento biliar nesses locais. Por sua vez, ela está intimamente relacionada à maturidade funcional hepática<sup>36-39</sup>. Por ausência desta maturidade a capacidade de excretar metabólitos endogenamente formados como a bilirrubina é alterada<sup>36-39</sup>. A hiperbilirrubinemia quando não tratada de maneira efetiva pode conduzir a um estado grave com risco de neurotoxicidade, autismo, surdez, cegueira, *kernicterus* e óbito<sup>23</sup>.

A principal forma de tratamento da icterícia é a fototerapia<sup>40</sup>, que consiste em expor o

recém-nascido a luz azul, sob uma irradiância de  $40 \mu\text{w}/\text{cm}^2/\text{nm}$ <sup>22</sup>. A luz favorece a excreção de bilirrubina através da foto isomerização, que altera a estrutura da bilirrubina para uma forma solúvel, lumirrubina, para uma excreção mais fácil<sup>40</sup>. Porém, evidências mostram que inúmeros recém-nascidos ainda são submetidos a doses sub terapêuticas de fototerapia, devido a diversos motivos como número insuficiente de lâmpadas por aparelho, aparelhos com algumas lâmpadas queimadas, lâmpadas fluorescentes (baixa qualidade) e o posicionamento da fototerapia distante do paciente<sup>22,23</sup>. Também neste contexto, é válido ressaltar ainda que a carência de produtos para controle e intervenção positiva no tratamento fototerápico é uma constatação constante na literatura médica<sup>41-43</sup>. Ao mesmo tempo, alguns autores afirmam que "um único caso de kernicterus já é um caso excessivo"<sup>44</sup>, pois a maior parte dos recém-nascidos que desenvolvem *kernicterus* seriam completamente saudáveis se tivessem passado por um tratamento fototerápico intensivo e eficiente<sup>45</sup>. Outrossim, as taxas de morbidade e mortalidade infantil recorrentes da icterícia ainda são muito altas. Por tanto, após este relato, não restam dúvidas quanto ao interesse científico e tecnológico para o desenvolvimento de soluções inéditas, complementares, de fácil manuseio e de custos acessíveis que garantam a eficácia do tratamento fototerápico da icterícia neonatal em RN's. Igualmente, reduzir essas taxas e permitir que recém-nascidos icterícios sejam tratados corretamente é uma necessidade médica mundial.

Bianchi *et al*, no Laboratório de Polímeros e Propriedades Eletrônicas de Materiais, LAPPEM - UFOP desenvolveu e patenteou dosímetros de radiação azul com aplicação em fototerapia neonatal, e de Raios X para aplicação em aceleradores nucleares utilizados no tratamento de câncer. Esses dispositivos apresentam como princípio de funcionamento a mudança de tonalidade da coloração de filmes, fibras (tecido) ou solução de poli[2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)parafenilenovinileno]-MEH-PPV, bem como da intensidade de fotoluminescência. Além de apresentarem vantagens, como fácil leitura e baixo custo, são inéditos na literatura<sup>4,11-14,46-47</sup>. A título de ilustração a Figura 1 mostra fotografias de sistemas luminescentes dosimétricos em forma de solução, filme, fibra e gel em desenvolvimento produzidos no LAPPEM. No entanto, apesar da extensa aplicabilidade e suas vantagens apresentadas, não se tem conhecimento do uso de polímeros naturais para fabricação desses sensores de radiação.



**Figura 1:** Exemplo de dosímetros desenvolvidos a partir de polímeros conjugados, (a) em solução<sup>199</sup>, (b) Gel 3D<sup>200</sup>, (c) Filme (2D)<sup>201</sup>, (d) fibras (1D)<sup>202</sup> e (e) adesivos para uso junto a fralda - produção em escala industrial (*Startup Lifee*).

Neste cenário, a incorporação da matriz polimérica de Borracha Natural, também, conhecido como cis-1,4-poli(isopreno)<sup>48</sup>, como um possível substrato para apoiar materiais com propriedades fotoluminescentes tem atraído grande interesse da comunidade científica não apenas por suas propriedades térmicas e mecânicas únicas, mas também pelo seu fácil acesso, baixo custo e porque são obtidos de fontes renováveis<sup>49-51</sup>. Ademais é de extrema relevância científica o controle dos processos de degradação e das propriedades óptico-eletrônicas desses sistemas em diferentes matrizes<sup>35</sup>.

Destaca-se também que Job *et al*, no Laboratório de Tecnologia de Borracha e Aplicações – LTBA/UNESP, diversifica a aplicabilidade da borracha natural tornando-a parte ativa no desenvolvimento de sensores de pressão com negro de fumo<sup>52</sup>, nanocompósitos com materiais cerâmicos<sup>53-54</sup>, síntese química limpa de nanopartículas de ouro e prata<sup>55</sup>, detector efeito SERS e SERRS<sup>56-56</sup>, fisiologia de *Leishmania brasiliensis*<sup>58</sup>, estudos de orientação foto induzidas<sup>58</sup>, propriedades de fotoluminescência de membranas de borracha natural com incorporação de nanopartículas de ouro<sup>60</sup>. Portanto, não restam dúvidas quanto a versatilidade da matriz polimérica de BN e sua potencial contribuição para a confecção de dispositivos médicos hospitalares, particularmente para sensores de radiação. Além disso, o desenvolvimento desse trabalho ainda permitiu a integração de pesquisadores das mais diversas áreas, inseridos em grupos de pesquisas que vislumbram aplicações tecnológicas e iniciativas empreendedoras, como é o caso LTBA/UNESP e do LAPPEM/UFOP.

Em resumo, o desenvolvimento deste trabalho sobre a avaliação da atuação da matriz polimérica de Borracha Natural nas propriedades ópticas, estruturais morfológicas, térmicas e citotóxicas das membranas luminescente de MEH-PPV/BN teve enfoque multidisciplinar e foi engajado num tema atraente e promissor.

## **1.2 Objetivo**

O objetivo central deste trabalho foi o desenvolvimento de um novo dosímetro de radiação vestível biocompatível com potencial aplicação para promover o monitoramento da fototerapia neonatal de recém-nascidos ictericos de forma eficiente e inovadora na área médico-hospitalar.

## **1.3 Estrutura da tese**

Para atingir o objetivo citado no item 1.2, membranas luminescentes biocompatíveis de MEH-PPV/BN foram fabricadas e caracterizadas. Para tanto, o MEH-PPV foi usado como material ativo por ser um elemento fotossensível importante na confecção de sensores de radiação orgânico. Já a matriz polimérica de BN, por sua vez, foi usado, por ser um material translúcido, obtido de fontes renováveis e por ser uma matéria-prima com potencial biocompatibilidade com seres vivos. Neste contexto, essa tese foi dividida em 5 partes. A revisão da literatura apresenta-se no *Capítulo 2*, no qual aborda noções históricas e estatísticas, os principais conceitos envolvidos em dispositivos médicos biocompatíveis bem como as características dos polímeros utilizados. Em seguida, no *Capítulo 3*, são apresentados os métodos e os procedimentos experimentais além de descrever os equipamentos utilizados na caracterização dos materiais utilizados nesse trabalho. No *Capítulo 4*, por sua vez, são apresentados os resultados obtidos, analisados e discutidos e a conclusão do trabalho foi apresentada no *Capítulo 5*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hiperbilirrubinemia neonatal no contexto global

Mundialmente, todo ano 24 milhões de recém-nascidos desenvolvem icterícia<sup>61</sup>, 120.000 bebês ainda morrem e muitos mais sofrem danos neurológicos permanentes (*kernicterus*)<sup>62</sup>. Ademais, 84 - 112 milhões dos 140 milhões de bebês nascidos irão desenvolver esta condição nas primeiras 2 semanas de vida<sup>63,64</sup>. Esta condição, também chamada de hiperbilirrubinemia neonatal, foi responsável por 1309 mortes por 100.000 nascidos vivos em 2016 e ficou em sétimo lugar no ranking mundial entre todas as causas de mortes neonatais na primeira semana de vida<sup>65,66</sup>. A grande maioria dessas mortes ocorre em países de baixa renda da África Subsaariana e do Sul da Ásia<sup>66-67</sup>. Dentre todas as complicações, o *kernicterus* é a mais grave provocando um quadro de sequelas irreversíveis como epilepsia, distúrbios do movimento (atetose, distonia e coeroatetose), surdez neurossensorial, distúrbios visuais, displasia dentária, autismo, deficiência intelectual e paralisia cerebral<sup>68</sup>. E, em 70 % dos casos leva o recém-nascido ao óbito<sup>68</sup>. Esta síndrome neurológica chamada *Kernicterus* se desencadeia quando os valores elevados de bilirrubina ultrapassam a barreira hematoencefálica no sistema nervoso central<sup>69</sup>. Portanto, é de extrema importância o controle dos níveis de bilirrubina no neonato. Apesar da fototerapia ter se mostrado uma técnica terapêutica eficaz desde 1958<sup>70</sup>, segundo a Escola de Medicina da Universidade de Standford – EUA, apenas na África e na Ásia cerca de 6 milhões de recém-nascidos ictéricos por ano nem sequer recebem fototerapia<sup>71</sup>. Não tão distante assim, no Brasil, estima-se que a porcentagem de recém-nascidos que necessitam de fototerapia, mas que não têm acesso a esse tratamento está na faixa de 0 - 1,4% dos nascimentos<sup>71</sup>. Dados do DATASUS mostraram que em 2011 foram registradas aproximadamente 200 mortes por hiperbilirrubinemia e 50 por *kernicterus*, ocorridos principalmente na primeira semana de vida dos recém-nascido<sup>72</sup>. Tal situação se mostra presente também em países desenvolvidos da América do Norte e Europa. A incidência de *kernicterus* bem como de hiperbilirrubinemia severa ainda continuam ocorrendo em países como Dinamarca, Reino Unido, Canadá e Suíça mesmo com os diversos alertas sobre a importância da prevenção do *kernicterus*<sup>73-75</sup>. Outros relatos foram registrados em Bagdá, no Iraque, onde 12% dos neonatos que apresentaram hiperbilirrubinemia severa morreram e 21% apresentaram sequelas neurológicas graves. Situações tão graves como estas também ocorreram em países como a Nigéria, Oman e Turquia<sup>77</sup>.



Dados hospitalares coletados de unidades neonatais na Inglaterra, mostram que a icterícia grave é uma causa de internação na primeira semana de vida e representa até 35% das readmissões hospitalares no primeiro mês de vida<sup>78-80</sup>. Ademais, a incidência de *kernicterus* varia de cerca de 0,2 a 2,7 casos por 100.000 nascidos vivos<sup>65</sup>. Portanto, diante deste cenário e considerando que os danos neurológicos ocasionados pela hiperbilirrubinemia neonatal são 100% preveníveis<sup>66</sup>, pode-se sugerir que um único caso de *kernicterus* esteja vinculado a alguma negligência médica.

Ainda dentro do contexto da negligência médica, em 1999, o Instituto de Medicina dos EUA estimou que erros médicos evitáveis contribuíram para até 98000 mortes todos os anos em hospitais dos EUA. Constatou-se que os erros hospitalares eram a oitava principal causa de morte em todo o país e preocupações com responsabilidade legal desencorajavam a equipe de saúde a relatar erros<sup>78</sup>. Não tão distante, o Serviço Nacional de Saúde do Reino Unido gastou £ 1,8 bilhões em reclamações entre os anos de 2017-2018 por negligência e o custo anual dobrou desde 2010. O total do passivo estimado para 2017-18 - o custo que o mesmo enfrentará se todas as reclamações contra ele foram bem-sucedidas - é de £ 651 bilhões, acima da estimativa de 2015-16 de £ 56,4 bilhões. A título de curiosidade, em maio de 2018, uma menina de nove anos recebeu um acordo com o Serviço Nacional de Saúde do Reino Unido que pode chegar a mais de £ 19 milhões (US \$ 25 milhões) depois que ela nasceu com icterícia severa, resultando em lesão cerebral<sup>78</sup>.

Diante dos dados supracitados não restam dúvidas que devam ser priorizados intervenções médico-hospitalares orientadas para reduzir a incidência dos danos neurológicos advindos da icterícia neonatal, para que possa assim garantir além de um tratamento eficaz, a sobrevida e o bem estar de muitos recém nascidos.

***“Errar é humano, encobrir é imperdoável e não aprender é indesculpável.”***

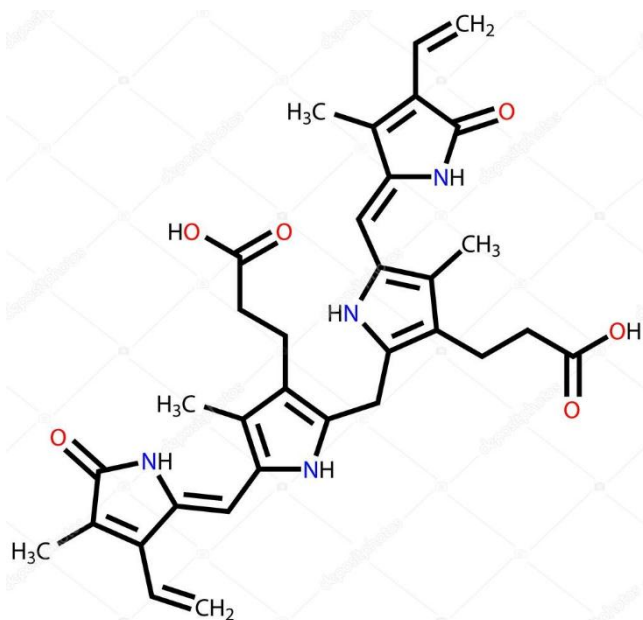
Conferência sobre segurança do paciente

Médico Liam Donaldson (2004)

## 2.2 Hiperbilirrubinemia neonatal versus tratamento

A ONU propõe Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) para a sobrevivência, bem-estar próspero a longo prazo de todos os recém-nascidos, o que tem estimulado um crescente interesse global em icterícia neonatal como uma importante condição de saúde<sup>65</sup>. Cerca de 80 % dos recém-nascidos pré-termos (< 37 semanas) e 60 % dos casos termo (entre 37 e 42 semanas) desenvolvem hiperbilirrubinemia em sua primeira semana de vida e infelizmente 10 % dos bebês amamentados ainda estão icterícos com 1 mês de idade. Neste contexto, a diferenciação rápida entre icterícia fisiológica e aqueles com causas patológicas é importante para detectar a doença subjacente e prevenir sequelas adversas, como a encefalopatia e o *kernicterus* bilirrubínicos<sup>82</sup>.

Portanto a etapa de diferenciação da Hiperbilirrubinemia leva em consideração a concentração sérica de bilirrubina indireta (BI) maior que 1,5 mg/dL ou de bilirrubina direta (BD) maior que 1,5 mg/dL, desde que esta represente mais que 10 % do valor de bilirrubina total (BT)<sup>83</sup>. A etiologia desta patologia é na maioria das vezes multifatorial, e o tratamento dependerá do tipo (fisiológica ou patológica) e da intensidade da icterícia (níveis da neurotoxina)<sup>83,84</sup>. Portanto, somente após o estudo da história (materna, do recém-nascido e da amamentação), do exame físico e da coleta do sangue do recém-nascido respectivamente é que se determina o tipo e a intensidade da hiperbilirrubinemia<sup>22</sup>. Na figura 2 está representado a fórmula estrutural da molécula de bilirrubina.



**Figura 2:** Fórmula estrutural da molécula de bilirrubina<sup>4</sup>.

A icterícia fisiológica é o tipo mais predominante de icterícia em neonatos e geralmente desaparece entre o quinto e sétimo dia de vida, sem morbidades associadas<sup>86,85</sup>. Caracteriza-se por nível de BT sérica que aumenta após o nascimento, atinge seu pico médio ao redor de 6 mg/dL no 3º dia de vida (com um valor máximo que não ultrapassa 12,9 mg/dL) e então declina em uma semana<sup>83</sup>. Na prática, 98 % dos RNs apresentam níveis séricos de BI acima de 1 mg/dL durante a primeira semana de vida, o que, na maioria das vezes, reflete a adaptação neonatal ao metabolismo da bilirrubina<sup>78-85</sup>. Já a icterícia patológica, geralmente, está associada a uma desordem subjacente e é caracterizada pelo aumento da fração direta não conjugada da bilirrubina nas primeiras 24 horas de vida do recém-nascido<sup>86,85</sup> com valores de BT > 12 mg/dL<sup>78</sup>. A tabela 1 mostra a classificação da hiperbilirrubinemia de acordo com os níveis de bilirrubina.

**Tabela 1:** Classificação da hiperbilirrubinemia de acordo com os níveis de bilirrubina e ocorrências respectivamente<sup>83</sup>. Fonte: Ministério da Saúde.

<b>Classificação da Hiperbilirrubinemia</b>	<b>Níveis de bilirrubina</b>	<b>Ocorrência</b>
<b>Significante</b>	BT sérica > 15 – 17 mg/dL	1 a 8 % dos nascidos vivos
<b>Grave</b>	BT > 25 mg/dL	1 (um) caso em 500 a 5.000 nascidos vivos
<b>Extrema</b>	BT > 30 mg/dL	1 (um) caso em 15.000 nascidos vivos

De posse dessas informações é possível propor a melhor e eficaz forma de tratamento. Dentre as principais propostas incluem Exanguineotransfusão, administração de fármacos e a fototerapia.

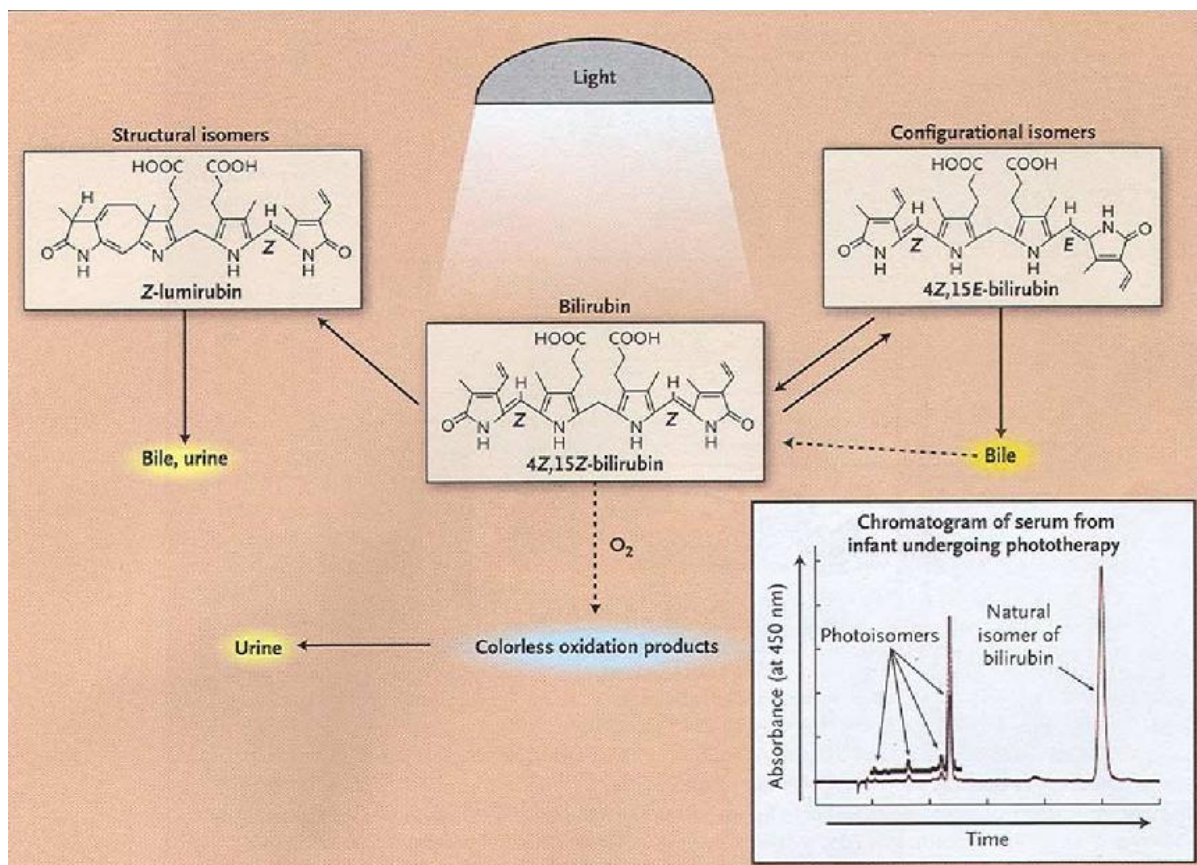
Exanguineotransfusão consiste em remover o sangue do bebê e substituí-lo por outro, de um doador compatível<sup>22</sup>. Este procedimento médico tem como objetivo principal remover o excesso de bilirrubina, prevenindo, desta maneira, seus efeitos tóxicos. Apesar de ser um procedimento relativamente seguro, em mãos experientes, a mortalidade gira em torno de 1 % e há elevado índice de morbidade, que inclui complicações metabólicas, hemodinâmicas, infecciosas, vasculares, hematológicas, além das reações pós-transfusional e enxerto-hospedeiro<sup>78</sup>. Dentre as complicações da exsanguineotransfusão incluem, o tromboembolismo, enterite necrosante, perfuração vascular, hemorragias, distúrbios eletrolíticos, metabólicos e ácidos-básicos e infecção<sup>22</sup>. Portanto, esse tipo de procedimento deve ser

indicado com precisão e praticado exclusivamente por equipe habilitada em cuidados intensivos neonatais somente quando necessário.

O tratamento farmacológico consiste em administrar drogas adjuvantes, tais como metalo-porfirinas inibidoras da heme-oxigenase, fenobarbital e imunoglobulina endovenosa. *Valaes et al* considera que o uso de fenobarbital em gestantes reduz consideravelmente os níveis de bilirrubina nos recém-nascidos desde que a gestante tome um comprimido de 100 mg pelo menos durante dez dias pois a administração de doses menores a gestantes não se mostrou eficaz em reduzir o grau de icterícia em recém-nascidos. Entretanto, a droga pode causar dependência na mãe e sedação excessiva no recém-nascido<sup>86</sup>. Neste sentido, a administração destes fármacos no período pré-natal de fenobarbital deve ser reservada somente aos chamados grupos de risco<sup>87</sup>. Além do mais, a administração de fenobarbital a recém-nascidos imediatamente após o parto ou quando a icterícia é clinicamente visível não é eficaz em reduzir os níveis séricos de bilirrubina<sup>88</sup>. Com relação aos inibidores da heme oxigenase, como por exemplo a metalo-protoporfirina, *Valaes et al*, em seus estudos demonstrou que a droga administrada nas primeiras 24 horas de vida, reduziu significativamente o nível sérico máximo de bilirrubina e a necessidade de fototerapia<sup>89,90</sup>. A administração de gamaglobulina endovenosa é indicada quando a concentração sérica de bilirrubina continua subindo apesar do uso de fototerapia intensa<sup>22</sup>. Entretanto, nem todos os recém-nascidos respondem bem uma vez que imunoglobulina não remove a bilirrubina sérica e seu uso deve ser associado à utilização concomitante de fototerapia eficaz<sup>22</sup>. Neste sentido, mais estudos controlados são necessários para avaliar a eficácia e efeitos colaterais destes fármacos antes que sejam incorporados definitivamente no arsenal terapêutico do pediatra.

Em 2018 comemorou-se o 60º aniversário da descoberta da fototerapia e desde a sua descoberta tal terapia fotodinâmica tem sido a mais utilizada por ser considerada simples, não invasiva e eficaz<sup>22</sup>. A fototerapia consiste na transformação fotoquímica da bilirrubina em produtos mais hidrossolúveis<sup>91,22,23</sup>. Ou seja, a energia luminosa altera a estrutura da molécula de bilirrubina e permite que os foto-produtos sejam eliminados pelos rins ou pelo fígado, sem sofrerem modificações metabólicas. Em uma linguagem química, a fototerapia funciona por meio de fótons que interagem com o isômero predominante da bilirrubina IX $\alpha$  (Z, Z) e modificam sua estrutura, convertendo-a em isômeros que possuem polaridade aumentada (foto isômeros) e que podem ser excretados na urina e bile sem necessidade de conjugação. Portanto, os produtos de bilirrubina produzidos após a fototerapia apresentam mecanismos

inadequados de conjugação em recém-nascidos acelerando assim a eliminação<sup>65</sup>. A título de ilustração, a Figura 3 mostra o mecanismo de transformação da molécula de bilirrubina em um composto solúvel em água.



**Figura 3:** Mecanismo de transformação da molécula de bilirrubina em um composto solúvel em água. Fonte: MAISELS, M. J. e MCDONAGH, A. F., 2008

Para se ter uma noção da relevância deste tratamento, tem-se que a fototerapia é necessária mesmo quando a exsanguineotransusão é indicada e é usada enquanto se aguarda a preparação do sangue para transfusão. O objetivo da intervenção é reduzir a concentração de bilirrubina circulante ou impedi-la de aumentar<sup>65,66</sup>. Por outro lado, há relatos na literatura médica, especialmente por Maisels et. al. da inexistência de um método/procedimento padronizado que viabiliza a efetividade do fototerapia<sup>23</sup>. Além do mais, há uma precariedade de um levantamento estatístico do número de neonatos que apresentam ou não icterícia e que, conseqüentemente, necessitam de tratamento ou apresentam sequelas graves ou levam ao óbito. Neste contexto, os fatos supracitados reforçam a necessidade de uma melhor compreensão das variáveis que influenciam a terapia fotodinâmica com luz azul sobre os níveis de bilirrubina e de como entregar a dose ideal ótima capaz de reduzir tais níveis<sup>41</sup>.

## 2.3 Sistemas de detecção e monitoramento para hiperbilirrubinemia neonatal

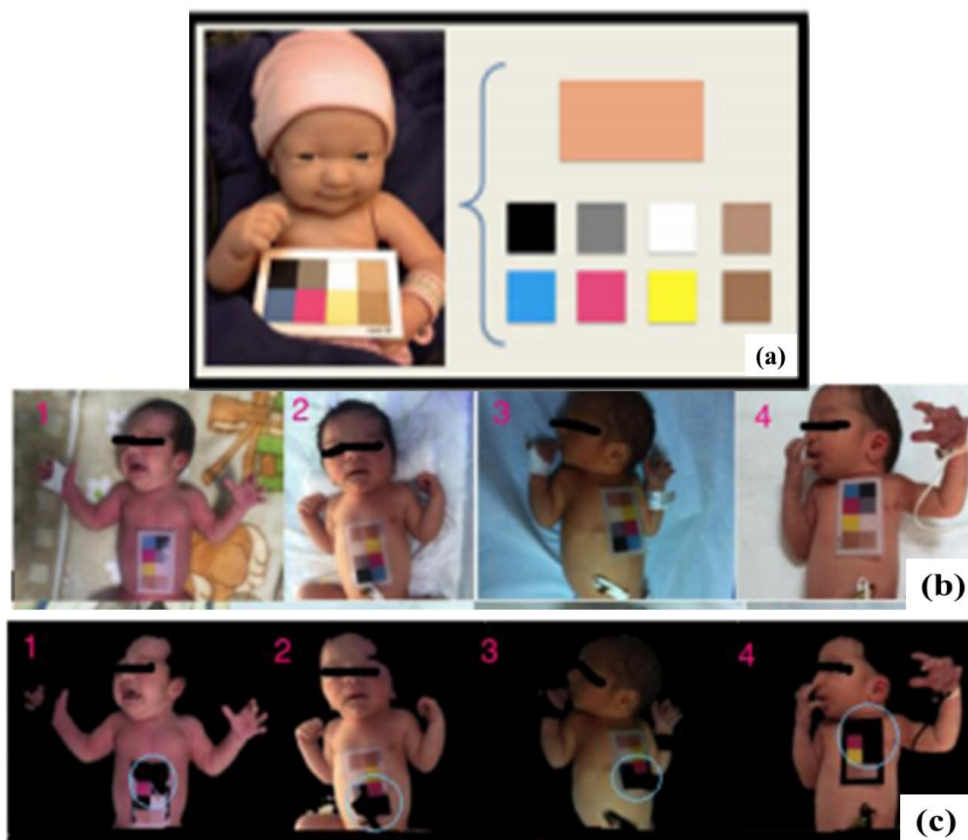
A primeira informação sobre icterícia neonatal foi escrita no livro “Ein Regiment der Kinder” por Metlinger em 1473<sup>92</sup>. Desde então vem sendo amplamente investigada afim de se obter métodos terapêuticos mais eficientes<sup>93</sup>. Em 2010, o Instituto Nacional de Saúde e Excelência Clínica do Reino Unido (NICE) publicou uma nova diretriz para avaliação e tratamento de icterícia neonatal. A diretriz, que foi desenvolvida pelo Centro Nacional de Colaboração para a Saúde da Mulher e da Criança, recomenda mudanças substanciais à prática atual em todo o Serviço Nacional de Saúde para bebês. Estima-se que a implementação desta diretriz para icterícia neonatal poderia impedir que alguns, se não todos, casos de *kernicterus* no Reino Unido cada ano<sup>82</sup>.

Sabe-se também que recursos insuficientes têm sido dedicados ao desenvolvimento de tecnologia econômica para atender às necessidades das pessoas mais pobres do mundo. Mesmo quando a tecnologia necessária existe, ela é frequentemente inacessível, seja porque é muito cara ou devido a restrições relacionadas à distribuição, fornecimento de energia ou recursos humanos<sup>94</sup>. Portanto, dentro deste contexto, há poucos estudos relacionados ao desenvolvimento de dispositivos capazes de monitorar o tratamento, especialmente, a fototerapia.

Apesar de escasso, destaca-se que há na literatura duas vertentes de estudos que direcionam o desenvolvimento de dispositivos que auxiliam no monitoramento tratamento da icterícia: processamento de imagens e dosimetria de radiação. O processamento de imagens consiste em transformar a imagem sucessivamente com o objetivo de extrair mais facilmente a informação nela presente. Já a dosimetria consiste em sinalizar de forma quantitativa e/ou qualitativa o acúmulo de dose de radiação. Em ambos o objetivo é o controle dos níveis de bilirrubina no recém-nascido.

Aydin et. al., desenvolveram um sistema não-invasivo de detecção de icterícia neonatal através de um softer de processamento de imagem que detecta o nível de bilirrubina por comparação estatística e similaridade com o banco de dados padrão de teste sanguíneo<sup>95</sup>. Basicamente o autor calibrou um cartão de 8 cores, dispôs o mesmo sobre o abdômen do bebê, capturou fotos do bebê com uma câmera padrão de celular na posição adequada e estes dados foram processados, como mostra a Figura 4, e por fim determinar e estimar o nível de

bilirrubina ideal no sangue do bebê<sup>95</sup>.



**Figura 4:** (a) Processo de segmentação usando o cartão de calibração de cor (b) imagens de entrada do sistema (c) resultados da segmentação de imagem. (Imagem adaptada de Aydin M (2016). Ref. 92).

A taxa de sucesso foi de 85%<sup>95</sup> entretanto é válido mencionar que eficiência do processamento artificial impõe sérias restrições ao tempo de resposta necessário a muitas aplicações<sup>96</sup>, bem como suporte técnico dos equipamentos e manutenção/atualização dos algoritmos que suportam os softwares. Outra restrição que não foi mencionada no presente trabalho foi o tipo/tonalidade da pele. Apesar de terem utilizado cálculo de normalização para viabilizar o processo de determinação a cor da pele, é válido ressaltar que segundo Vigioglia et.al. a coloração da pele depende de fatores que vão desde a condição do estrato córneo até a quantidade de pigmentos presentes<sup>97</sup>. As células epidérmicas e dérmicas fornecem um tom natural branco ou amarelo de acordo com sua espessura, enquanto os vasos sanguíneos contribuem com a coloração conforme o número, nível de dilatação, proximidade com a superfície da pele e grau de oxigenação, fornecendo um tom roxo a azulado devido à hemoglobina<sup>97</sup>. Os carotenóides da hipoderme também contribuem para determinar a cor, que

no entanto depende principalmente da melanina sintetizada<sup>97</sup>.

No que tange o desenvolvimento de dosímetros para aplicação direta à icterícia neonatal destaca-se os estudos realizados por Ferreira et.al. Neste caso foi proposto a construção de sensores de acúmulo de dose de radiação azul para avaliação, monitoramento e controle em tempo real da fototerapia através de polímeros conjugados. Estes quando submetidos a iluminação ambiente ou luz azul apresentam alterações nos espectros de absorção e luminescência correlacionadas as alterações em suas cores<sup>4, 98</sup>. O dispositivo, na forma de selo, flexível e descartável, altera sua luminescência do vermelho ao verde em função do tempo de exposição à radiação com fácil observação visual para uso por qualquer profissional da área de saúde, bem como de familiares dos neonatos<sup>4,98</sup>. Neste sentido, este sensor colorimétrico é mais vantajoso que o supracitado, uma vez que há uma facilidade de leitura do dispositivo sem qualquer conhecimento técnico e necessidade de manutenção, além da resposta ser em tempo real como sugere a imagem exposta na Figura 5.

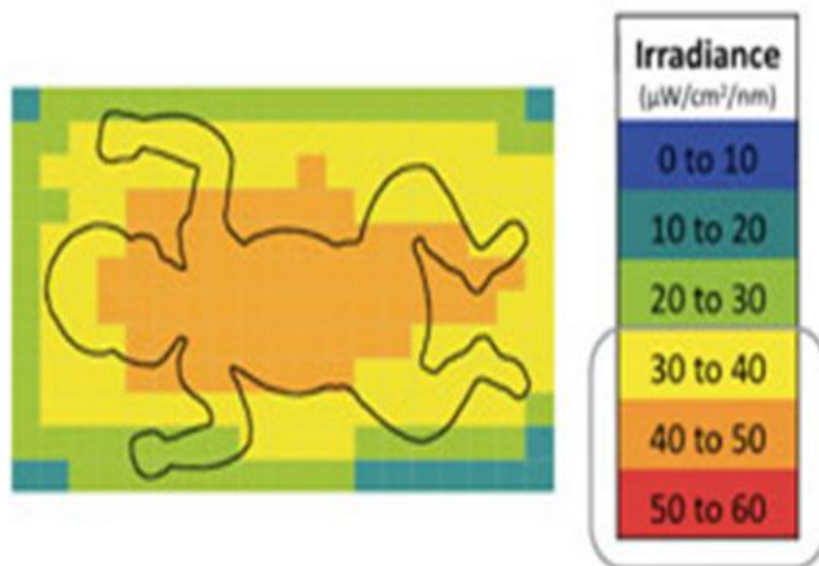


**Figura 5:** Imagem do sensor de colocado sobre um boneco exposto à luz azul, ilustrando a aplicação do sensor de radiação desenvolvido neste trabalho. Imagem extraída de Ferreira et al (2013)<sup>98</sup>.

Embora não tenha sido abordado por Ferreira et. al. o contato direto do sensor com a pele do recém-nascido, de acordo com a imagem supõe-se que a proposta de uso do selo seja junto à fralda. Neste sentido, é válido ressaltar que em 1994, a Academia Americana de Pediatria (AAP) desenvolveu critérios para a abordagem clínica do recém-nascido icterício, visando otimizar o uso da fototerapia<sup>99</sup>. E a não observância de critérios técnicos adequados para o uso dessa tecnologia pode prejudicar a eficácia terapêutica e a qualidade do tratamento



oferecido ao recém-nascido (RN) icterício<sup>100</sup>. Neste contexto, dentre os cuidados gerais propostos com o recém-nascido em fototerapia tem-se a intensidade luminosa e a superfície corporal exposta à luz<sup>100</sup>. Como a luz interage com o pigmento bilirrubínico depositado na pele do recém-nascido, quanto maior a superfície corporal exposta à luz, maior será a eficácia da fototerapia<sup>101,102</sup>. A Figura 6 demonstra de forma ilustrativa a intensidade luminosa sobre a superfície corporal de um recém-nascido sob fototerapia neonatal.



**Figura 6:** Mapa da intensidade da luz azul na superfície do corpo de um recém-nascido sob fototerapia. (Imagem adaptada da Ref. 103).

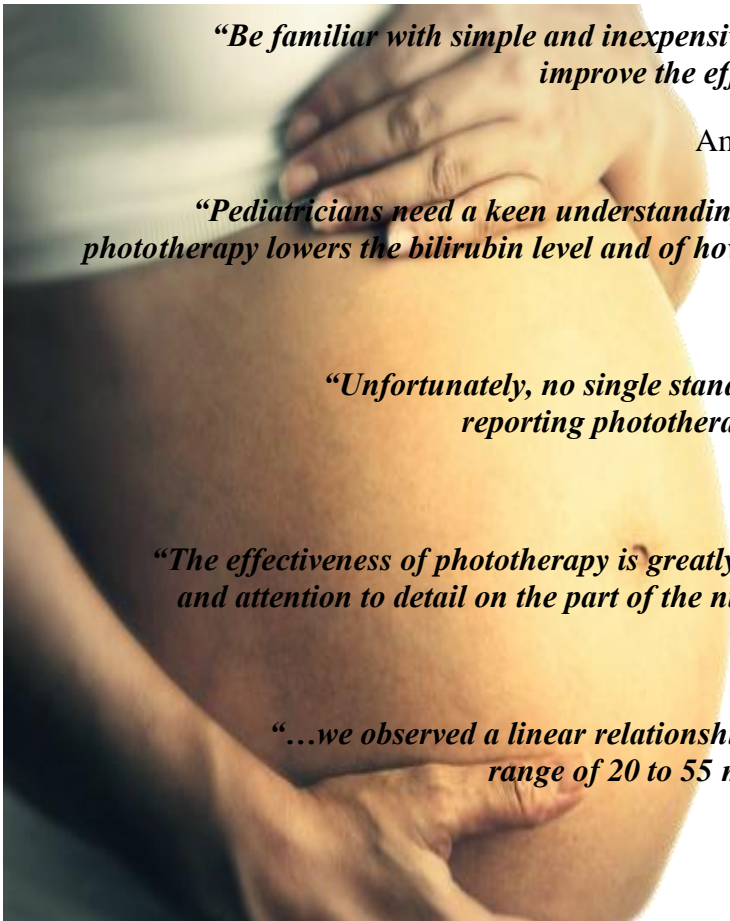
Neste contexto, segundo a AAP, o uso de fraldas em recém-nascidos icterícios submetidos a fototerapia, por diminuir a superfície corporal exposta à luz, diminui consideravelmente sua eficácia e, por isso, deve ser evitado<sup>22</sup>. Infelizmente, segundo estudos publicados por Vieira et.al., apesar do uso de fraldas ser contraindicado, esse aspecto é frequentemente negligenciado, como sugere o resultado da pesquisa, na qual 39% dos entrevistados recomendaram o uso rotineiro de fraldas durante a fototerapia<sup>100</sup>.

Apesar de ambas propostas terem mais aspectos positivos que negativos, o monitoramento da fototerapia por dosimetria de radiações se mostra mais evidente por:

- i. Se alinhar com os estudos propostos por Maisels et. al. já que o mesmo concluiu que o sucesso do tratamento de icterícia por fototerapia envolve principalmente o espectro da radiação utilizada e a intensidade de radiação (irradiância) que chega ao recém-nascido<sup>23</sup>;

- ii. Relacionar a eficácia da fototerapia com a influência das habilidades, conhecimento e atenção aos detalhes por parte dos profissionais da saúde que implementam este tratamento<sup>118,119</sup>;
- iii. Reafirmar a necessidade do controle da radiação emitida pelos aparelhos de fototerapia<sup>86</sup>;
- iv. Enfatizar a importância em se verificar a quantidade de energia emitida lâmpadas dos aparelhos de fototerapia<sup>117</sup>;
- v. Possibilitar o monitoramento do tratamento fototerápico através de um dispositivo capaz de sinalizar em tempo real, a dose de radiação azul absorvida pelo neonato bem como garantir a eficiência do tratamento de hiperbilirrubinemia<sup>120</sup>.

Portanto, otimizar este dispositivo (tipo dosímetro de radiação) irá não apenas proporcionar um maior auxílio aos profissionais da área de saúde na tomada de intervenções positivas referente ao controle da fototerapia mas também ao manejo do recém-nascido frente ao tratamento com o objetivo de minimizar a morbidade de recém-nascidos ictericos; reduzir as taxas de readmissão e/ou o tempo de internação bem como os custos hospitalares.



***“Be familiar with simple and inexpensive adjustments that can substantially improve the effectiveness of phototherapy devices.”***

American Academy of Pediatrics (2004)

***“Pediatricians need a keen understanding of the variables that influence how phototherapy lowers the bilirubin level and of how to deliver an optimal dose of light”***

Maisels (2005)

***“Unfortunately, no single standardized method is in general use for reporting phototherapy dosages in the clinical literature”***

Maisels (2008)

***“The effectiveness of phototherapy is greatly influenced by the skills, knowledge, and attention to detail on the part of the nurse who implements this treatment”***

Stokowski (2011)

***“...we observed a linear relationship between the light irradiance in the range of 20 to 55 mW/cm<sup>2</sup>/nm and a decrease in TsB.”***

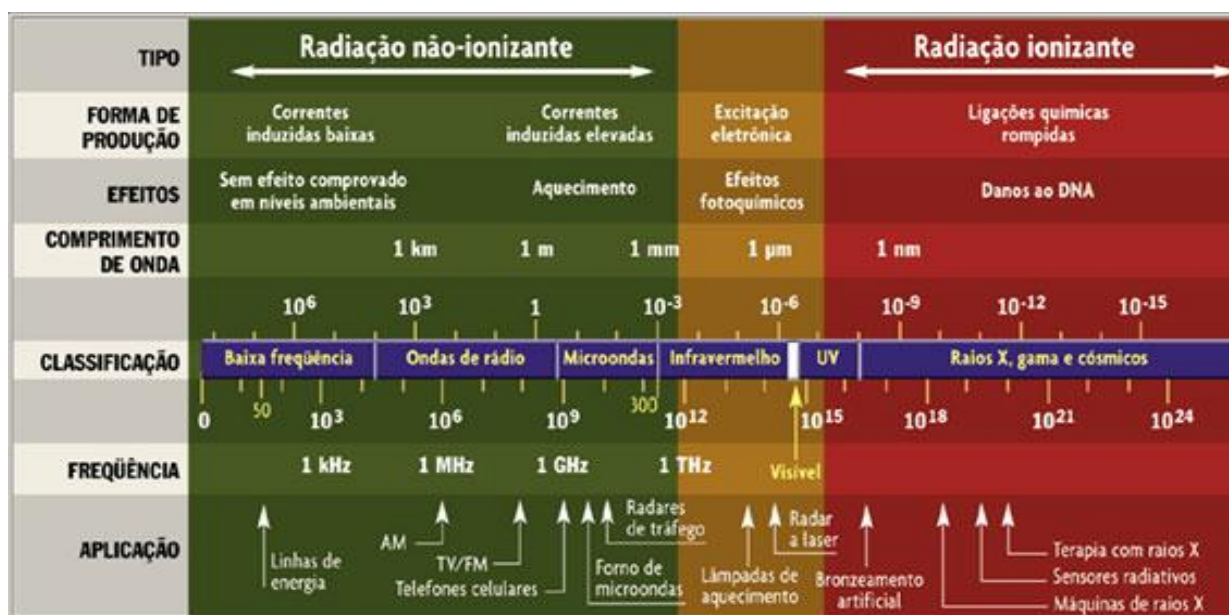
Kure (2012)

## 2.4 Dosimetria de radiações

O tema da dosimetria da radiação originou-se nos últimos anos do século XIX, quando os raios-X, então recém-descobertos, foram colocados em uso médico quase imediato<sup>103</sup>. Tanto o sucesso, como o do primeiro tratamento do tumor registrado em 1899, e as falhas dessas primeiras tentativas sublinharam a necessidade de alguma medição quantitativa das radiações emanadas de um tubo de raios X<sup>103</sup>.

Neste contexto, desde a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Roentgen, em 1895, e da radioatividade, em 1896, por Antonie Henry Becquerel, ocorreram inúmeros avanços da radiologia mundial<sup>105</sup>. E com o passar dos anos, o interesse social e industrial na aplicação de radiação ganhou espaço que vão desde processos de esterilização<sup>105</sup>, desinfestação<sup>107</sup>, pasteurização<sup>108</sup> até irradiação de alimentos para inibição da germinação<sup>106</sup> bem como diversos tratamentos médicos hospitalares<sup>107</sup>.

Tem-se que as formas de radiação eletromagnética (luz visível, micro-ondas, ondas de rádio AM e FM, laser, raios X e radiação gama)<sup>108</sup> se classificam em ionizantes ou não-ionizantes de acordo com a sua capacidade de interagir com a matéria. A Figura 7 mostra o espectro eletromagnético distinguindo as radiações ionizantes das não ionizantes em termos de frequência, comprimento de onda, aplicação etc.



**Figura 7:** Espectro eletromagnético distinguindo as regiões onde estão as radiações ionizantes e as não ionizantes<sup>47</sup>.

Por definição, radiação ionizante são ondas eletromagnéticas de alta energia que ao interagir com a matéria desencadeia ionizações de partículas<sup>107,108</sup>. Em contrapartida, radiações não ionizantes não conseguem provocar ionização de átomos, moléculas<sup>107</sup>.

Os perigos associados ao uso de radiações sem o devido controle e monitoramento pode conduzir a gravíssimos danos aos seres vivos, seja por sub ou por sobre dosagem. Em casos onde há sub dosagem de radiação, como por exemplo no tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal por fototerapia, o RN que não recebe a irradiância necessária não garante eficácia no tratamento<sup>98</sup>. Em contrapartida, em situações que há doses elevadas e não controladas de exposição à radiação ionizante, especialmente radiação UV, podem provocar alterações estruturais em componentes celulares, como o DNA, provocando efeitos somáticos e genéticos capazes de produzir mutações, alterando assim o patrimônio hereditário da espécie humana<sup>106</sup>. Por exemplo, a sobre dosagem não controlada de radiação UV induz a ocorrência de câncer de pele. Portanto, diante dos fatos supracitados, não restam dúvidas quanto à necessidade e a importância desenvolver dispositivos, chamados dosímetros, capazes de determinar a dose absorvida resultante das interações da radiação com um dado meio<sup>110</sup>.

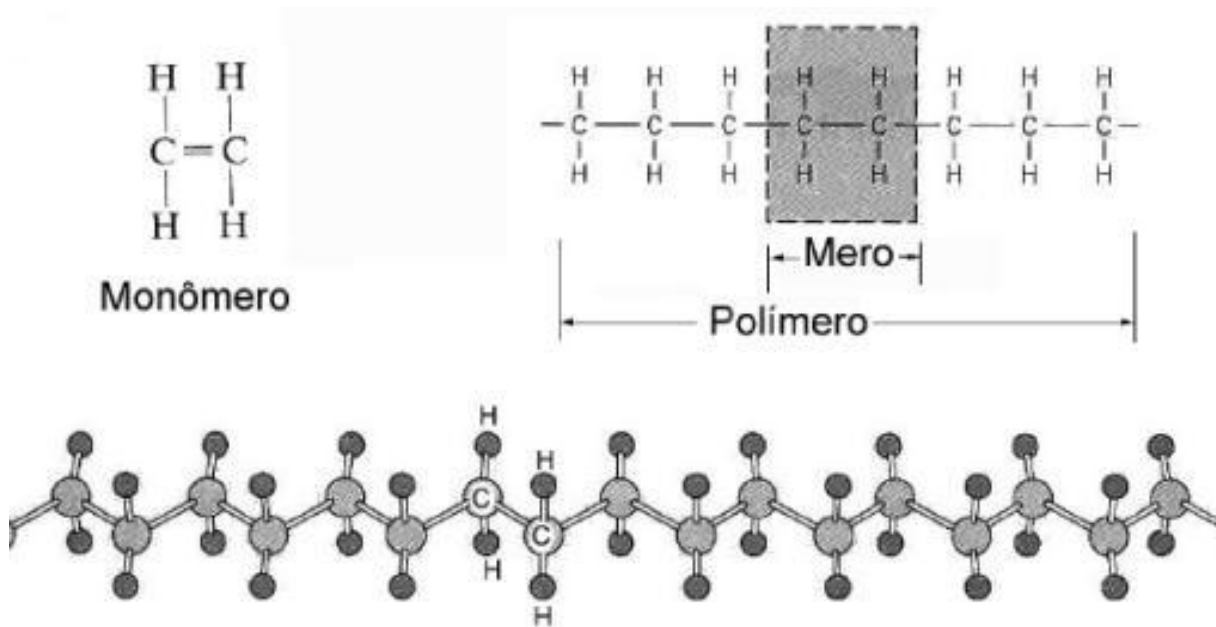
A percepção da radiação eletromagnética, seja qualitativa ou quantitativa para dosímetros, induz alterações físicas ou químicas no material, sendo posteriormente quantificadas através de um determinado processo de medida ou observação<sup>111</sup>. Existem diversos processos pelos quais diferentes radiações podem interagir com um meio material<sup>111</sup>. Entre esses processos os mais utilizados são aqueles que envolvem a geração de cargas elétricas, a geração de luz, a sensibilidade de películas fotográficas, a geração de calor e alterações da dinâmica de certos processos químicos interagindo com o meio e provocando mudanças nas suas propriedades óticas<sup>112</sup>.

Neste trabalho, a abordagem de dosímetros será direcionada para o desenvolvimento de dispositivos poliméricos óticamente sensíveis à radiação cujo princípio de funcionamento baseia-se na mudança de tonalidade da coloração.

## 2.5 Polímeros

Compostos orgânicos são moléculas cuja cadeia principal é formada por ligações covalentes entre átomos de carbonos. Neste contexto, os polímeros representam uma classe destes compostos<sup>121</sup>, cuja estrutura é formada por *meros* (unidades químicas que se repetem ao longo de suas cadeias poliméricas principais) e com massa molar da ordem de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup>

g/mol<sup>122</sup>. Portanto, por definição, tem-se que: polímeros são compostos que consistem em moléculas muito grandes, feitas de muitas subunidades repetidas. As subunidades moleculares que são usadas para sintetizar os polímeros são chamadas de monômeros e as reações através das quais os monômeros são unidos são chamadas de reações de polimerização<sup>123</sup>. A Figura 8 ilustra a unidade de repetição do polímero polietileno.



**Figura 8:** Estrutura química do polietileno e seu monômero. <sup>124</sup>.

As propriedades dos polímeros variam progressivamente com a massa molar, que depende das condições de polimerização para cada monômero. Neste contexto, há 3 tipos de comumente referidos na literatura:

(1) *Massa molar*: depende do número de moléculas de polímero presentes na solução, qualquer que seja sua estrutura ou tamanho;

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} (n_i M_i)}{\sum_{i=1}^{\infty} (n_i)}$$

$M_n$  = MM numérica média /  $M_i$  = MM de moléculas  $i$  /  $n_i$  = número de moléculas de classe  $i$

(2) *Massa ponderal*: depende do número e da massa das moléculas presentes na solução,

qualquer que seja sua estrutura ou tamanho;

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} (n_i M_i^2)}{\sum_{i=1}^{\infty} (n_i M_i)}$$

$M_i$  = MM de moléculas  $i$  /  $n_i$  = número de moléculas de classe

(3) *Massa viscosimétrica média*: depende do número, da massa e da forma das macromoléculas presentes na solução, qualquer que seja sua estrutura ou tamanho.

$$\bar{M}_v = \frac{[\sum_{i=1}^{\infty} (n_i M_i^{1+a})]^{1/a}}{\sum_{i=1}^{\infty} (n_i M_i)}$$

$M_v$  = MM viscosimétrica média /  $M_i$  = MM de moléculas  $i$  /  $n_i$  = número de moléculas de classe /  $a$  = constante (depende do polímero, solvente e temperatura)

Outra maneira simples de conhecer o quão larga ou estreita é a curva de distribuição das massas molares é através do cálculo de polidispersividade ( $Q$ )<sup>123,124</sup>, ou polidispersão, definida pela razão entre massa molar ponderal médio e massa molar numérico médio:

$$Q = M_w / M_n$$

Assim, o polímero será considerado monodisperso para  $Q = 1$ , ou seja, os valores das massas são iguais e há no material uma composição uniforme. Em contrapartida, para  $Q \neq 1$ , há no material uma variação nas massas moleculares e  $Q$  será tanto maior quanto mais heterogêneo for sua composição. A curva de distribuição e os valores das massas molares são usualmente determinados pelo método de cromatografia de permeação em gel<sup>124</sup>.

Além destas denominações, os polímeros podem ser classificados de diversas maneiras, conforme mostrado resumidamente na Tabela 2<sup>124</sup>. Em particular, destaca-se que a classificação dos polímeros segundo a origem ocorreu durante o extraordinário desenvolvimento da Química de Polímeros, após a II Guerra Mundial, isto é, no início da década de 50. Neste cenário, os polímeros naturais foram os padrões em que se basearam os pesquisadores para a busca de similares sintéticos<sup>124</sup>.

**Tabela 2:** Classificação de polímeros<sup>125</sup>.

<b>Classificação de polímeros</b>	
<b><i>Critério</i></b>	<b><i>Classe do polímero</i></b>
Origem	Natural ou Sintético
Número de monômeros	Homopolímero ou Copolímero
Método de preparação	Polímero de adição ou de condensação ou por modificação de outro polímero
Estrutura química da cadeia polimérica	Poli hidrocarboneto, poliamida, poliéster, etc
Encadeamento da cadeia polimérica	Sequência cabeça – cauda ou cabeça – cabeça ou cauda - cauda
Configuração dos átomos da cadeia polimérica	Sequência <i>cis</i> ou <i>trans</i>
Taticidade da cadeia polimérica	Isotático ou sindiotático ou atático
Fusibilidade e/ou solubilidade do polímero	Termoplástico ou termorrígido
Comportamento mecânico do polímero	Borracha ou elastômero, plástico, fibra

Os polímeros naturais são derivados de recursos renováveis, tais como plantas, animais e micro-organismos, amplamente distribuídos na natureza. Estes materiais apresentam diversas funções fisiológicas, tais como as proteínas e os ácidos nucleicos que são responsáveis pelas características genéticas dos seres vivos e a celulose que é o principal componente estrutural das plantas<sup>125-128</sup>.

Ademais, polímeros de origem natural apresentam estruturas mais complexas que os polímeros sintéticos e, de modo típico, massas moleculares relativamente elevadas, menor estabilidade à elevação da temperatura e menor tolerância à biodegradação o que lhes confere um carácter mais ecológico e uma imensa variedade de aplicações tecnológicas devido ao comportamento pseudoplástico, capacidade de geletificação, interação/ligação com a água, bem como sua biocompatibilidade e sua biodegradabilidade<sup>125</sup>.

Também, é importante ressaltar que com advento da tecnologia dos polímeros, pós Segunda Guerra Mundial, os polímeros naturais perderam sua importância econômica<sup>124</sup>. No entanto, com a mudança de atitude da humanidade através da conscientização ecológica, os

polímeros naturais estão retomando a sua importância. Em especial, destaca-se que ainda hoje a borracha natural mantém seu uso e se hoje existem grandes variedades de elastômeros (borrachas sintéticas) é devido ao entendimento que tiveram da arquitetura molecular da borracha natural<sup>124-128</sup>.

Neste contexto, considerando que a Borracha Natural (BN), é ao lado do aço e do petróleo (matérias-primas não renováveis), um dos alicerces que sustentam o progresso da humanidade, sendo assim um produto estratégico<sup>129</sup>, será abordado no item 2.5.1, as principais características de BN bem como sua aplicação na área médica.

Por outro lado, a síntese de novos materiais com performance e propriedades otimizadas constitui uma área em constante expansão nas ciências de materiais<sup>128</sup>. Desde a última década, os métodos de síntese de polímeros, processamento e caracterização tem trazido grandes desafios e oportunidades para projetar uma ampla variedade de estruturas e propriedades físicas e químicas desejadas para diversos tipos de aplicações<sup>130</sup>. Dentre as aplicações biomédicas destacam-se engenharia de tecidos, entrega de fármacos terapêuticos e diagnósticos.

O processo de síntese de polímeros por reações de polimerização unem vários monômeros e, ao final da reação, formam uma cadeia longa chamada polímero. Segundo Mano et al (1999)<sup>124</sup>, no livro “Introdução a polímeros”, a preparação do polímero pode ocorrer por reações de polimerização por adição ou condensação ou por modificação de outro polímero, através de reações químicas, como hidrólise, esterificação, acetalização, etc., permitindo a modificação das propriedades iniciais em grau controlável.

Em resumo, na polimerização por adição é necessária a existência de instaurações e consequente rompimento dessas instaurações (apenas as ligações pi) para que haja uma valência livre em cada carbono na extremidade da molécula. Desta forma, as moléculas serão adicionadas umas às outras repetidas vezes gerando dois tipos de polímeros: homopolímeros (quando os monômeros são iguais) e copolímeros (quando os monômeros são diferentes). Já na polimerização por condensação, para que ocorra interação entre as estruturas é necessário que o monômero seja bifuncional, isto é, que apresente grupo funcional repetido duas vezes<sup>124</sup>.

Dentro da classe de polímeros sintéticos encontram-se alguns que são compostos



orgânicos conjugados. Estes são materiais que combinam as propriedades ópticas e eletrônicas de semicondutores com as propriedades mecânicas e as vantagens de processamento de polímeros<sup>131</sup>. Essas características associadas à demonstração de que polímeros podem se tornar condutores elétricos ou podem contribuir para a construção de camada ativa de diodos emissores de luz (LED's), desencadeou uma atividade de pesquisa muito intensa nessa classe de materiais. Diversos tipos de dispositivos eletrônicos e optoeletrônicos utilizando polímeros conjugados já foram demonstrados, incluindo além de LED's também transistores, opto acopladores, fotodiodos, tríodos, reguladores de voltagem e até mesmo lasers<sup>8-11</sup>. No entanto, sabendo-se que o tempo de meia vida desses polímeros é relativamente mais baixo, usa-se, como umas das estratégias de aprimoramento, a síntese de polímeros mais eficientes e resistentes à oxidação. Essa flexibilidade nas formas de preparação de sistemas é particularmente interessante no caso de polímeros conjugados para os quais pequenas alterações nas rotas de síntese podem conduzir à formação de materiais com diferentes estruturas e passem a emitir em diferentes regiões do espectro<sup>132</sup>.

Neste contexto, existem diversos polímeros conjugados sendo empregados como materiais luminescentes. Entre esses, algumas classes vem sendo mais estudadas: poli(p-vinilenofenilenos); poli(flourenos), poli(N-vinilcarbazóis), poli(tiofenos), polímeros derivados das fenotiazinas, derivados das triazinas, etc<sup>132</sup>. No intuito de alinhar o estudo com o objetivo proposto neste trabalho, será abordado no item 2.5.2, o polímero orgânico conjugado derivado do poli(p-fenilenovinileno) (PPV), o poli[2-metóxi,5-(2'-etil-hexiloxi)-p-fenilenovinileno] (MEH-PPV), devido as suas propriedades ópticas, que são bastante promissoras na confecção de dispositivos optoeletrônicos.

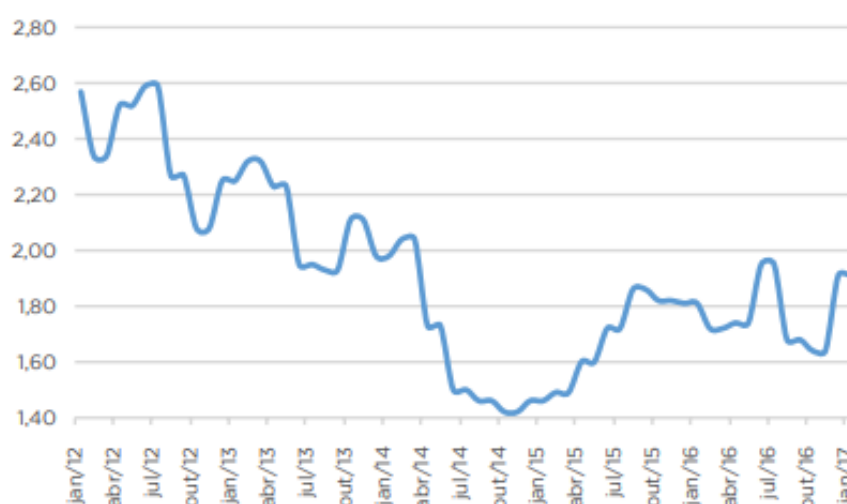
### **2.5.1. Polímero natural: Borracha Natural (BN)**

A borracha natural é um polímero proveniente do látex extraído principalmente de árvores do gênero *Hevea brasiliensis*<sup>130</sup>. O látex é definido como uma dispersão coloidal aquosa polifásica, constituído de partículas de borracha (monômeros cis-1,4-isopreno), proteínas, fosfolipídios, lutóides (ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, açúcares, entre outros) e partículas *Frey-Wyssling* (organelas contendo lipídios e carotenóides)<sup>130</sup>. Por um processo chamado sangria, o látex é coletado e por coagulação a borracha natural é obtida.

O polímero natural sintetizado pela espécie *Hevea* é classificado como um elastômero de elevado grau de elasticidade, flexibilidade e de baixo custo<sup>124</sup>. Segundo a Associação

Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha (Apabor), entre o final de 2014 e o começo de 2015, as cotações do látex atingiram os menores valores já registrados, ao redor de R\$ 1,40 por quilo de coágulo em São Paulo<sup>125</sup>. De 2015 para cá, houve ligeira melhora nos preços do látex no mercado interno e segundo o Instituto de Economia Agrícola – IEA a cotação do látex fechou em Julho/2019 em R\$ 2,49/kg com uma Variação/Mês +5,96%. A Figura 9 demonstra graficamente a tendência de queda nos preços médio do coágulo (prc) para Teor de Borracha Seca (TBS) igual a 53% para o Estado de São.

**ESTADO DE SÃO PAULO: PREÇO MÉDIO DO COÁGULO (PRC) PARA TBS IGUAL A 53% (R\$ POR QUILO)**

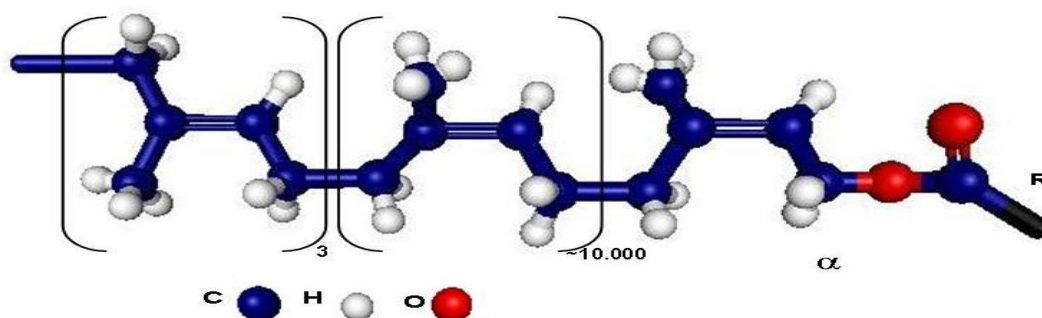


**Figura 9:** Gráfico do Preço médio do coágulo (PRC) para TBS igual a 53%. Legenda: Preço de Referência do Coágulo (PRC), Teor de Borracha Seca (TBS). Fonte: Apabor; compilado pela Scot Consultoria<sup>125-126</sup>.

As propriedades mecânicas exibidas pela borracha natural são essencialmente atribuídas às rotações das ligações simples C-C, que permitem diferentes conformações das cadeias e definem a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) delimitada abaixo da temperatura ambiente<sup>130</sup>. Ademais, é um biopolímero obtido de fonte renovável que permite a utilização sustentável dos recursos naturais<sup>132-141</sup>.

O biopolímero supracitado apresenta massa molar na ordem de  $10^6$  g/mol, e suas moléculas são essencialmente compostas pelo monômero cis-1,4-isopreno ( $C_5H_8$ ), que se polimerizam a fim de formar o poli(cis-1,4-isopreno), cujas unidades monoméricas estão arranjadas na combinação cabeça-cauda<sup>130</sup>. O grupo terminal varia com a origem da borracha. Como a unidade de repetição da parte cis isoprênica existe em uma proporção muito maior

que a parte *trans* isoprênica a borracha natural se mostra um polímero amorfo<sup>139-141</sup>. A Figura 10 ilustra a estrutura química da parte isoprênica da borracha natural composta por unidades *trans* isoprênicas, unidades *cis* isoprênicas e um grupo  $\alpha$  terminal<sup>139</sup>.



**Figura 10:** Estrutura química da parte isoprênica da borracha natural. São aproximadamente 3 unidades *trans* isoprênicas (parte cristalina), 10.000 unidades *cis* isoprênicas (parte amorfa, tipo cabeça-cauda) e um grupo  $\alpha$  terminal<sup>139</sup>.

A borracha Natural é uma matéria-prima obtida de fonte agrícola renovável essencial para a manufatura de um amplo espectro de produtos em todos os ramos da atividade humana<sup>130</sup>. Nos últimos anos, houve um aumento significativo no número de artigos publicados e patentes tratando a aplicação da borracha natural na área da saúde<sup>142</sup>. Em especial, destaca-se que, a partir da década de 90, o látex extraído dos clones da seringueira *Hevea brasiliensis* se mostrou promissor em vários tipos de aplicações biomédicas. Dentre as aplicações médicas destacam-se o estudo do uso da borracha natural para fins de regeneração tecidual<sup>26</sup>, atividade angiogênica<sup>27</sup>, cicatrização conjuntival e neoangiogênese<sup>28</sup>, baixa antigenicidade<sup>29-31</sup>, aceleração da neoformação óssea e cicatrização.<sup>31</sup>

O interesse científico no progresso de inovações tecnológicas com a borracha natural e implementação de metodologias de vulcanização ou incorporação de cargas, que aumenta tanto a resistência química, quanto a resistência mecânica (resistência a desgaste, estiramento, etc.)<sup>143-144</sup> permitiu o desenvolvimento de nanocompósitos aplicáveis como barreira de gases<sup>145</sup>, atuadores mecânicos que respondem a estímulos elétricos ou térmicos, comparados a músculos artificiais<sup>146</sup>, materiais “*shape memory*”, que respondem a estímulos como temperatura<sup>147</sup> ou gases presentes no ambiente<sup>148-149</sup>, mudando de forma e podendo reassumir a forma original assim que cessado o estímulo externo, compósitos poliméricos contendo sais de fosfônio quaternário<sup>150</sup> e nanopartículas de prata<sup>151</sup> que atuam como materiais bactericidas.

No que tange o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, estudos científicos mostram que borracha natural, usada como matriz, é capaz de amplificar as propriedades de fotoluminescência<sup>152-153</sup>. Neste cenário, aliar a borracha natural à materiais metálicos ou polímeros semicondutores com propriedades de fotoluminescência permiti a construção de dispositivos eletrônicos e ópticos.

Em 1911, Henry iniciou os estudos sobre o efeito da luz UV em borrachas naturais e seus resultados confirmaram a ocorrência de reações de oxidação. Ademais, verificou-se que a absorção de oxigênio depende do comprimento de onda e do tempo de exposição do material à luz ultravioleta<sup>130</sup>. Neste contexto, a comunidade científica buscou compreender os efeitos da degradação da borracha natural (BN), em decorrência da ação do oxigênio do ar e, mais especificamente, compreender o mecanismo responsável pela cisão da cadeia que provoca a diminuição da sua elasticidade<sup>124</sup>.

Estudos relacionados à fotodegradação por irradiação ultravioleta dos filmes de borracha natural, mostraram que a presença de grupos cromóforos na cadeia polimérica, capazes de absorver luz UV-visível, gerou a ruptura de ligações das cadeias principal e lateral do polímero, possibilitando assim a absorção de oxigênio<sup>154</sup>. Experimentalmente, foi possível observar, por espectros de absorção no infravermelho, que a exposição à luz UV (253 e 300 nm) provocou redução da intensidade nas regiões de estiramento envolvendo ligações carbono-hidrogênio e carbono-carbono ( $C=C$  ( $1664\text{ cm}^{-1}$ )), e simultaneamente a formação de bandas de  $3435$ ,  $1766$ , e  $1166\text{ cm}^{-1}$ , as quais correspondem aos modos estiramento (O-H), n ( $C=O$ ), e n ( $C-O$ ), respectivamente, caracterizando a presença de ácidos carboxílicos  $C=O$  ( $1720\text{ cm}^{-1}$ )<sup>154</sup>. Estes resultados foram encontrados para membranas de borracha natural preparadas à  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 horas.

Ademais, ao relacionar as propriedades fotoluminescentes dessas mesmas membranas supracitadas em função da temperatura da amostra observou-se que com o aumento na temperatura houve um decréscimo na intensidade dos picos de luminescência<sup>155</sup>. Atribuiu-se a variação na intensidade de emissão em relação a temperatura à diminuição da dissipação de energia através da geração de fônons (vibrações reticulares)<sup>155</sup>. Portanto, neste estudo, concluiu-se que as propriedades fotoluminescentes das membranas de borracha natural estão intimamente relacionadas aos ácidos orgânicos aromáticos com excitação em  $285\text{ nm}$  e emissão em  $385\text{ nm}$ , contendo grupos carboxílicos ligados<sup>155</sup>.

Portanto, no geral, as mudanças químicas que ocorrem durante o tratamento de polímeros por fotodegradação (em radiações UV) devem-se à ruptura de ligações das cadeias principal e lateral, o que pode ser comprovado pela diminuição da massa molar e pela formação de produtos voláteis de baixa massa molar, respectivamente. Na presença de oxigênio, as reações de degradação ocorrem facilmente. A probabilidade da ruptura da cadeia aumenta com o aumento da exposição do material à luz ultravioleta para todos os tipos de ligações, embora as energias de dissociação das ligações sejam diferentes entre si<sup>154</sup>.

### **2.5.2. Polímeros luminescentes: Poli[2-metóxi,5-(2'-etil-hexiloxi)-p-fenilenovinileno]-MEH-PPV**

Segundo Jong e Vissenberg, 1998, em polímeros conjugados (PC), tais como polifluoreno, poliacetileno, poli (p-fenileno), e poli (fenileno-vinileno) (PPV), os átomos de carbono ao longo da cadeia polimérica são alternadamente ligados por ligações simples e duplas. As propriedades eletrônicas dos PCs são determinadas por elétrons fracamente ligados com um intervalo de banda (band gap) relativamente pequeno. Uma cadeia PC pode, portanto, ser considerada como um semicondutor unidimensional. Por esse motivo, os PCs são utilizados como material ativo em dispositivos optoeletrônicos, já que manifestam tanto o fenômeno da eletroluminescência quanto da fotoluminescência, ou seja, emitem a partir de estímulo elétrico ou via fótons, respectivamente. Embora ambos processos eletro e fotoluminescente sejam devido à emissão excitônica, a natureza exata e a cinética dos éxcitons nesses sistemas ainda estão em debate. Neste contexto, foi sugerido que a energia de ligação de Coulomb do par elétron-buraco dentro do éxciton é desprezível, de modo que as foto-excitações primárias são portadores livres. Outros estudos sugerem uma grande energia de ligação elétron-buraco de algumas centenas de meV, de modo que o éxciton seja localizado em uma parte da cadeia PC, ou seja, semelhante aos éxcitons de Frenkel encontrados nas moléculas<sup>133-135</sup>.

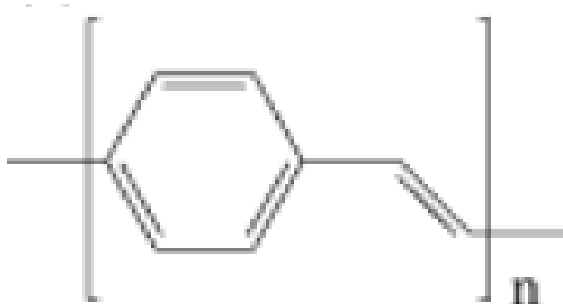
Neste contexto, a presença de interações intracadeias ou inter-cadeias nos polímeros condutores inevitavelmente altera suas cores emitidas nos espectros de fotoluminescência (PL) e eletroluminescência (EL) em comparação com as de suas cadeias isoladas, gerando novos picos de emissão, indesejáveis para a maioria das aplicações ópticas e optoeletrônicas. Portanto, além da cadeia isolada que não interage, ou seja, de uma espécie emissora que não interage, é importante entender as características estruturais e as propriedades optoeletrônicas das espécies emissoras formadas por interações intra-cadeia ou inter-cadeia (as denominamos

espécies emissoras em interação)<sup>135</sup>.

Antes de discutir sobre o comportamento de espécies emissoras, é apropriado introduzir dois tipos de luminescência frequentemente observada em polímeros conjugados: fluorescência e fosforescência. Utilizando uma classificação baseada em mecanismos cinéticos de emissão, a fluorescência é um processo de decaimento radiativo da molécula a partir de seu estado singleto excitado para o estado fundamental singleto, enquanto a fosforescência é um processo de decaimento radiativo da molécula de seu estado tripleto excitado para o estado fundamental singleto. Uma vez que a transição óptica entre o estado excitado tripleto e o estado fundamental singleto é proibida pela regra de seleção de spin, o tempo de vida fosforescente é tipicamente microssegundos a segundos, que é maior que o tempo de vida da fluorescência (~ 0,1-100 ns), e as informações sobre a fosforescência dos polímeros conjugados são escassas, ao contrário da fluorescência. Devido à transição óptica proibida por spin tripleto-singleto decair não radiativamente à temperatura ambiente, medidas de fosforescência em polímeros conjugados são geralmente realizadas a baixa temperatura para reduzir esse decaimento não-radiativo<sup>136-137</sup>.

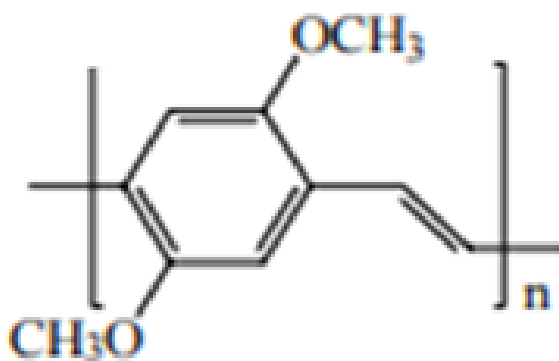
As interações entre os luminóforos, ou seja, grupos emissores de uma cadeia ou de cadeias diferentes, resultam na formação de excímero, excíplex e agregado. Um excímero é um dímero dos mesmos luminóforos, sendo que um está originalmente no estado foto-excitado e o outro está no estado fundamental. Além disso, outro tipo de dímero que se comporta da mesma forma que o excímero, mas consiste em diferentes luminóforos, é denominado complexo ou excíplex excitado. Esses dois dímeros existem apenas sob foto-excitação, mas estão dissociados no estado fundamental. Em contraste, um agregado envolve interação mútua entre dois ou mais luminóforos no estado fundamental, estendendo a deslocalização de elétrons sobre esses segmentos conjugados. A emissão de agregados pode resultar de excitação direta e/ou transferência de energia de espécies monoméricas excitadas correspondentes (cadeia isolada sem interação), dependendo do comprimento de onda da excitação. No entanto, estas três espécies emissoras podem gerar um novo pico sem estrutura definida na região de maior comprimento de onda no espectro de fluorescência e usualmente causa uma diminuição da eficiência quântica de fotoluminescência (EQFL). Deve-se destacar que excímero, excíplex, e agregado podem ser observadas em ambos espectros de foto e eletroluminescência<sup>136</sup>.

A luminescência destes materiais foi descrita pela primeira vez em 1990, usando poli(p-fenileno vinileno), como monocamada semicondutora entre eletrodos metálicos<sup>157</sup>. A Figura 11, mostra a estrutura molecular do PPV, no qual produz emissão luminosa verde-amarelada<sup>157</sup>.



**Figura 11:** Estrutura molecular do poli(p-fenileno vinileno)-PPV<sup>155</sup>.

Desde então, por meio da introdução de grupos laterais no PPV foi possível obter derivados com emissão luminosa centrada em comprimentos de onda ligeiramente deslocados daquela observada na molécula de origem. Isso permite a construção de dispositivos emitindo em diferentes cores. Um dos polímeros conjugados, derivado do PPV mais estudados em relação às propriedades e aplicações luminescentes é o poli[2-metóxi,5-(2'-etil-hexiloxi)-p-fenilenvinileno]-MEH-PPV<sup>121</sup> (Figura 12).



**Figura 12:** Estrutura molecular do poli (2,5-dimetoxi-para fenileno vinileno)-MEH-PPV<sup>121</sup>.

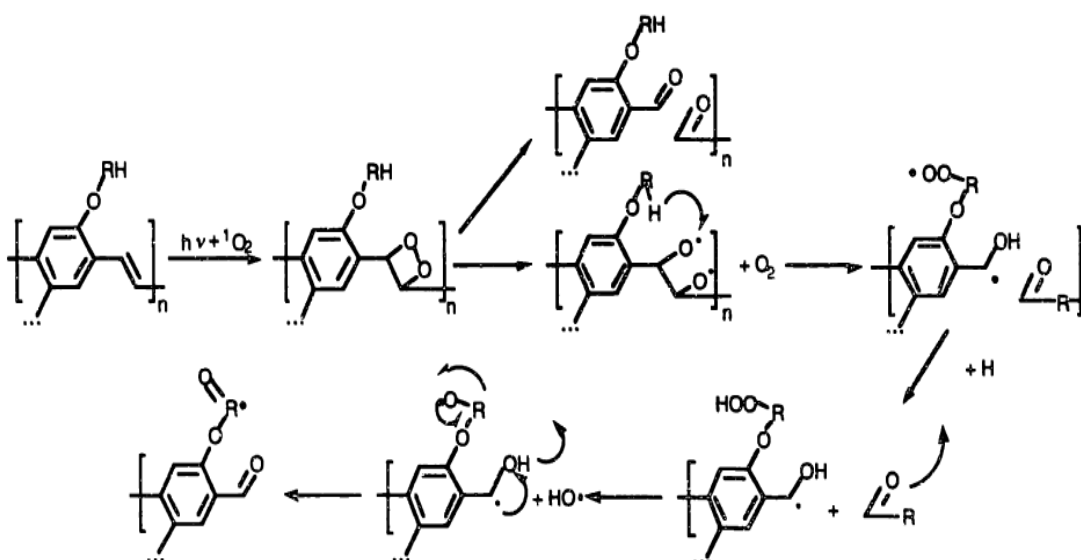
A introdução de substituintes ligados à cadeia principal durante a síntese, sem prejudicar a conjugação da cadeia principal, permitiu um ligeiro deslocamento no comprimento de onda do verde-amarelado no PPV para uma emissão luminosa centrada na região do vermelho no MEH-PPV. Como no no PPV os substituintes estão localizados nas posições orto em relação à cadeia arílica as substituições podem levar a uma distorção da

cadeia principal, reduzindo o comprimento médio de conjugação<sup>121</sup>. Ademais, a solubilidade também foi modificada pela funcionalização dos grupos substituintes, uma vez que o MEH-PPV é um derivado solúvel do PPV. O PPV, assim como vários outros polímeros conjugados, apresenta algumas dificuldades de processamento oriundas do fato de não ser solúvel, que dificultam ou até mesmo impedem a sua utilização direta para construção de dispositivos. Este fato foi contornado acrescentando à cadeia do PPV grupos laterais que tornem o polímero derivado do PPV, solúvel, como no caso do MEH-PPV.

Outra característica relevante quando se trata de polímeros conjugados luminescentes é a susceptibilidade a processos de oxidação ou fotodegradação. O processo de fotodegradação ocorre pela ativação e degradação do polímero, causada pela absorção de fótons na presença de oxigênio. Assim, neste processo o oxigênio atua na quebra da cadeia polimérica, resultando na interrupção da conjugação, ou seja, a quebra das ligações vinílicas (C=C) das cadeias poliméricas dão lugar a ligações carbonílicas (C=O). Em outras palavras, a carbonila atua como centro de aniquilação dos éxcitons singletos. Portanto, se o comprimento da conjugação é reduzido, modifica-se também as propriedades eletrônicas bem como sua eficiência luminosa<sup>156</sup>. Além disso, compostos carbonílicos exibem um baixo rendimento quântico de fluorescência, pois as energias associadas às transições  $n \rightarrow \pi^*$  são baixas e o decaimento dos elétrons envolvidos nessa transição é lento, que favorece a ocorrência de cruzamentos intersistemas<sup>158</sup>. Dessa forma, tem-se que a instabilidade fotoquímica dos polímeros conjugados apesar de deletéria às diversas de suas aplicações tecnológicas, é o fator chave para o desenvolvimento de sensores de radiação baseados nestes materiais.

São encontradas na literatura científica<sup>158-164</sup> divergências em relação mecanismos de reação do processo de fotodegradação. No entanto, é fatídico que a exposição à radiação na presença de oxigênio diminui comprimento de conjugação efetivo do polímero, causando diminuição da intensidade e deslocamento dos espectros de absorção no UV-VIS e fotoluminescência para menores comprimentos de onda. Portanto, a título de ilustração, segue na Figura 13 o mecanismo de fotodegradação do PPV proposto por Cumpston et al, 1997.





**Figura 13:** Mecanismo de fotooxidação do PPV proposto por Cumpston et al em 1997 <sup>160</sup>.

Neste mecanismo a fotooxidação ocorre com a formação de estados excitados do oxigênio singleto (espécie eletroquímica da molécula de oxigênio excitada onde os spins estão emparelhados). Este por sua vez é formado via transferência de energia do estado tripleto (spins não estão emparelhados) do MEH-PPV que acontece durante a operação de fotoluminescência ou eletroluminescência. Durante o processo de relaxação de éxcitons é, estatisticamente mais provável a relaxação através do estado tripleto do que através de uma transição singleto. O oxigênio singleto ataca a ligação dupla do grupo vinil, ocasionando a quebra da conjugação <sup>162</sup>. Portanto, a fotooxidação, também conhecido como fotodegradação, ocorreu devido à absorção de fótons e levou à perdas das propriedades elétricas e ópticas do MEH-PPV.

Essas alterações ocasionadas pelo processo de fotooxidação dos polímeros conjugados, podem ser deletérias para algumas aplicações, por exemplo, *displays* luminosos, células fotovoltaicas e transistores. Entretanto, abrem perspectivas para o uso dos compostos luminescentes como elemento ativo de dosímetros para radiação, tanto para radiação não ionizante quanto para confecção de sensores para raios X (aceleradores lineares para tratamento oncológico) de alta energia e para radiação ultravioleta, bem como para radiação gama <sup>165</sup>.

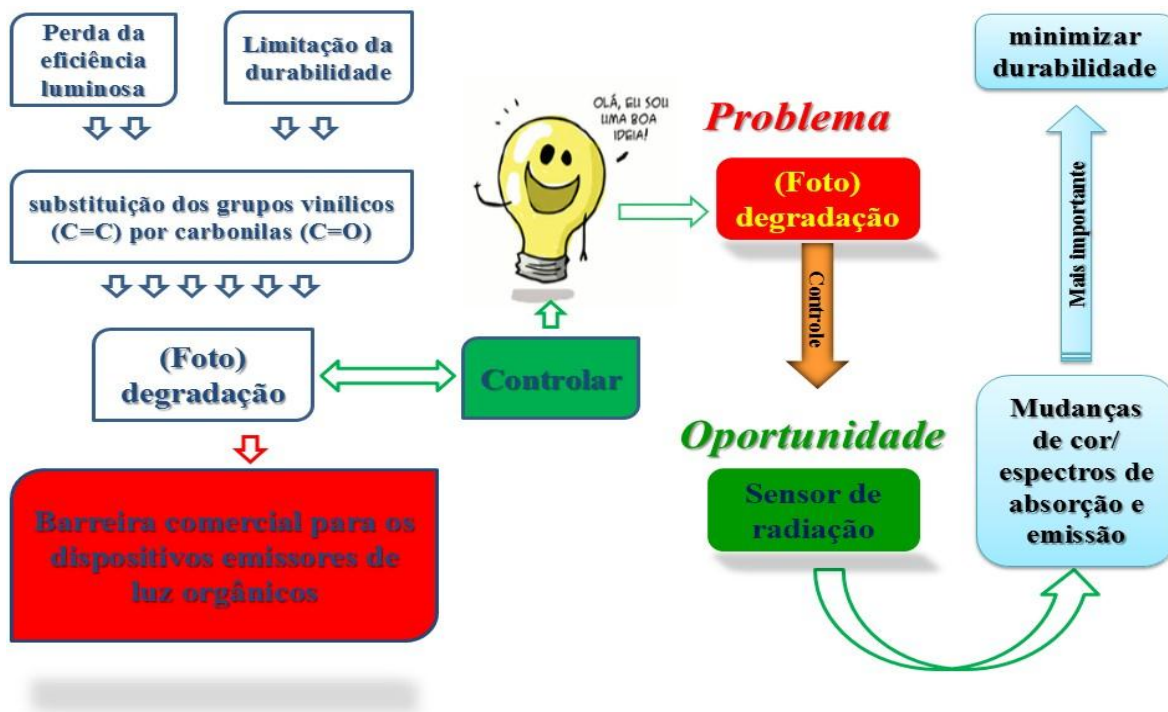
## 2.6 Dispositivos biocompatíveis (sensores)

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material em ser compatível com tecidos vivos, em especial, o corpo humano<sup>166</sup>. Materiais biocompatíveis são desenvolvidos especificamente em função da aplicação a que se destinam e têm de obedecer a um amplo espectro de parâmetros de qualidade e segurança<sup>167</sup>. Alguns protocolos experimentais para avaliação da biocompatibilidade estão de acordo com a ISO 10993-*Biological evaluation of medical devices*, atendendo desde a etapa de P&D até necessidade regulatórias junto a entidades no Brasil (ANVISA) e internacionais (FDA, CE, etc). Neste contexto, estes estudos podem ser delineados em etapas ou em protocolos combinados. Dentre os protocolos de avaliação de biocompatibilidade que são aplicados principalmente aos segmentos de Dispositivos Médicos e Odontológico estão: Citotoxicidade; Sensibilização Dérmica; Irritação Dérmica; Toxicidade Sistêmica (aguda); Toxicidade Subaguda / subcronica; Genotoxicidade; Implante; Hemocompatibilidade (trombogenicidade, adesão plaquetária, coagulação, sistema complemento e hematologia); Biodegradação, dentre outros.

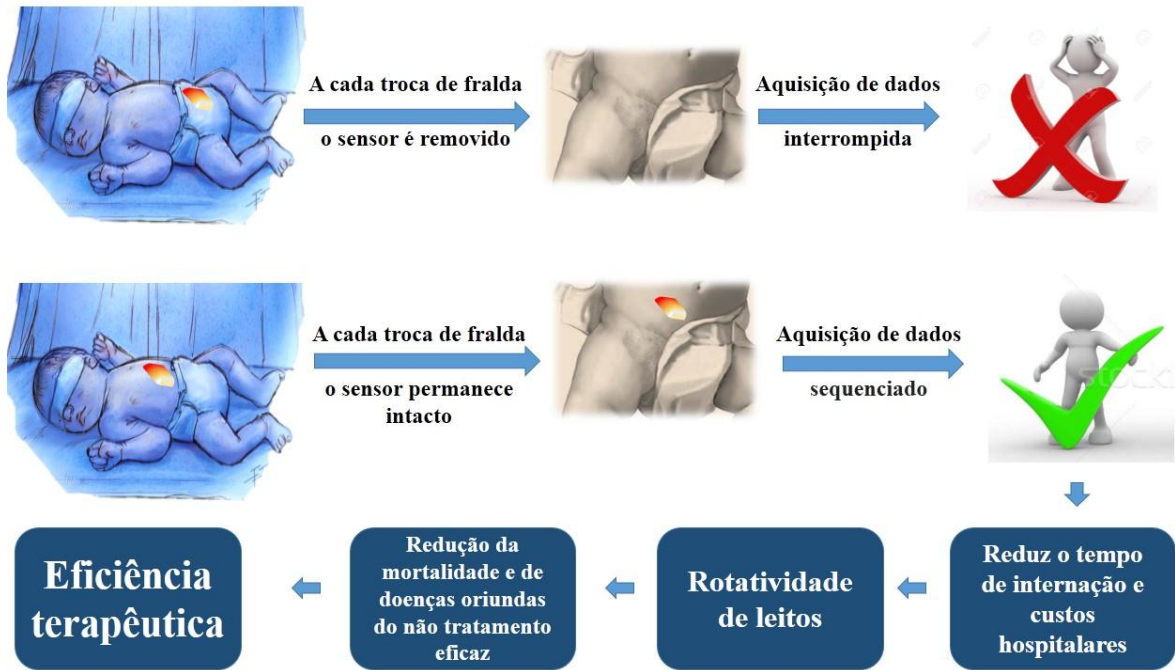
Com advento científico bem como seu progresso no desenvolvimento de dispositivos biocompatíveis, destaca-se a incorporação de tecnologias vestíveis para o tratamento de doenças, diagnósticos e o monitoramento da saúde em tempo real. Esta classe de dispositivos são altamente sensíveis a mudanças sutis nos índices fisiológicos e são capazes de capturar variações pequenas no corpo humano, pois podem ser um indicador precoce de problemas de saúde<sup>168,169</sup>. Além de sustentarem a segurança tecnológica, outros diferenciais desses dispositivos vestíveis são a flexibilidade, elasticidade, biocompatibilidade baseados nas características da pele<sup>170</sup> e sobretudo ao seu baixo custo, à facilidade de coleta de dados, diagnósticos não invasivos, possibilidade de monitoramento remoto e contínuo da saúde, além da capacidade de detecção de doenças em desenvolvimento em intervalos entre exames de rotina<sup>171,172</sup>.

Além disso, com o desenvolvimento de novas tecnologias atrelado ao uso de novos materiais tornou-se possível a fabricação de dispositivos vestíveis portáteis, modernos, mais baratos, menores e mais confiáveis<sup>173</sup>. Neste contexto, o uso de materiais orgânicos, nos vários tipos de dispositivos tem, entre suas principais vantagens, a imensa possibilidade de preparação de sistemas com distintas propriedades. Têm, entretanto, alguns problemas tecnológicos importantes ainda não resolvidos, relacionados com a menor estabilidade química quando comparados com materiais inorgânicos ou organo-metálicos. Contudo, a

possibilidade de mistura física entre componentes naturais e sintéticos permitindo a obtenção de sistemas luminescentes biocompatíveis é, sem dúvida, uma forma atraente e de custo reduzido de preparação de novos materiais. Na Figura 14 encontra-se o fluxograma que ilustra o raciocínio abordado para confecção desses sistemas luminescentes a partir de polímeros conjugados. Já na Figura 15 encontra-se o fluxograma que ilustra o raciocínio abordado para incorporar a BN para confecção de sistemas luminescentes biocompatíveis.



**Figura 14:** O Fluxograma acima ilustra o raciocínio abordado para confecção das membranas luminescentes a partir de polímeros conjugados.



**Figura 15:** O Fluxograma acima ilustra raciocínio abordado para confecção desses sistemas luminescentes biocompatíveis, a partir da incorporação da borracha natural, para implementação em fototerapia.

*“...the capacity to create and use technology should be a key development measure and a focus for global action.”*

Technologies for global health (2012)

*Redução da mortalidade é um dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio das Nações Unidas (ODM - ONU)*



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo são apresentados os materiais e procedimentos experimentais utilizados na preparação e caracterização das membranas luminescentes. Dessa forma, esse capítulo apresenta desde a coleta do látex até a confecção dos sistemas luminescentes, sobrepondo a camada ativa de poli[2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)parafenileno] - MEH-PPV à matriz de borracha natural, até os procedimentos experimentais usados para a caracterização ótica, química, morfológica, térmica e citotóxica.

#### 3.1 Coleta do látex

A matéria prima utilizada para a fabricação das membranas de borracha natural foi a seiva bruta, chamada látex. A coletada foi realizada de árvores *Hevea brasiliensis* (RRIM 600 clone) em uma fazenda experimental na cidade de Indiana, na região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil. O látex foi obtido por sangria e este método de extração consiste no corte em forma de U, com comprimento igual à metade da circunferência do tronco e com o ângulo de 30° em relação a horizontal. A figura 16 mostra os sucessivos cortes realizados para se atingir os vasos lactíferos e conseqüente coleta do látex.

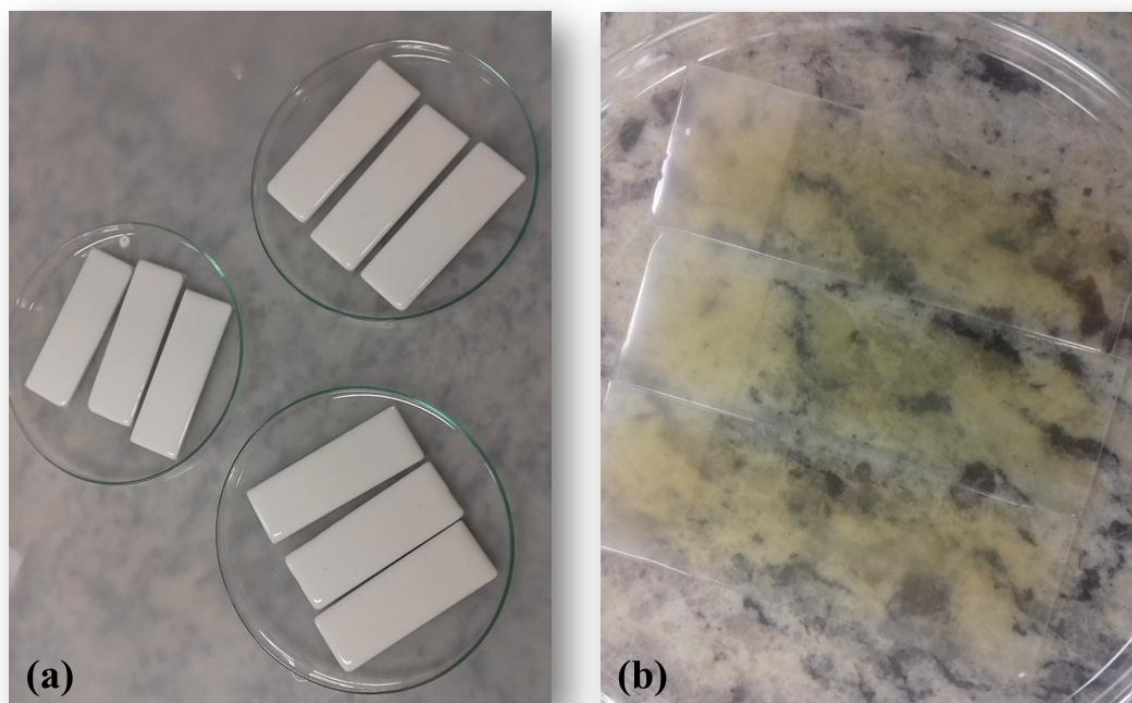


**Figura 16:** Método sangria para coleta de látex.

Após a coleta do látex, estes foram armazenados em vidros âmbar, estabilizados com hidróxido de amônio a 2% m/m e mantidos em ambientes refrigerados. E por fim, é importante destacar que a amônia é um bactericida muito eficiente em concentrações acima de 0,35% em massa<sup>174</sup> e portanto, a adição de amônia ao látex aumenta a sua estabilidade em virtude do aumento da quantidade de espécies aniônicas como carboxilatos na superfície das partículas de borracha<sup>174</sup>.

### 3.2 Preparo das Membranas de Borracha Natural

A obtenção do borracha natural advém da coagulação do látex. Neste sentido, para preparar as membranas de BN optou-se por realizar um tratamento térmico para que a coagulação do látex fosse controlada. Portanto, sobre a lamina (7,5 x 2,5 cm) foram pipetados 2 mL de Látex (deposição via *casting*). Em seguida, em uma estufa as laminas com o látex foram submetidas a uma temperatura de 65°C por 10 horas. A Figura 17 mostra as etapas deste processo.



**Figura 17:** (a) Cada lâmina cotem 2 mL de Látex depositado e (b) Lâminas com látex seco após o tratamento térmico para obtenção das membranas de matriz polimérica de borracha natural.

### 3.3 Poli[2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)parafenilenovinileno] - MEH-PPV

Para atuar como camada ativa das membranas foi escolhido como matéria prima o polímero fotoluminescente MEH-PPV. Possui fórmula molecular  $(C_{18}H_{28}O_2)_n$  e segundo especificações do fabricante, o MEH-PPV (CAS No. 138184-36-8) utilizado nesse trabalho apresenta massa molar numérica média ( $M_n$ ) dentro do intervalo 70.000 a 100.000 g/mol e absorção e emissão máximas em comprimentos de onda em torno de, respectivamente, 495 nm e 555 nm quando solubilizado em tolueno. Ademais, se trata de um polímero sensível à radiação cujo o espectro de absorção e emissão na região do visível tornando-se translucido ao ser foto degradado. Quando exposto à radiação não ionizante, sobretudo luz azul, os espectros de absorção e de emissão dos derivados do PPV sofrem mudanças em suas formas e intensidades devido à fotooxidação da cadeia polimérica principal. A principal consequência desse efeito é a redução da intensidade e o deslocamento dos espectros para menores comprimentos de onda, o que é de suma importância para o desenvolvimento dos sensores de radiação, pois permite associar a cor e intensidade de emissão do polímero com a dose de radiação a qual ele foi exposto<sup>98</sup>. Uma característica relevante a ser mencionada é que a escolha do polímero MEH-PPV se baseou nos estudos propostos por Ferreira et al com qual demonstraram a relação linear de reposta ótica do polímero luminescente e a bilirrubina frente ao tratamento da icterícia neonatal por fototerapia, como também demonstrado por Ferreira et al (2017).

### 3.4 Solução de BN/MEH-PPV

Para preparar a solução de BN/MEH-PPV, em um balão volumétrico, a membrana BN e o MEH-PPV foram dissolvidos em tolueno com uma razão igual a 4000 %m / %m. Esta solução luminescente de BN/MEH-PPV apresentou coloração vermelha com aparência gelatinosa, Figura 18. Esta, por sua vez, pode ser justificada pela dissolução da membrana de borracha seca em solvente orgânico. Tal dissolução produz sempre uma fase solúvel e um gel macroscópico consequente das ligações de hidrogênio formadas entre proteínas e grupos funcionais oxigenados associados às cadeias de borracha, além das ligações que envolvem íons cálcio<sup>174</sup>.



**Figura 18:** Solução luminescente de BN/MEH-PPV em tolueno sob luz ambiente.

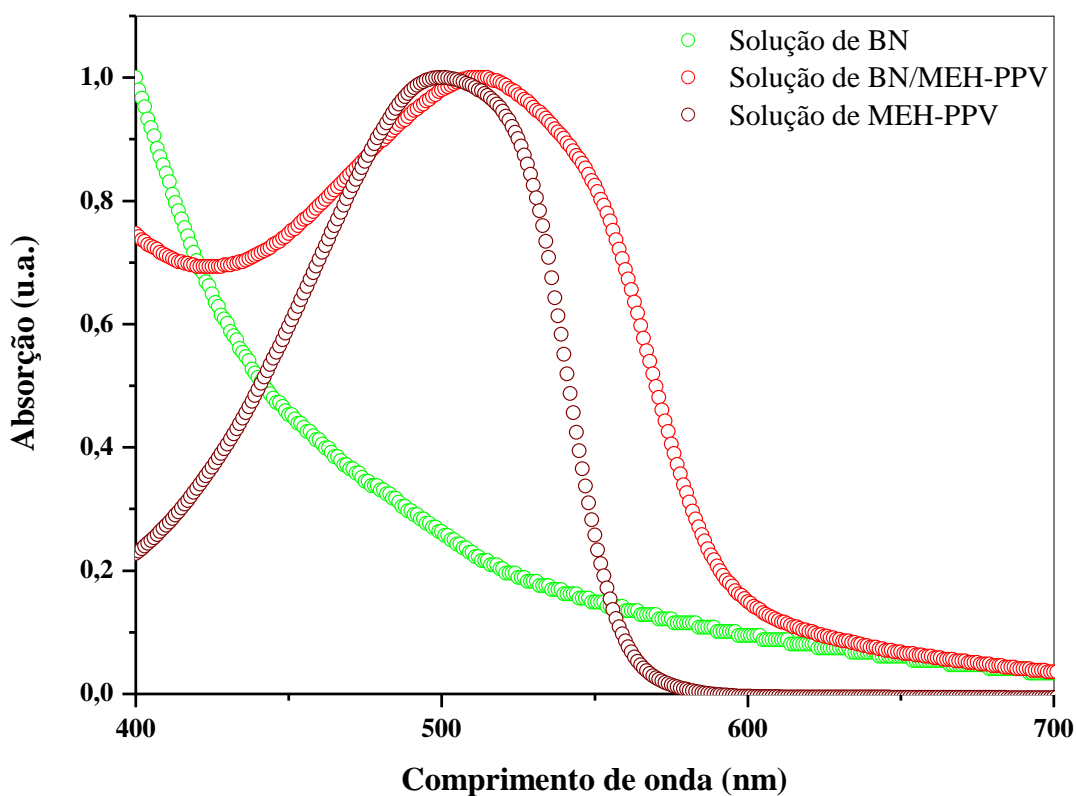
A intenção inicial foi fabricar uma membrana bem fina a partir desta solução. No entanto, para fabricar 314 cm<sup>2</sup> foram necessários 50 mL desta solução. Disto torna-se inviável fabricar membranas luminescentes tanto pelo custo quanto pelo rendimento. Ademais, apesar da membrana fina formada ter aspecto de tecido maleável, elástico e autocolante, infelizmente a sua auto aderência prejudicou a análise. A Figura 19 mostra a membrana luminescente formada.



**Figura 19:** Membrana luminescente ultrafina obtida a partir da solução luminescente de BN/MEH-PPV sob luz ambiente.



Portanto, optou-se por depositar esta solução sobre as membranas de BN a fim de obter melhor rendimento, maior facilidade de manuseio e melhor custo benefício. Neste contexto, para verificar se tal procedimento iria interferir nas respostas óticas, fez-se a análise de Espectroscopia de absorção UV-vis primeiro, para então, dar continuidade à construção das membranas luminescentes de MEH-PPV/BN. A Figura 20, mostra o espectro de absorção das soluções de MEH-PPV e BN/MEH-PPV e da membranas de BN.

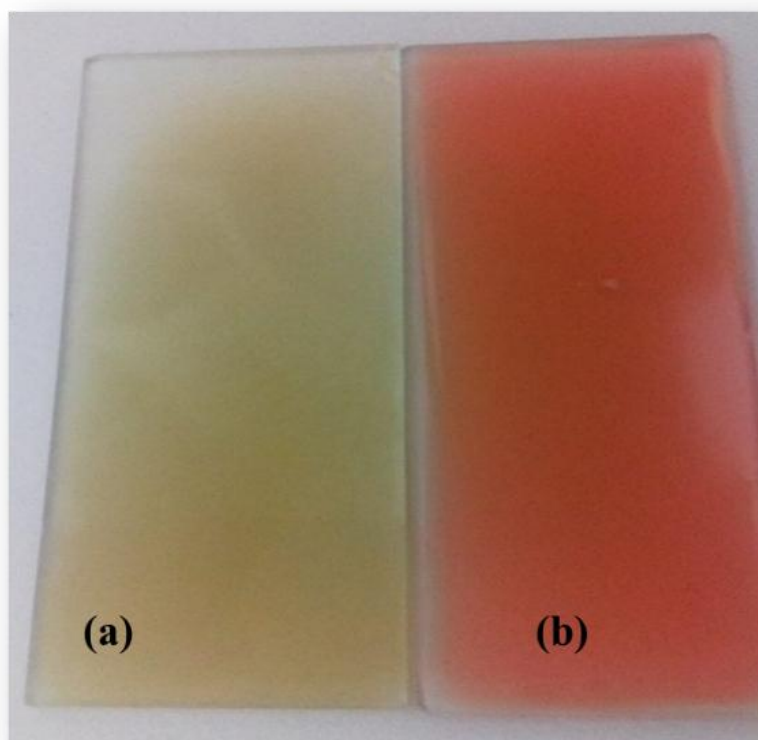


**Figura 20:** Espectroscopia de absorção UV-vis das soluções de BN (20 g/L), MEH-PPV (2,5 mg/L) e BN/MEH-PPV (1: 400 m/m) .

Através do espectro UV-vis verificou-se que dentro da região espectral analisada a BN não apresentou mínimo de absorção e as soluções de MEH-PPV e BN/MEH-PPV absorveram respectivamente em 498 e 512 nm. Diante desta análise verificou-se que apesar do pequeno deslocamento na região de absorção das soluções, a solução de BN/MEH-PPV continua absorvendo na região azul dentro do espectro eletromagnético. Sugere-se então que a deposição da solução luminescente possivelmente não irá prejudicar na construção da membrana luminescente de MEH-PPV/BN.

### 3.5 Membranas luminescentes de MEH-PPV/BN

Sobre a membrana de BN foram depositados, via *casting*, 2 mL da solução luminescente de BN/MEH-PPV. As membranas foram mantidas em ambiente escuro a 18°C para total evaporação do solvente. Ao final do processo, obteve-se membranas luminescentes de MEH-PPV/BN. A figura 21 mostra as membranas de BN e MEH-PPV/BN sob luz ambiente.



**Figura 21:** (a) Membrana de Borracha Natural e (b) Membrana luminescente de BN/MEH-PPV. Ambas sob luz ambiente.

A aparência amarelada da membrana de BN pura é característica da composição do látex In-Natura, ou seja, presença das fases de soro e fração de fundo, e por consequência todas as proteínas e resinas passíveis de estarem contidas no látex. Já a coloração avermelhada da membrana de MEH-PPV/BN é característico do composto orgânico conjugado MEH-PPV.

Paralelamente, fabricou-se (via *casting*) membranas luminescentes com diferentes camadas (até 10) contendo o polímero fotossensível a partir da deposição sucessiva de 2 mL da solução de BN/MEH-PPV.

## 3.6 Técnicas de Caracterização

A influência da radiação não ionizante nas propriedades ópticas, químicas, morfológicas, térmicas e citotóxicas das membranas luminescentes biocompatíveis foram avaliadas e estudadas por meio de espectroscopia de absorção no UV-Vis, luminescência, diagramas de cromaticidade e testes de citotoxicidade *in vitro*.

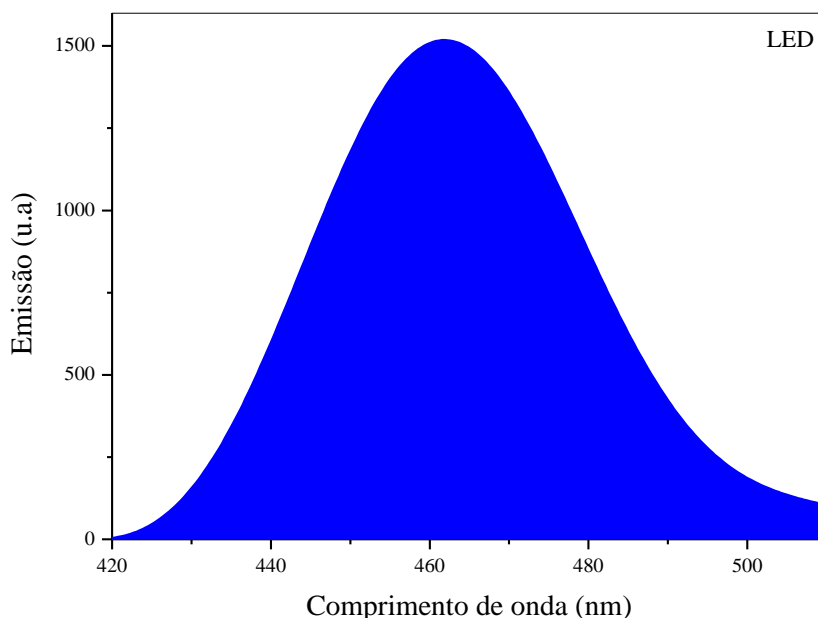
### 3.6.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Para a avaliação das regiões de absorção das membranas de BN e MEH-PPV/BN foi utilizado o espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50, operando numa faixa de 190 a 800 nm, com razão de scan de 600 nm.min<sup>-1</sup>. O equipamento está disponível na disponível no Laboratório de Tecnologia da Borracha Natural da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aldo E. Job.

### 3.6.2 Espectroscopia de Luminescência

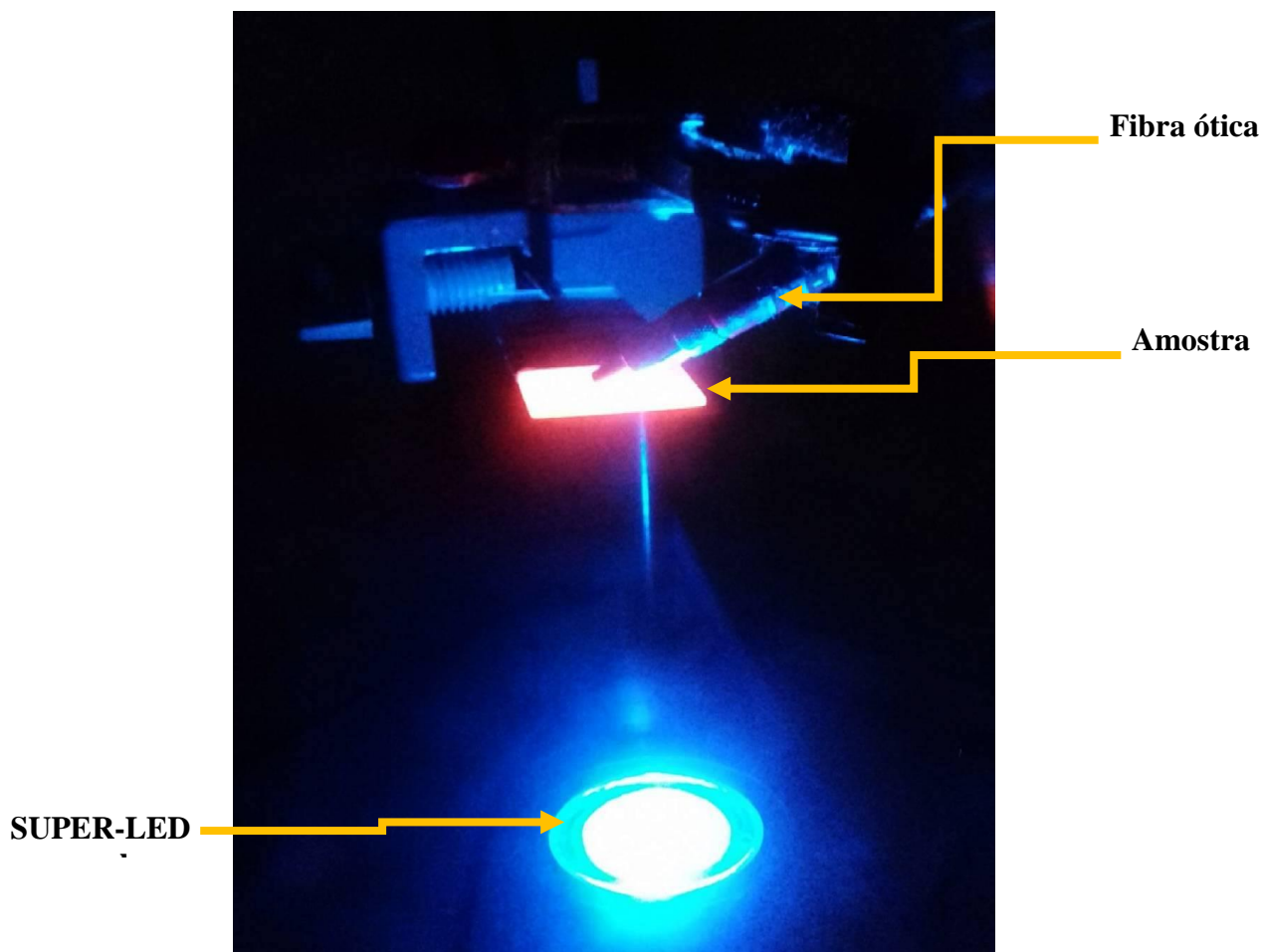
Para a avaliação das regiões de excitação e emissão das membranas foi utilizado o espectrofluorímetro de bancada PerkinElmer Modelo LS55, o qual é equipado com lâmpada de Xenônio pulsante para análise de Fluorescência e de Fosforescência de 9,9 Watt de potência, com indicador de tempo de deterioração /decaimento. Excitação no intervalo de 200 a 800 nm e emissão no intervalo de 200 a 900 nm com comando de ordem zero selecionável. Fotomultiplicadora R928 PMT disponível para toda a escala e sincronidade de varredura com comprimento de onda constante ou da diferença de frequência incluída. Os espectros de excitação foram corrigidos automaticamente. Excitação variável de 2,5 nm até 15 nm e fenda da emissão de 2,5 nm até 20 nm em 0,1 de incremento de fenda. As velocidades da varredura foram selecionadas em incrementos de 1 nm e velocidades de varredura de 10 à 1500 nm/minuto. Também está equipado com uma roda de filtros controlada por software no monocromador de emissão, com filtros de interrupção em 290 nm, 350 nm, 390 nm, 430 nm e 515 nm, um atenuador de 1% T e um modo de feixe desobstruído. No caso das medidas efetuadas neste equipamento, utilizou-se acessório para amostra sólida com detecção do tipo *front face* e suporte de sílica fundida para acondicionar as amostras. O equipamento utilizado está disponível no Laboratório de Luminescência em Materiais e Sensores (LLuMeS) da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Pires.

Para acompanhar o processo de fotodegradação da camada ativa em tempo real das membranas luminescentes foi utilizado o Espectrofotômetro *Ocean Optics USB 2000*. E a este foi acoplado a uma lâmpada de LED *Spot Light* azul ( $\lambda$  máx = 460 nm, MCL 127-00-F), como fonte de excitação das amostras. A Figura 22 mostra o espectro de emissão do LED utilizado, o qual apresenta região de sobreposição com os espectros de absorção do material luminescente utilizado, o MEH-PPV. Tal sobreposição justifica sua utilização neste trabalho.



**Figura 22:** Espectro de emissão do LED azul utilizado para excitação das membranas luminescentes biocompatíveis de BN/MEH-PPV.

Para a realização das medidas de emissão das membranas luminescentes biocompatíveis foi ajustado um suporte de amostras. A esse suporte foi acoplado acessos ópticos para a fixação da fibra óptica. Por sua vez, a fibra óptica guia a resposta de emissão das membranas investigadas e da fonte de excitação para o espectrofotômetro. Essa fibra está conectada a um computador para aquisição e tratamento dos sinais captados. A amostra foi posicionada a 8 cm da fonte de excitação e a radiância obtida foi de  $40 \mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$ . Optou-se por essa radiância por ser utilizada no tratamento de fototerapia para neonatos com hiperbilirrubinemia. A Figura 23 mostra o sistema construído para a investigação da luminescência das membranas.

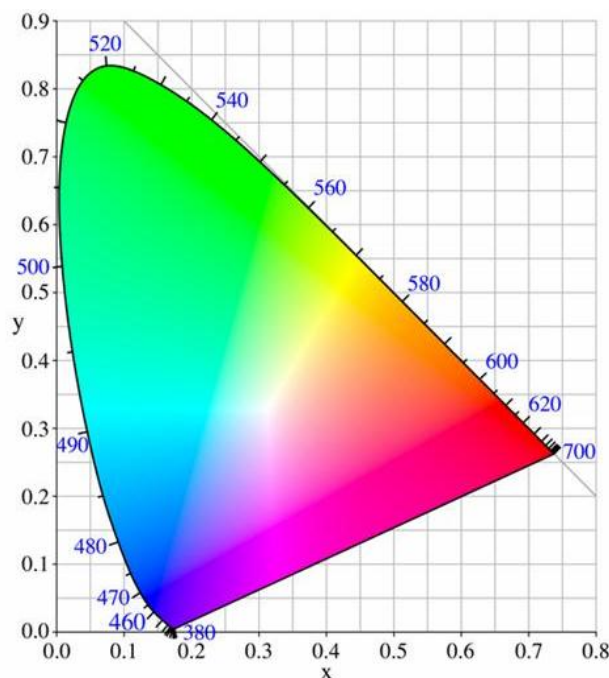


**Figura 23:** Sistema adaptado para investigação da luminescências das membranas de BN/MEH-PPV em função do tempo de exposição à radiação não ionizante (azul).

O equipamento está disponível no Laboratório de Polímeros e Propriedades Eletrônicas de Materiais – LAPPEM, do Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo F. Bianchi.

### 3.6.4 Medidas de Cromaticidade

O diagrama de cromaticidade da membrana foi confeccionada a partir das coordenadas cromáticas extraídas do espectro de luminescência. O *software Color Calculator*, desenvolvido pela empresa *Radiant Imaging* foi adquirido de forma gratuita e está disponível para download <sup>175</sup>. O *software* fornece o diagrama de cromaticidade quando lhe são dadas as coordenadas  $x$  e  $y$  de determinada cor. O traçado dos valores normalizados de  $x$  e  $y$  para as cores no espectro visível resulta na curva ilustrada na Figura 26 conhecida como Diagrama de Cromaticidade.



**Figura 24:** Modelo para construção do Diagrama de Cromaticidade<sup>173</sup>.

### 3.6.5 Espectroscopia de absorção no infravermelho- *FTIR modo ATR*

A análise química qualitativa foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). O equipamento da marca Bruker, modelo Vector 22, investigou na região entre 4000 - 570  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras. O equipamento está disponível na disponível no Laboratório de Tecnologia da Borracha Natural da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aldo E. Job.

### 3.6.6 Microscopia Confocal

Para obtenção de imagens de alta resolução através de cortes ópticos foi utilizado o Microscópio Confocal Nikon modelo C2/C2si com um sistema avançado de microscópio invertido (Eclipse Ti-E). O sistema também inclui captura de imagens fluorescentes confocais em quatro canais (Laser 1 = 405 nm; Laser 2 = 488 nm; Laser 3 = 561 nm; Laser 4 = 640 nm) e capacidades espectrais amplamente expandidas, com a habilidade de capturar e discriminar dados adquiridos em qualquer resolução de canal, ao longo de toda a largura de banda do detector. O equipamento está disponível na disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de

Presidente Prudente, sob responsabilidade do prof. Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

### **3.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A caracterização morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura fabricado pela Carl Zeiss modelo EVO LS 15. O MEV permitiu a obtenção de imagens ampliadas e tridimensional da amostra, com alta resolução e profundidade de campo, a partir da interação de um feixe de elétrons com o material. O equipamento está disponível na disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura (LabMMEV) da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, sob responsabilidade do prof. Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

### **3.6.8 Microscopia de Força Atômica**

A caracterização da superfície das membranas luminescentes biocompatíveis foi realizada por Microscopia de Força Atômica-AFM, o Nanosurf, modelo easyScan 2, equipado tanto com o Modo contato quanto com o Modo contato intermitente (*tapping*). Este equipamento nos permite, através das medidas das interações entre a ponteira e a superfície da amostram, informações a respeito de rugosidade e porosidade em escalas micro e nanométricas. O equipamento está disponível na disponível no Laboratório de Dispositivos e Sensores Orgânicos (LaDSOr) da Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, sob responsabilidade do prof. Prof. Dr. Neri Alves.

### **3.6.9 Testes de Citotoxicidade *in vitro***

#### **Linhagem celular**

A linhagem celular usada neste estudo foi a CHO-K1 (Células de Ovário de Hamster Chinês). As células foram cultivadas em 10 mL de DMEM/F10 (Sigma) suplementada com 10% soro bovino fetal em frascos de 25-cm<sup>2</sup> e mantidas em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

#### **Protocolos de exposição de citotoxicidade *in vitro***

As análises de citotoxicidade *in vitro* foram realizadas sob as seguintes condições detalhadas a seguir:

a) Membranas luminescentes de MEH-PPV/BN não expostas à radiação azul (C1BDg), com o objetivo de se conhecer o potencial tóxico das membranas antes da sua degradação.

b) Membranas luminescentes de MEH-PPV/BN expostas à radiação azul (C1DDg), com o objetivo de avaliar se as membranas liberam compostos durante a sua degradação, ficando disponível para entrar em contato direto com a pele.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* do material foi realizada por meio de extrato e do contato direto. Para o teste de citotoxicidade por meio de extrato, os extratos líquidos das amostras C1BDg e C1DDg foram obtidos seguindo as normas ASTM F619 (2014)<sup>156</sup>. A amostra foi cortada em pedaços, misturados com a solução de extração (Solução fosfato tamponada [PBS], pH 7.4) na proporção de 60 cm<sup>2</sup> /20 mL, e mantidas nestas condições durante 24 horas sem agitação, com ou sem exposição à radiação azul. Após 24 horas, os pedaços sólidos do material foram removidos, e os extratos líquidos foram filtrados e o pH ajustado para 7,4, quando necessário. Após a preparação dos extratos, as células (1,0 × 10<sup>5</sup> células por poço) foram expostas a 200 µL dos extratos obtidos a partir de C1BDg e C1DDg. Para comparação, as células também foram expostas à extratos obtidos a partir de membrana de borracha natural (NR) ou PBS como controle negativo (NC) durante 24 h. Uma quantidade igual de meio de cultura (200 µl) foi adicionado a cada poço. Após o período de exposição, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT (Mosmann, 1983)<sup>168</sup>. Para o método de redução do MTT, foi adicionado 0,3 mg/ml de solução de MTT e as células foram incubadas a 37 °C durante 4 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido, e adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância de cada amostra foi determinada a 492 nm usando um leitor de microplacas. A absorbância do CN foi considerada como 100% de viabilidade celular (CV). A CV das outras amostras foi determinada utilizando a seguinte fórmula:  $CVE = [(AE - AB) / (ANC - AB)] \times 100$ , em que a viabilidade CVE = Viabilidade celular das células expostas ao extrato; AE = absorbância de células expostas ao extrato; ACTR = absorbância de células expostas a PBS; e AB = absorbância do branco (poço contendo somente meio de cultura).

Para o teste de citotoxicidade por meio do contato direto, foram usados fragmentos quadrados das amostras C1BDg no tamanho de 100 mm<sup>2</sup> esterilizados com óxido etileno. A suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 6 poços a 37°C para a formação da monocamada celular. Em seguida, fragmentos dos compósitos ou fragmentos de vidros atóxicos (NC) foram colocados no centro da placa em contato com as células por um período



de 24 horas. Após o período de exposição, a citotoxicidade foi avaliada pelo método do corante cristal violeta. As análises de citotoxicidade foram feitas baseadas em observações macroscópicas e microscópicas, onde foi levado em consideração o tamanho do halo formado, que foi medido com o auxílio de um paquímetro. Entende-se por halo a região clara, sem coloração pelo cristal violeta, limítrofe entre as células e o material testado e que indica lise celular. O grau de citotoxicidade do material foi baseado no tamanho do halo baseando-se na norma ASTM F813<sup>177</sup>, onde: nenhum halo detectado significa nenhuma citotoxicidade (grau 0); halo limitado à amostra significa citotoxicidade leve (grau 1), halo menor que 0,5 cm significa citotoxicidade branda (grau 2), halo entre 0,5 a 1 cm significa citotoxicidade moderada e halo maior que 1 cm significa citotoxicidade severa (grau 3).

Paralelamente aos testes supracitados, buscou-se investigar a citotoxicidade por meio de contato direto em função do número de camadas (contendo o polímero fotossensível MEH-PPV) depositadas sobre a matriz polimérica de Borracha Natural. Os valores dos respectivos tamanhos dos halos entre as células e as membranas investigadas, expostas por 24 horas, foram classificadas segundo a ISO 10993/2009.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram comparados por análise paramétrica (ANOVA) utilizando-se o método Student-Newman-Keuls ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em conformidade com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância). E para  $p < 0,05$  foi considerado significativo, e os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP.

As análises foram realizadas na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-Apta de Presidente Prudente, sob responsabilidade do Dr. Eidi Yoshihara

## 4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

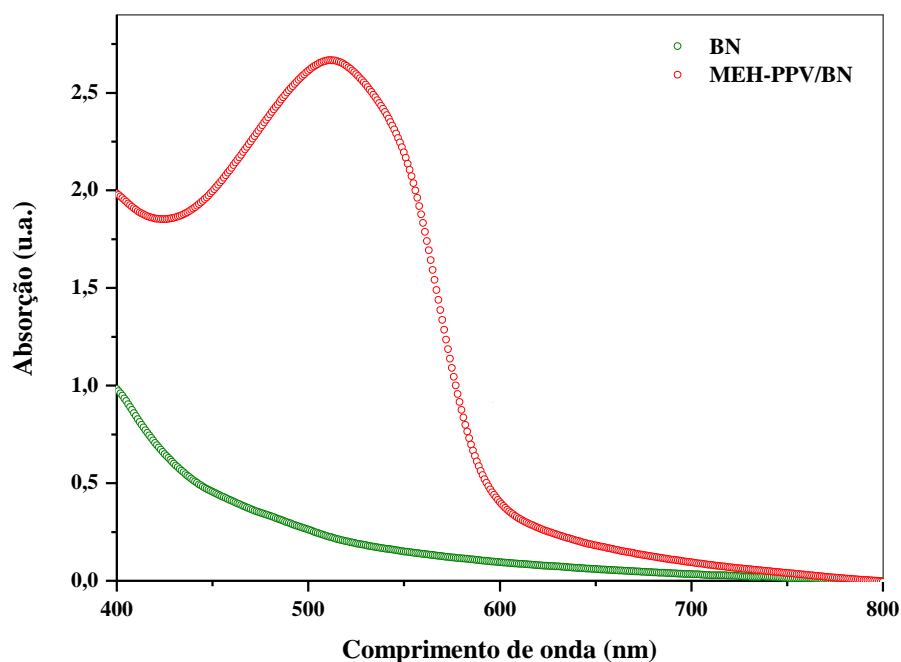
Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidas por meio de espectroscopia de absorção UV-Vis, de luminescência e de absorção no infravermelho- FTIR, microscopia confocal, de força atômica e eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial e análise de citotóxica *in vitro* das membranas do polímero luminescente MEH-PPV em matriz de borracha natural.

### 4.1 Caracterização Ótica

Para estudar a efeito da radiação não ionizante nas propriedades ópticas das membranas de BN e MEH-PPV/BN foram realizadas medidas de espectroscopia de absorção, emissão e fotodegradação desses sistemas preparados à temperatura ambiente. O efeito da irradiação da luz azul nas membranas foi investigado usando as mesmas condições para o tratamento da icterícia neonatal  $40 \mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$  de irradiância durante 24 horas. Portanto, nesta etapa de caracterização são apresentados os resultados experimentais de medidas de absorção e luminescência das membranas de BN e MEH-PPV/BN expostos ou não à radiação azul. Também são apresentados os diagramas de cromaticidade para a possível observação da alteração de cor das membranas quando expostas a luz azul. Sendo assim, as membranas foram caracterizadas conforme os procedimentos experimentais apresentados no capítulo 3, itens 3.6.1 a 3.6.4.

#### 4.1.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

Neste item são apresentados os resultados obtidos utilizando a técnica de caracterização de espectroscopia de Ultravioleta Visível para as membranas de BN e MEH-PPV/BN. Na Figura 25 encontra-se os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) obtidos a partir das membranas de borracha natural e MEH-PPV/ BN.



**Figura 25:** Espectroscopia de absorção UV-Vis das membranas de BN e MEH-PPV/BN.

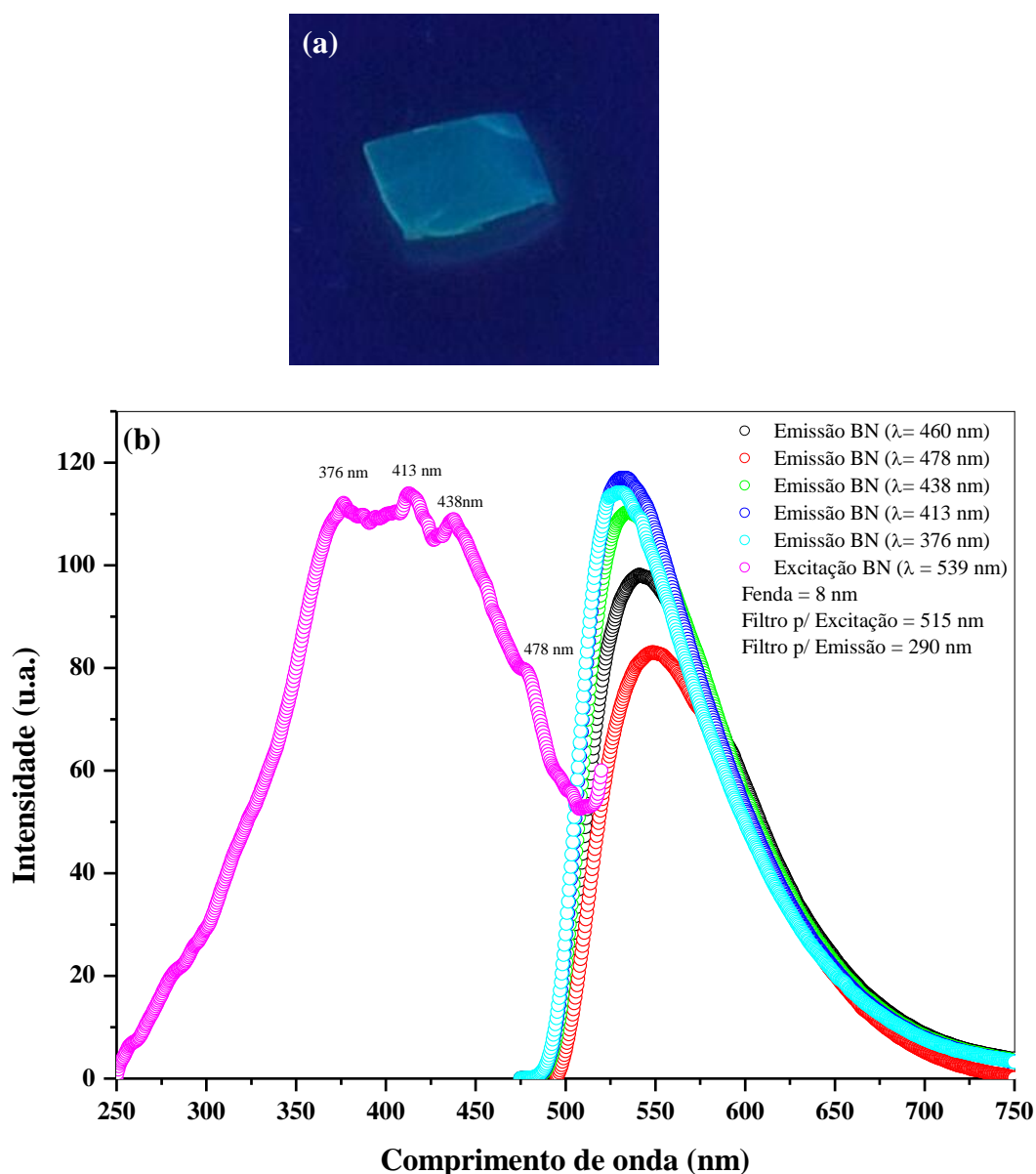
A partir da Figura 25, pode-se observar que a membrana de BN não apresenta banda de absorção dentro do intervalo de comprimentos de onda investigados. Por outro lado, a banda de absorção principal da membrana MEH-PPV/BN ocorre em 512 nm. Este valor foi o mesmo encontrado para solução de BN/MEH-PPV, demonstrando assim que a matriz não interferiu no processo de absorção da membrana. No entanto, quando se compara o valor de absorção da solução de MEH-PPV (Figura 20) com o da membrana de MEH-PPV/BN observa-se que houve um pequeno deslocamento do comprimento. Atribuiu-se a esse pequeno deslocamento da banda de absorção de 495 nm para 512 nm à composição da membrana de BN, ou seja, à presença de carotenoides, lipídios, proteínas e resinas uma vez que não foi realizado o processo de centrifugação e remoção das fases soro e fração de fundo. Outrossim, os complexos de *Frey-Wyssling* presentes na membrana de BN conferiram à mesma a coloração amarela diminuindo assim o seu percentual de transmitância. No entanto o processo de absorção da membrana luminescente não foi prejudicado, portanto a membrana de BN pode atuar como matriz passiva.

Retomando a análise da figura 25, tem-se que a baixa transmitância, reflete a intensa absorção da membrana dentro da faixa de comprimento de onda investigado. Ademais,

observou-se também que a absorção tornou-se mais intensa para comprimentos de onda menores que 400 nm, o que é um comportamento típico de estruturas orgânicas<sup>60</sup>.

#### 4.1.2 Espectroscopia Luminescência

Optou-se por investigar as características luminescentes das membranas de BN e MEH-PPV/BN através da técnica de emissão fluorescente. Neste contexto, são apresentadas nas Figuras 26 a 28 os espectros de excitação e emissão, das respectivas membranas supracitadas, obtidos a partir de um espectrofluorímetro e suas respectivas imagens obtidas sob radiação.



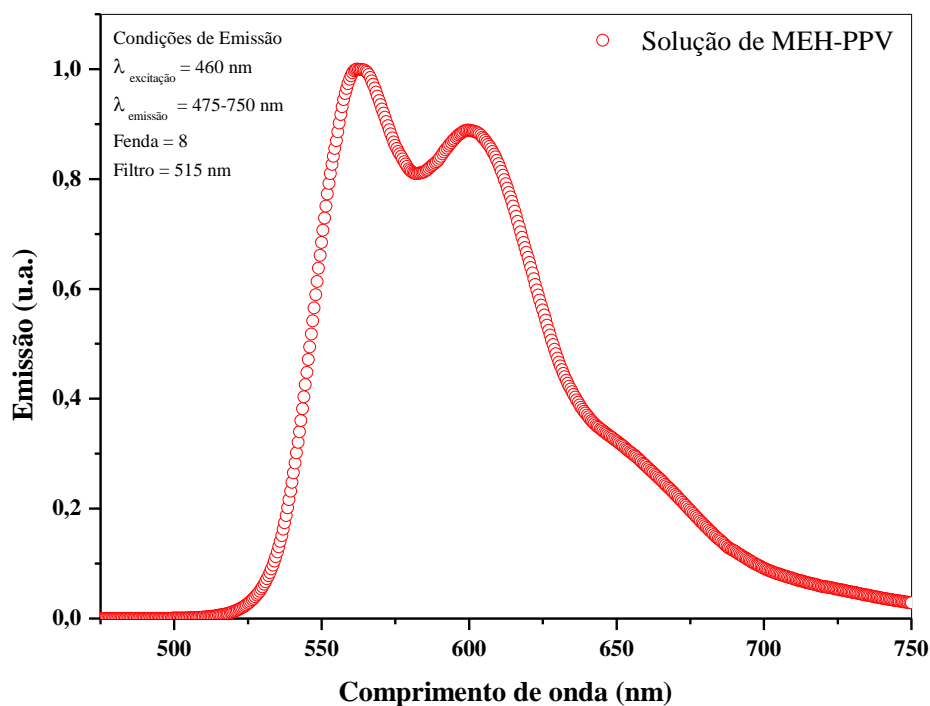
**Figura 26:** (a) Imagem da membrana de BN obtida sob radiação UV e (b) Espectros de excitação e emissão da membrana de BN obtidos por fluorescência.

Sabendo-se que a membrana de BN contém diferentes componentes, investigou-se o comportamento ótico com irradiação ou excitação fixada em 460, 478, 438, 413 e 376 nm, conforme apresentado na Figura 26(b). O espectro de excitação foi obtido fixando o comprimento de onda de emissão em 539 nm e varrendo os comprimentos de onda de excitação de 250 a 520 nm. Neste contexto, a partir da identificação da principal banda de emissão, foi obtido o espectro de excitação, que permitiu determinar as bandas responsáveis por cada emissão. E através dos resultados das bandas de emissão foi possível sugerir que há na membrana de borracha natural pelo menos um luminóforo. A tabela 3 mostra a relação entre os comprimentos de onda de excitação e suas respectivas respostas óticas.

**Tabela 3:** Relação entre os comprimentos de onda de excitação e emissão.

<b>Tabela 3: Relação <math>\lambda_{ex}</math> <math>\lambda_{em}</math></b>	
Excitação ( $\lambda_{ex}$ )	Emissão máxima ( $\lambda_{em}$ )
460	539
478	547
438	533
413	530
376	530

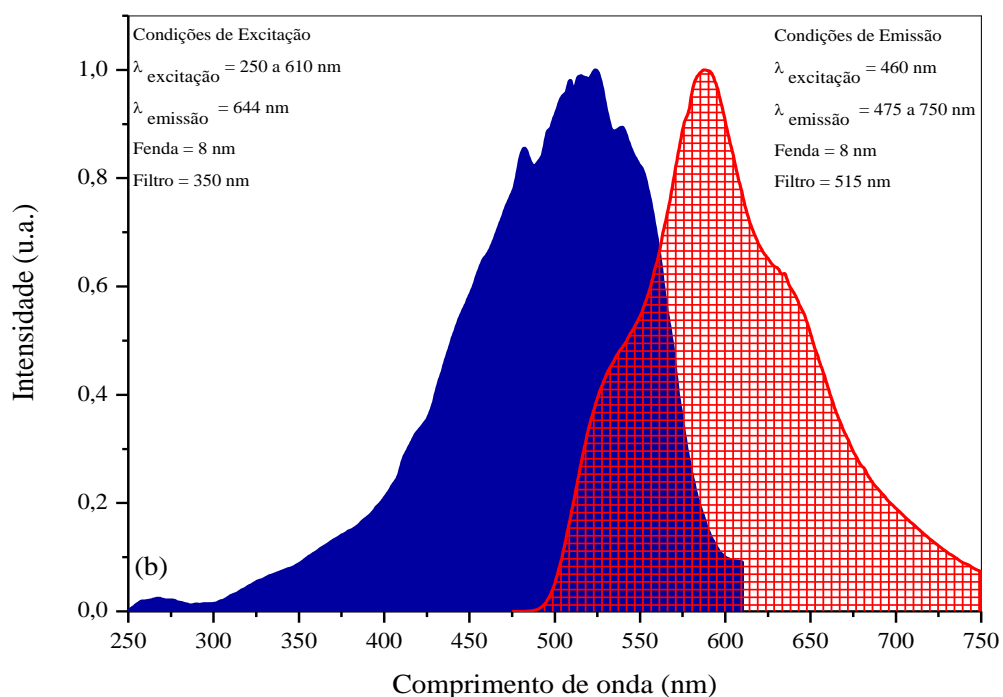
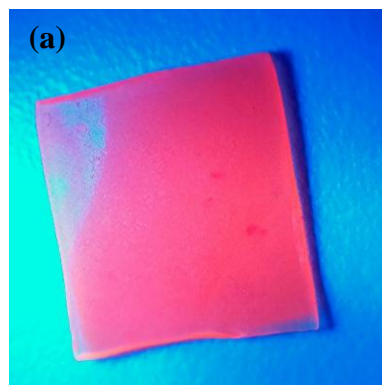
Realizou-se, também, a investigação do comportamento ótico para a solução de MEH-PPV (Figura 27).



**Figura 27:** Espectro de emissão da solução de MEH-PPV 2,5 (mg/L) obtido por fluorescência.

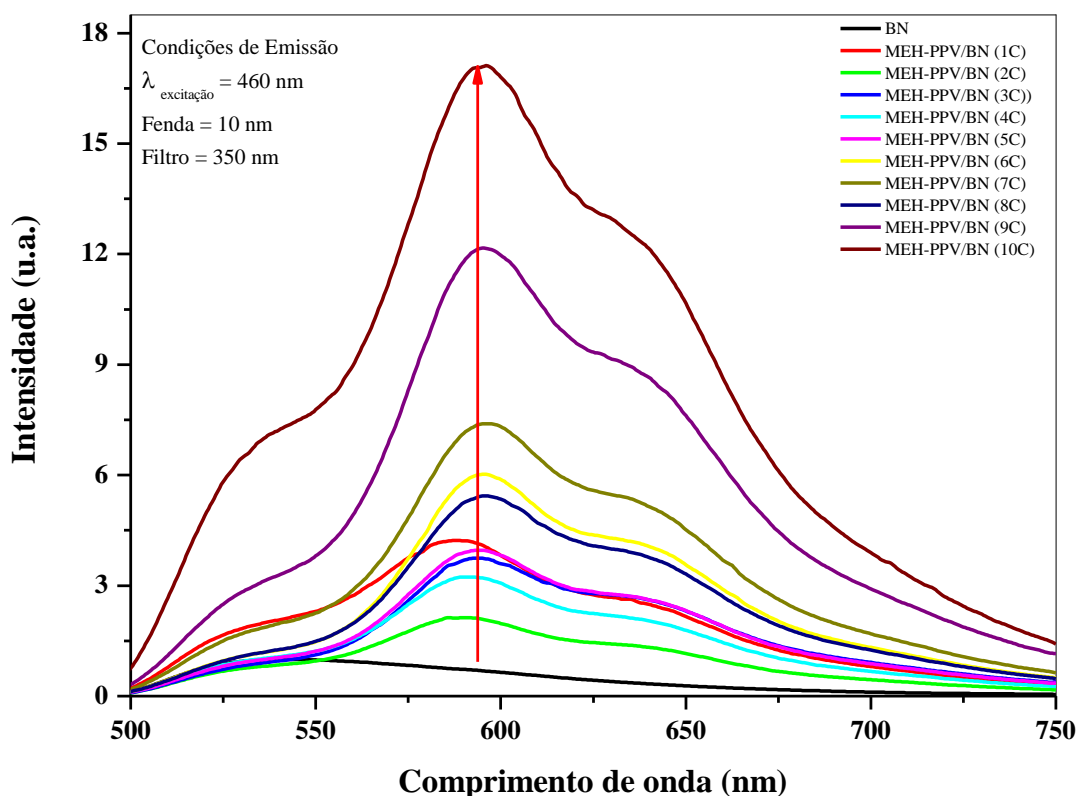
A partir do espectro de emissão da solução de MEH-PPV (Figura 27) em tolueno foi possível observar que dentro da faixa de comprimento de onda investigada (475 a 750 nm) e com excitação fixada em 460 nm, que a solução luminescente apresentou emissão na região do vermelho, gerando uma banda larga com dois “ombros” bem característicos, um em 563 nm e o outro 600 nm e um terceiro. De posse desses resultados, foi possível interpretar a emissão da membrana de MEH-PPV/BN bem como os efeitos ocasionados com a incorporação do polímero conjugado MEH-PPV, como camada ativa. Portanto, para a membrana de MEH-PPV/BN, a emissão também foi avaliada na faixa de 475 a 750 nm, com excitação fixada em 460 nm, conforme apresentado na Figura 31 (b). Ademais, o espectro de excitação foi obtido fixando o comprimento de onda de emissão em 460 nm e varrendo os comprimentos de onda de excitação de 250 a 610 nm.

Através da Figura 28 foi possível observar em (a) a luminescência da membrana MEH-PPV/BN sob exposição a luz azul e em (b) que a irradiação ou excitação em 460 nm provocou emissão no vermelho dentro na região do espectro eletromagnético visível, gerando uma banda larga com seu máximo centrado em 588 nm, com dois ombros, um em 533 nm e outro em 635 nm.



**Figura 28:** (a) Imagem da membrana de MEH-PPV/BN obtida sob radiação azul-460nm e (b) Espectros de excitação e emissão da membrana luminescente de MEH-PPV/BN obtidos por fluorescência.

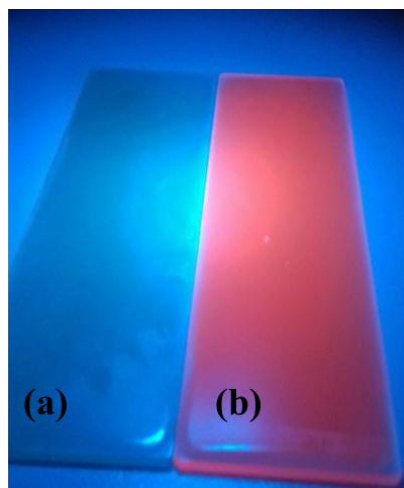
Com o intuito de se investigar se houve sobreposição da camada ativa sobre a membrana de BN, buscou-se construir números de camadas de material luminescente. A figura 29 mostra as emissões das membranas com diferentes camadas de material luminescente. As camadas foram construídas via *casting* por deposição da solução de BN/MEH-PPV (1: 400 m/m).



**Figura 29:** Espectros de emissão da membrana luminescente de MEH-PPV/BN obtidos por fluorescência com diferentes camadas de material luminescente. Legenda: C (camada).

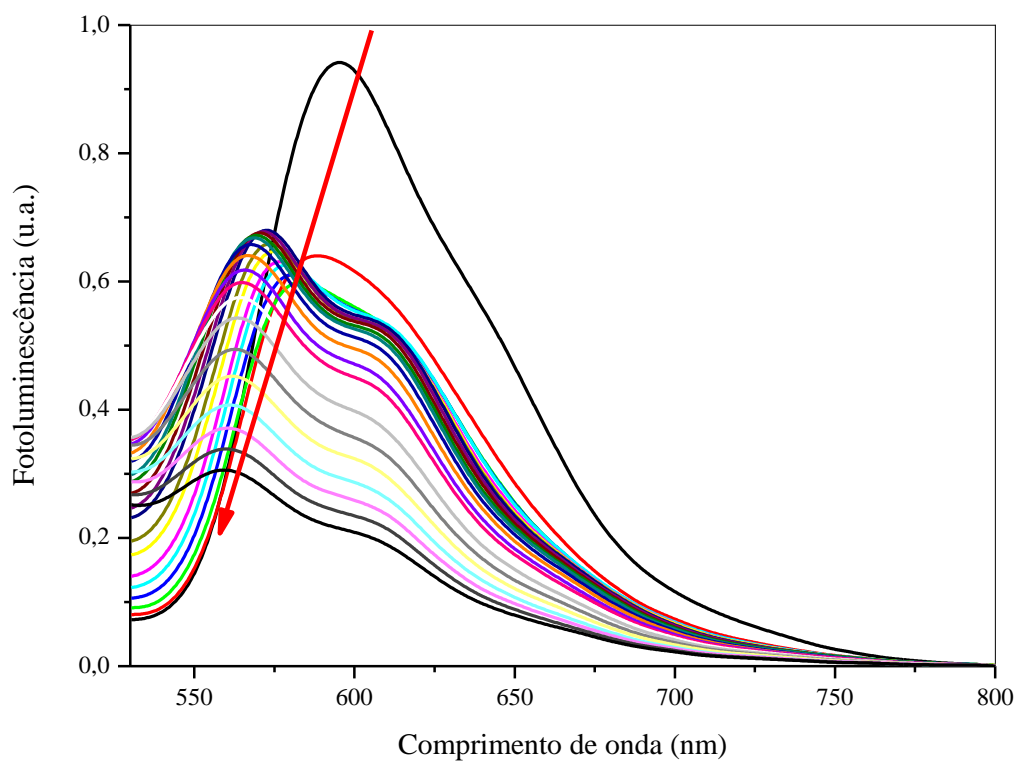
Nota-se através da Figura 29 que houve sobreposição da camada ativa (polímero luminescente) sobre a membrana de BN, prevalecendo somente às características do MEH-PPV. Isto demonstra que a matriz de BN na membrana não interferiu nos processos fotoquímicos e foto físicos do polímero luminescente. Em contrapartida a deposição da solução luminescente de BN/MEH-PPV, via *casting*, sobre a matriz de BN não foi proporcional à construção de camadas. Tal fato pode ser justificado pelo aumento da concentração de MEH-PPV que propiciou processos de interação intermoleculares (formação de dímeros, formação de excímeros, transferência não radiativa de energia e transferência radiativa de energia) que diminuem a intensidade de fotoluminescência<sup>161</sup> em algumas camadas. Também, há a possibilidade que as camadas com material luminescente exerçam o papel de filtro interno, diminuindo a intensidade de radiação emitida pelo polímero que chega ao detector. Portanto, como não houve uma relação de proporcionalidade entre intensidade de emissão e camada/concentração do cromóforo optou-se, neste trabalho, por investigar somente a luminescência em tempo real da membrana de MEH-PPVBN (1C) sob fototerapia neonatal.





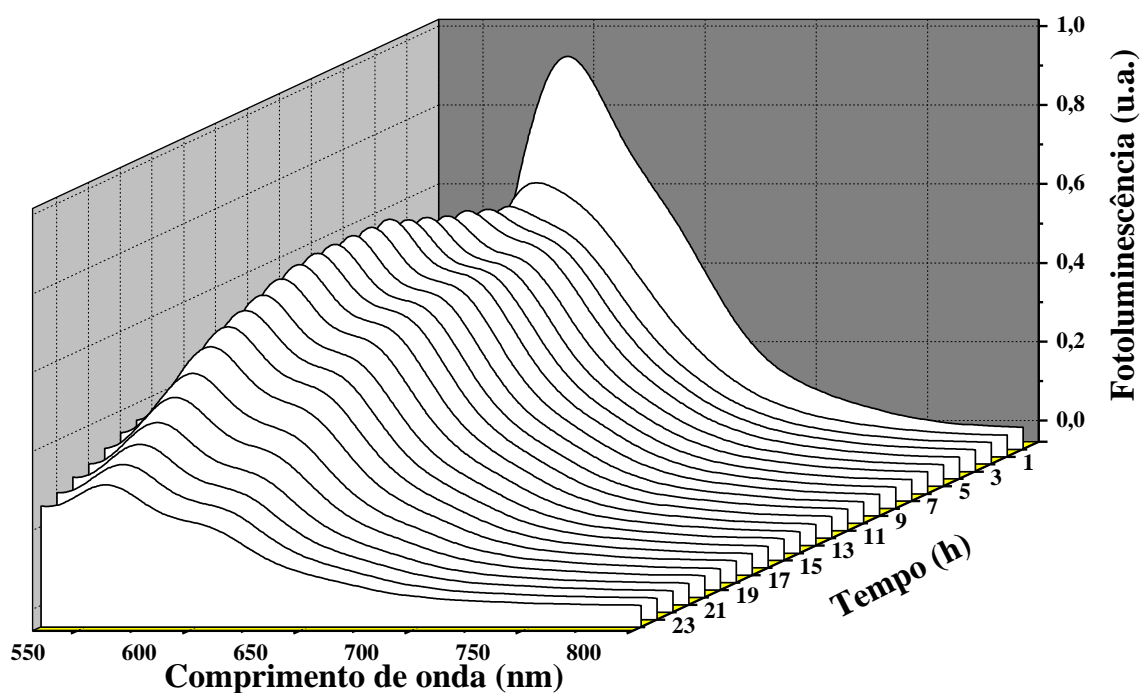
**Figura 30:** Imagem obtida das membranas de BN e MEH-PPV/BN sob exposição ao tratamento fototerápico para icterícia neonatal.

Após a caracterização dos espectros de absorção (item 4.1.1) e emissão (item 4.1.2) das membranas de BN MEH-PPV/BN, estas foram expostas à luz azul, sob as mesmas condições usadas em fototerapia neonatal, e suas propriedades óticas foram caracterizadas periodicamente.



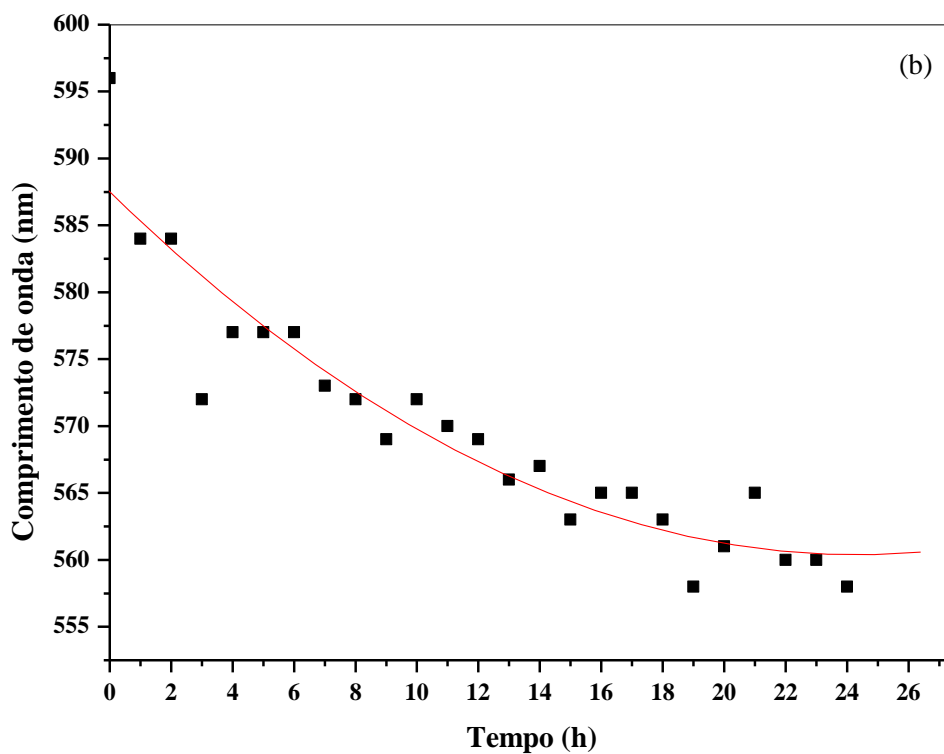
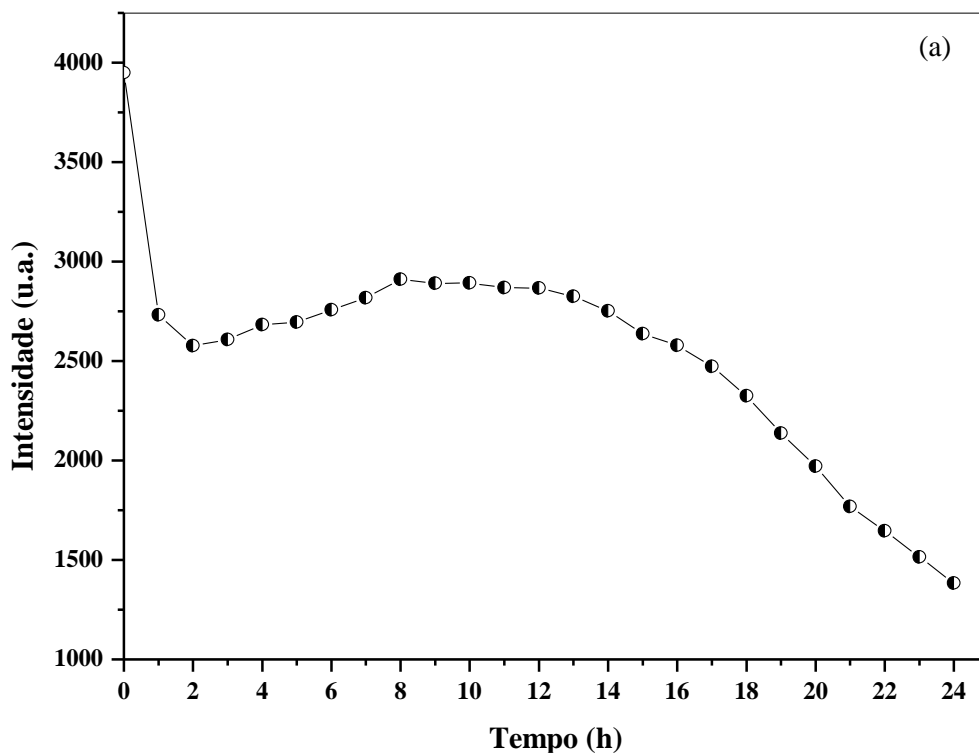
**Figura 31:** Efeito da luz azul ( $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 460 nm) por tempo de exposição ( $t_e = 24 \text{ h}$ ) sobre a membrana do MEH-PPV/BN.

A Figura 31 mostra a avaliação do efeito da luz azul (460 nm) sobre a membrana luminescente. Através do espectro de fotoluminescência da membrana MEH-PPV/BN pode-se observar uma diminuição da intensidade da luminescência em função do tempo de exposição à radiação por 24 horas. Neste contexto, o espectro de Fotoluminescência (PL) para a membrana MEH-PPV/BN se assemelha aos resultados relatados por Ferreira et al (2017) descritos sobre a influência da radiação não-ionizante, especialmente luz azul. No entanto, para melhor compreender o comportamento de membrana de MEH-PPV/BN quando exposta à luz azul foi projetado o espectro de PL em visão tridimensional (3D).



**Figura 32:** Visão tridimensional dos espectros de PL para o efeito da radiação não ionizante (luz azul) sobre a membrana de MEHPPV/BN.

Neste cenário, pode ser visto a partir da Figura 32 que a diminuição da intensidade não foi linear e este resultado também pode ser confirmado pela Figura 33 (a). Em contrapartida, observou-se que deslocamento dos espectros em direção a comprimentos de onda menores. Esse comportamento, também chamado de *blue shift* (taxa do deslocamento para o azul) pode ser confirmado através da figura 33 (b).



**Figura 33:** (a) Gráfico do comportamento de intensidade e (b) e do comprimento de onda em função do tempo de exposição à luz azul por 24 h.

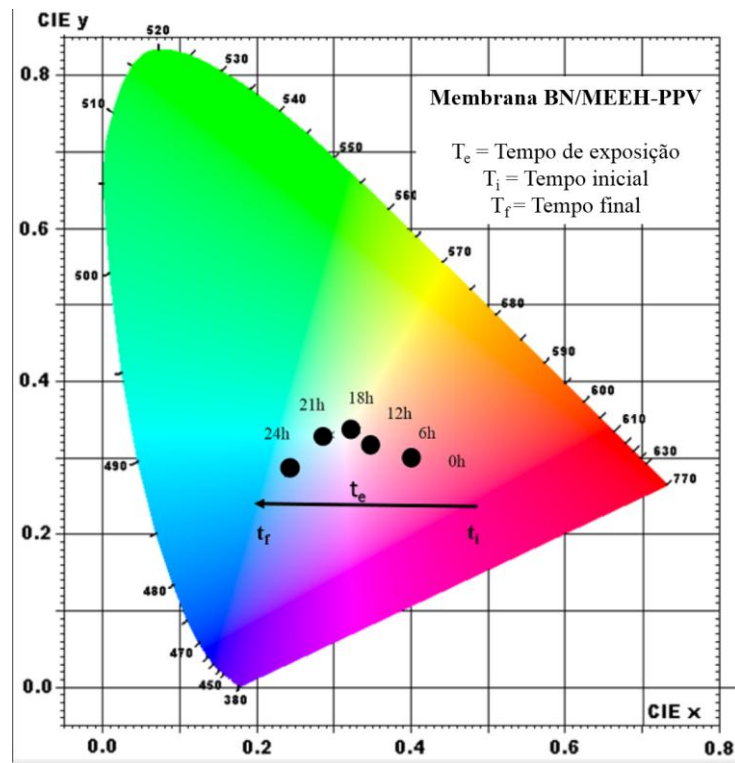
Diante dos resultados apresentados, pode-se justificar que o deslocamento observado dos máximos de fotoluminescência para menores comprimentos de onda bem como da

diminuição da intensidade desses espectros, são característicos dos processos de fotooxidação da cadeia polimérica principal do MEH-PPV que levam à substituição das ligações vinílicas ( $C = C$ ) por carbonilas ( $C = O$ )<sup>193</sup>. Ademais, o deslocamento *blue shift* é resultante da diminuição do comprimento conjugação do MEH-PPV. Portanto, deve ser concluir que a mudança de cor está intimamente relacionada com o processo de fotodegradação de MEH-PPV.<sup>194,195</sup>

Por outro lado, a qualidade-intensidade de luz emitida depende da regularidade da superfície da camada ativa, neste caso o MEH-PPV, e o aumento de intensidade PL pode ser induzido por um irradiação a laser no ar, quando a espessura do filme excede a profundidade de penetração da luz excitante<sup>196</sup>. Neste contexto, este aumento da PL observado na membrana luminescente pode estar relacionado possivelmente a: i) um processo de “fotopolimerização”, ou seja, uma polimerização induzida por luz em virtude da etapa final do processo de polimerização (eliminação) em algumas porções da cadeia polimérica não ter sido realizada por completo; e/ou ii) uma eficiente difusão espectral de cargas excitadas dentro da cadeia polimérica ainda não degradada por um processo de transferência de energia *Förster* como já relatado na literatura<sup>197</sup>. Outra possibilidade a ser mencionada sobre este comportamento da PL supracitado é a utilização da técnica de fabricação das membranas por *casting*, uma vez que, tal procedimento não permite o alinhamento das cadeias poliméricas da BN<sup>32</sup>. Além disso, Schwartz et al, em seu estudo sobre a influência da conformação estrutural e da morfologia dos filmes para a transferência de energia e interações intercadeias em polímeros conjugados apontou a dependência das propriedades eletrônicas dos polímeros conjugados com a conformação estrutural das cadeias e com o processo de fabricação dos filmes poliméricos. Em suma, mostra que a transferência de energia é dependente do método de processamento, grau de contato entre cadeias, concentração, escolha do solvente, tratamento térmico, entre outros<sup>197</sup>.

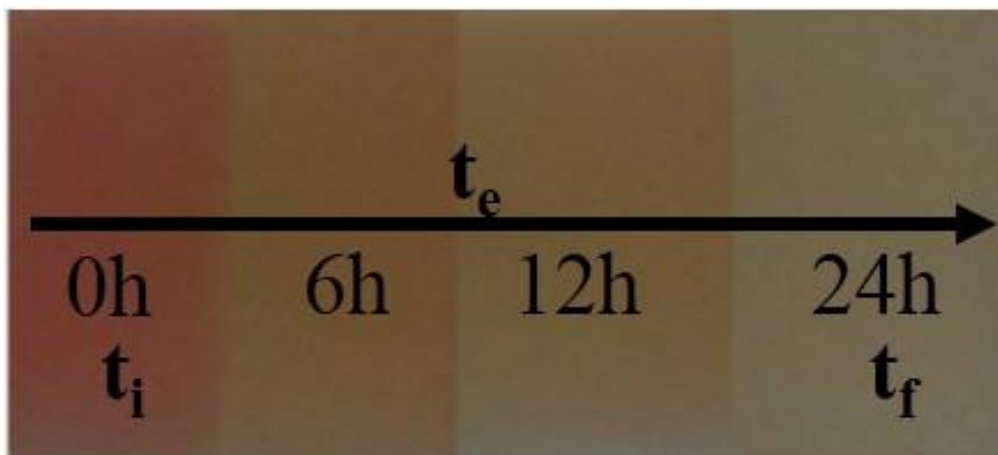
Assim como já foi mencionado, as mudanças nas propriedades óticas da camada ativa da membrana luminescente está intimamente relacionada à mudança de cor e são de extrema importância para a confecção de dispositivos colorimétricos do tipo sensor de radiação. Portanto, a mudança de cor permitirá uma fácil leitura da distribuição de dose bem como acompanhamento em tempo real da exposição à radiação. Sendo assim, no intuito de ilustrar as mudanças de cores ocorrida, foi obtido o diagrama de cromaticidade da membrana de MEH-PPV/BN para representar as alterações das cores refletidas e emitidas da membrana

luminescente sob diferentes tempos de exposição. O diagrama (Figura 34) foi construído conforme procedimento experimental apresentado no capítulo 3



**Figura 34:** Diagrama de cromaticidade CIE (1931) representando as mudanças de cor emissão ao longo da exposição à luz azul. O diagrama foi obtido usando os espectros de PL mostrados na Figura 31. E o Radiant Imaging Color Calculator Software Livre. Nota: tempo de exposição ( $t_e$ ), tempo inicial ( $t_i$ ), hora final ( $t_f$ ).

Dos resultados mostrados na Figura 34 observa-se que a exposição da membrana luminescente à luz azul provoca a mudança da cor emitida de vermelho para o transparente após 24 h de exposição radiação. Esses resultados são úteis não apenas para a confecção de uma tabela de cores comparativa com diferentes pontos de dose versus cor, como também para o desenvolvimento de sensores nos quais a emissão de radiação vermelha indique que o tempo de radiação necessário ao tratamento, ainda não foi alcançado, enquanto a emissão de luz branca indica que a exposição à radiação foi suficiente. Veja na Figura 35 o degrade de cores em função do tempo de exposição ao tratamento fototerápico.



**Figura 35:** Imagem da membrana luminescente sob luz ambiente, obtida em diferentes tempos de exposição ao tratamento fototerápico com luz azul.

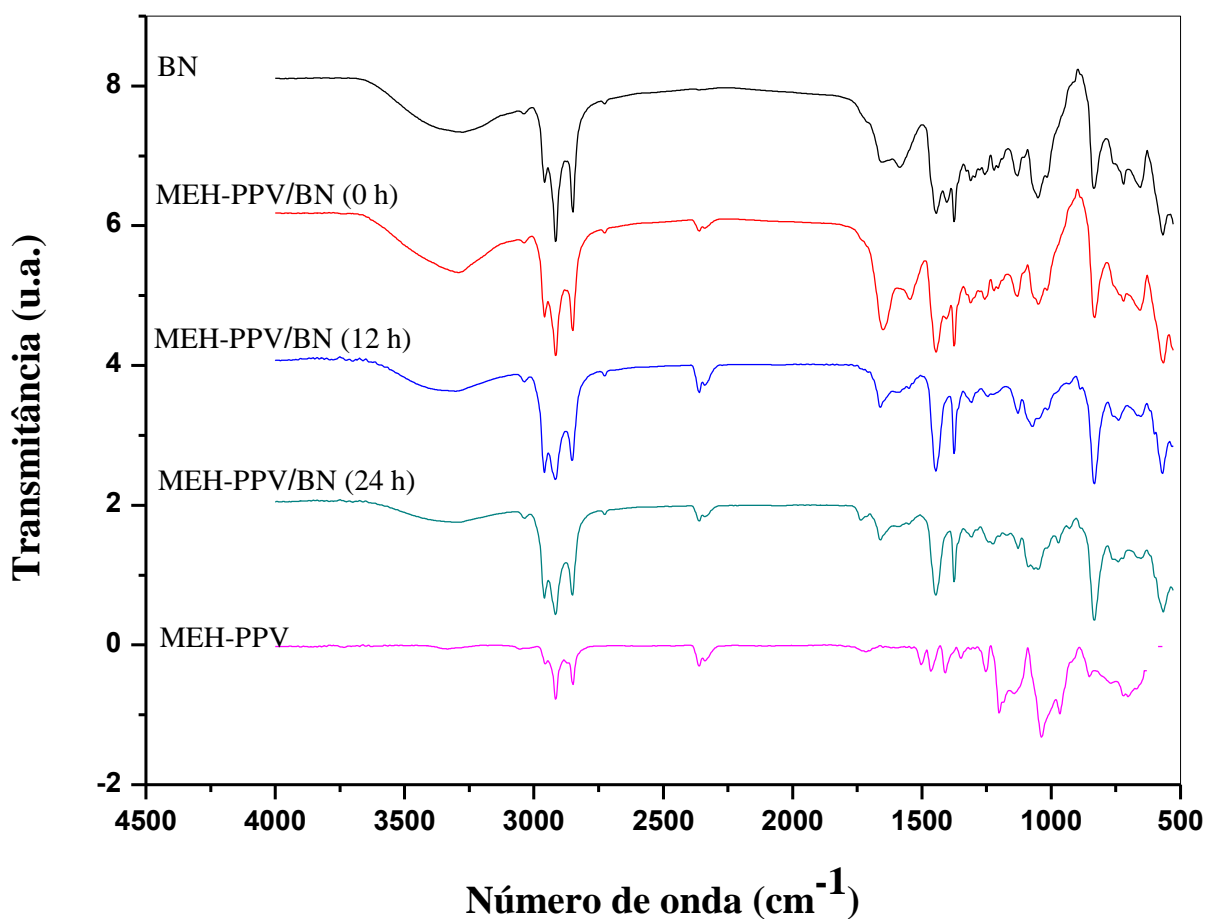
É importante destacar também que foi usado neste trabalho tempo de exposição à radiação, em vez de dose acumulada de radiação, uma vez que esta é a unidade usualmente utilizada em hospitais para tratamentos fototerápicos<sup>20</sup>. O tempo médio de avaliação da concentração sérica de bilirrubina total no tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal é de 8h<sup>20</sup>. No entanto, considerando que cada hospital gerencia o seu próprio protocolo de avaliação e não havendo portanto um modelo padrão a ser seguido, foram realizadas as medidas de espectroscopia de fotoluminescência na condição extrema de 24h de exposição. O que possibilita futuramente ajustes para atender aos requisitos específicos como sensibilidade e tempo de resposta do dispositivo de acordo com os protocolos de cada hospital. Outra característica relevante a ser mencionada é que o MEH-PPV e a bilirrubina respondem linearmente ao tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal por fototerapia, como também demonstrado por Ferreira et al.

## 4.2 Caracterização Química

Para estudar a efeito da radiação não ionizante nas propriedades químicas das membranas de BN e MEH-PPV/BN foram realizadas medidas de espectroscopia de absorção no infravermelho desses sistemas antes e após o tempo de exposição à irradiação da luz azul. Sendo assim, as membranas foram caracterizadas conforme os procedimentos experimentais apresentados no capítulo 3, item 3.6.5.

### 4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho

Para a caracterização química, via espectroscopia de absorção no infravermelho, foram analisadas tanto a membrana de BN quanto as membranas luminescentes em diferentes tempos de degradação. Sendo assim, os espectros de absorção na região do infravermelho são mostrados na Figura 36 e as bandas observadas nos espectros bem como os grupos funcionais as quais elas são relacionadas estão listadas na Tabela 4.



**Figura 36:** Espectros de infravermelho obtidos para as membranas de BN, MEH-PPV e MEHPPV/BN durante exposição à luz azul (40  $\mu\text{W} / \text{cm}^2$ , 460 nm) em diferentes tempos de exposição 0, 12 e 24 h.

**Tabela 4:** Relação entre os modos vibracionais e suas respectivas atribuições.

<i>Modos vibracionais e suas respectivas atribuições</i>			
<i>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Atribuição</i>	<i>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Atribuição</i>
<b>3629-3091</b>	v (-OH)	<b>1309</b>	CH <sub>2</sub> <i>Twisting</i>
<b>3325</b>	v <sub>s</sub> (-N-H)	<b>1193-1241</b>	v <sub>s</sub> (C-O) , v <sub>a</sub> (C-O)
<b>3040</b>	v (=CH)	<b>1240</b>	-CH <sub>2</sub> <i>Twist</i>
<b>2952</b>	β <sub>a</sub> (-CH em CH <sub>3</sub> )	<b>1126</b>	CH <sub>2</sub> wagging ou v (C-C)
<b>2901</b>	β <sub>s</sub> (-CH em CH <sub>3</sub> )	<b>1056</b>	v (C-CH <sub>2</sub> ) ou CH <sub>2</sub> <i>Twisting</i>
<b>2845</b>	δ (C-H em CH <sub>2</sub> )	<b>1000</b>	v (C-CH <sub>3</sub> )
<b>1657</b>	Amida I v (C=O), H (H <sub>2</sub> O)	<b>966-957</b>	β <sub>a</sub> (C=C)
<b>1562</b>	Amida II v (CN) e β (NH)	<b>848</b>	β (C=C-H)
<b>1442</b>	β (-CH <sub>2</sub> -)	<b>740</b>	CH <sub>2</sub> <i>rocking</i>
<b>1373</b>	β <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )	<b>652</b>	β (C-H)

**β= deformação fora do plano, δ= deformação angular, v= modo de estiramento, a = assimétrico, s = simétrico.**

A partir dos espectros mostrados na Figura 39, as bandas de absorção IV mais intensas observadas foram associadas aos modos de estiramento vibracional de -OH (3400 – 3200 cm<sup>-1</sup>), modos de estiramento simétrico -C-H de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> (2955, 2912 e 2846 cm<sup>-1</sup>), deformação axial de amida 1<sup>a</sup> com C = O em ligação de hidrogênio com água (1660 cm<sup>-1</sup>), modo de estiramento de C = O dos grupos -COO<sup>-</sup> em proteínas (1595 cm<sup>-1</sup>), -CH<sub>2</sub> (1445 cm<sup>-1</sup>) e deformação angular de -CH<sub>3</sub> (1380 cm<sup>-1</sup>), modo de estiramento do C-O de éter alifático ou éter (1054 cm<sup>-1</sup>) e -CH deformação angular fora do plano de alcenos trissubstituídos (840 cm<sup>-1</sup>). Com o aumento do tempo de exposição, foi possível observar pequenos aumentos nas intensidades dos picos já citados bem como de bandas associadas aos modos de estiramento simétrico C=H (3042 cm<sup>-1</sup>), modos de estiramento de -CH<sub>2</sub>-C=(CH<sub>2</sub>) (2721 cm<sup>-1</sup>), C = O modos de estiramento (1742 cm<sup>-1</sup>), deformação angular fora do plano simétrica tipo torção (*twisting*) CH<sub>2</sub> (1304 cm<sup>-1</sup>), C-O de ésteres insaturados e aromáticos (1228 cm<sup>-1</sup>), -CH devido a deformação angular no plano ou modo de estiramento do C-C ou deformação angular fora do plano do tipo *wagging* de CH<sub>2</sub> e - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> em hidrocarbonetos (739 cm<sup>-1</sup>). Na tabela 4 estão todos os números de onda atribuídos aos respectivos modos vibracionais observados para as membranas analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho.



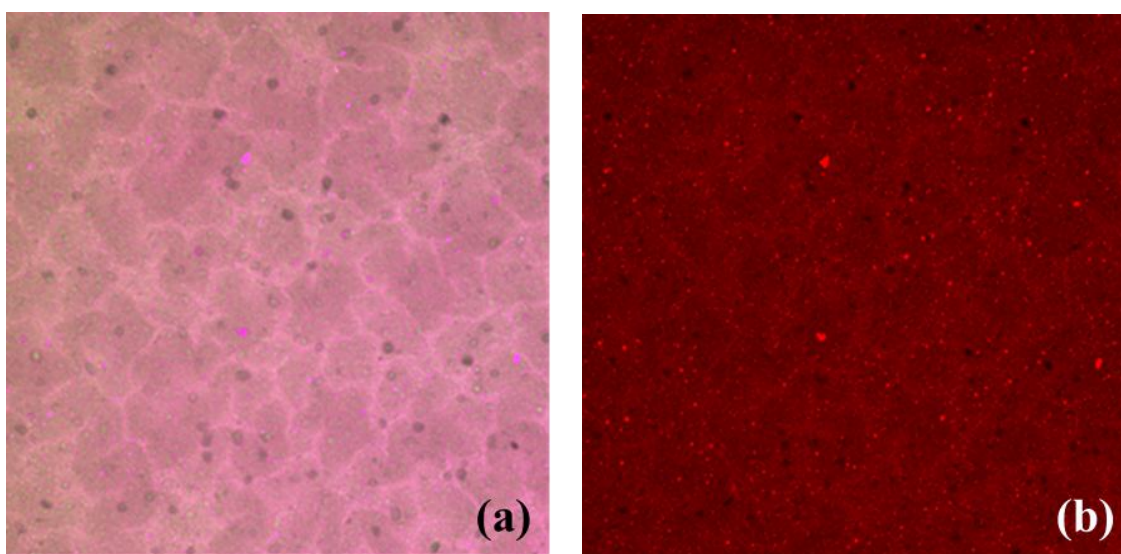
Apesar de não ter sido observado a fotodegradação do polímero luminescente por espectroscopia de absorção no infravermelho, foi possível observar que o elastômero de *Hevea brasiliensis* não se degrada sob luz azul. Neste contexto, é importante ressaltar que degradação da borracha natural, em decorrência da ação do oxigênio do ar, e mais especificamente, pela cisão da cadeia, provoca a diminuição da sua elasticidade<sup>154</sup>. Portanto, reportar este resultado resalta que a borracha natural não perderá elasticidade por processos oxidativos sob influência da luz azul durante a exposição ao tratamento de fototerapia neonatal.

### 4.3 Caracterização Morfológica

Para estudar a efeito da técnica de preparação sob sua respectiva topografia das membranas de BN e MEH-PPV/BN foram realizadas análises morfológicas através de imagens desses sistemas à temperatura ambiente. Sendo assim, as membranas foram caracterizadas conforme os procedimentos experimentais apresentados no capítulo 3.

#### 4.3.1 Microscopia confocal

A membrana de MEH-PPV/BN foi caracterizada também por microscopia confocal, afim de caracterizar a topografia da membrana controlando a profundidade de campo, reduzindo a informação periférica ao plano focal, aumentando o contraste e consequentemente à qualidade da imagem.

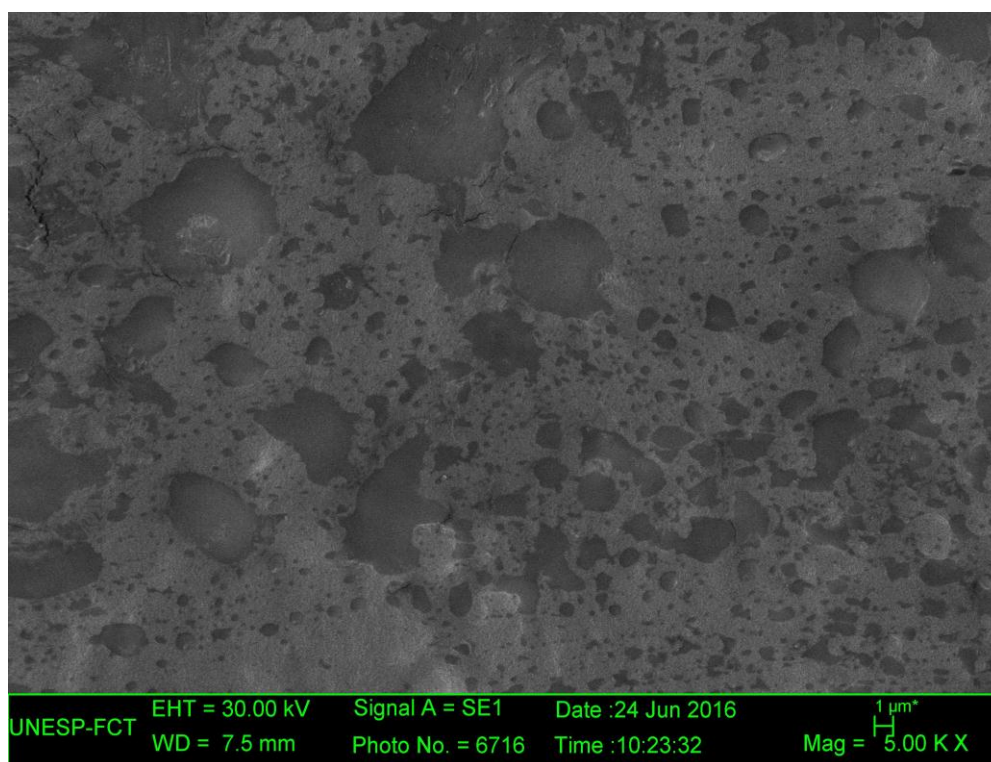


**Figura 37:** Imagem obtida por Microscopia confocal da membrana de (a) BN e (b) MEH-PPV/BN, usando Laser 4 = 640 nm. O diâmetro do ponto iluminado foi de 0,25 micrômetros.

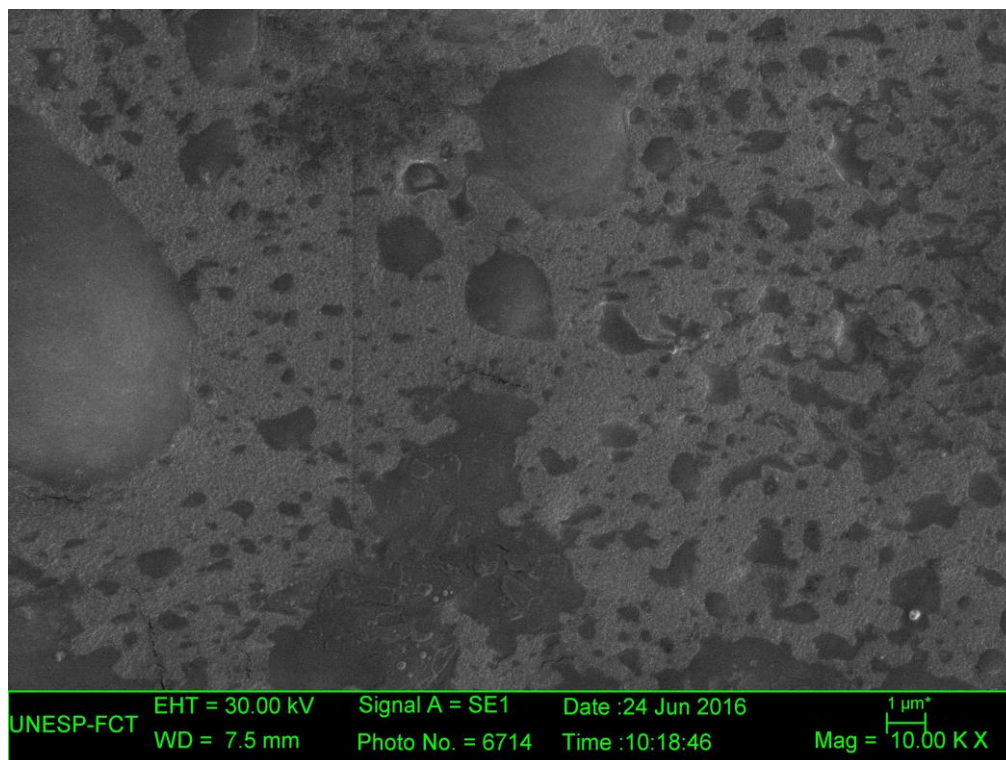
A partir das imagens, obtidas por Microscopia confocal das membranas de (a) BN e (b) MEH-PPV/BN, apresentadas na Figura 37 observou-se em (a) a notória presença de ranhuras desordenadas ao longo de toda membrana de BN e em (b) a presença de partículas de MEH-PPV depositadas e distribuídas em toda extensão de área da membrana. Portanto, a imagem 2D de microscopia confocal permitiu verificar a inomogeneidade da membrana de BN possivelmente advindas do processo de secagem do látex e de MEH-PPV/BN pela técnica de fabricação *casting*.

### 4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

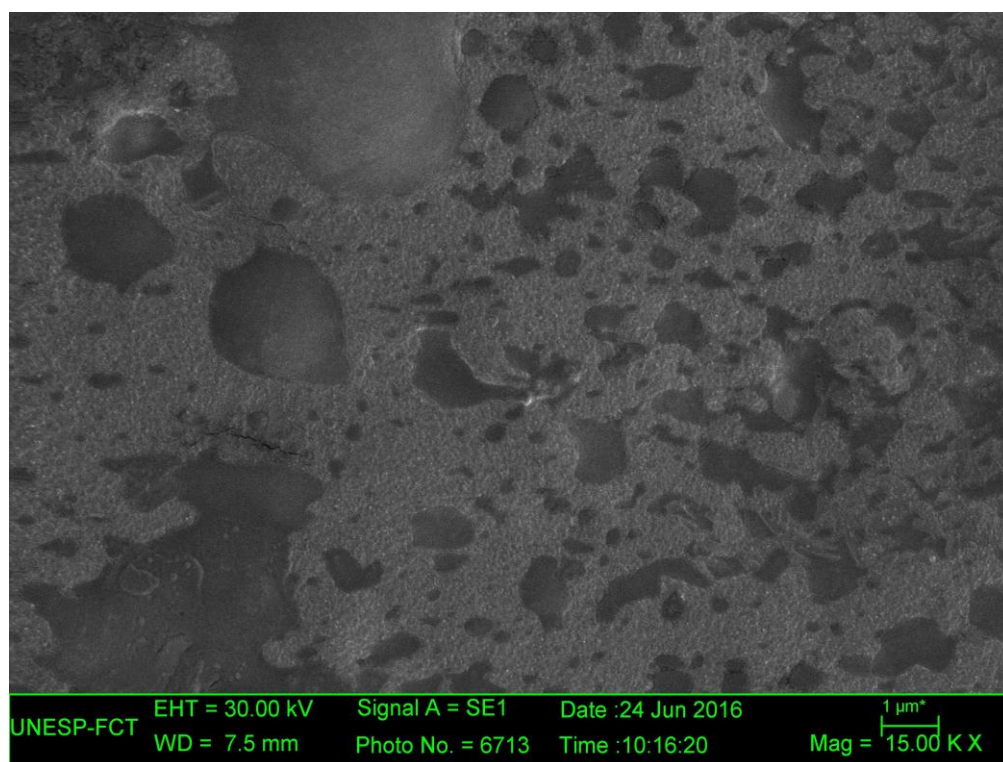
Por Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível analisar a morfologia superficial das membranas. Nas Figuras 38 a 44 são mostradas as imagens das membranas de BN e MEH-PPV/BN em diferentes aumentos. Como as imagens foram obtidas pela interação dos elétrons secundários (baixa energia) gerados próximos às superfícies das membranas, o contraste dessas imagens foram dados principalmente devido ao relevo das amostras.



**Figura 38:** Imagem da membrana de borracha natural tratada a 60°C. Aumento de 5000 vezes.



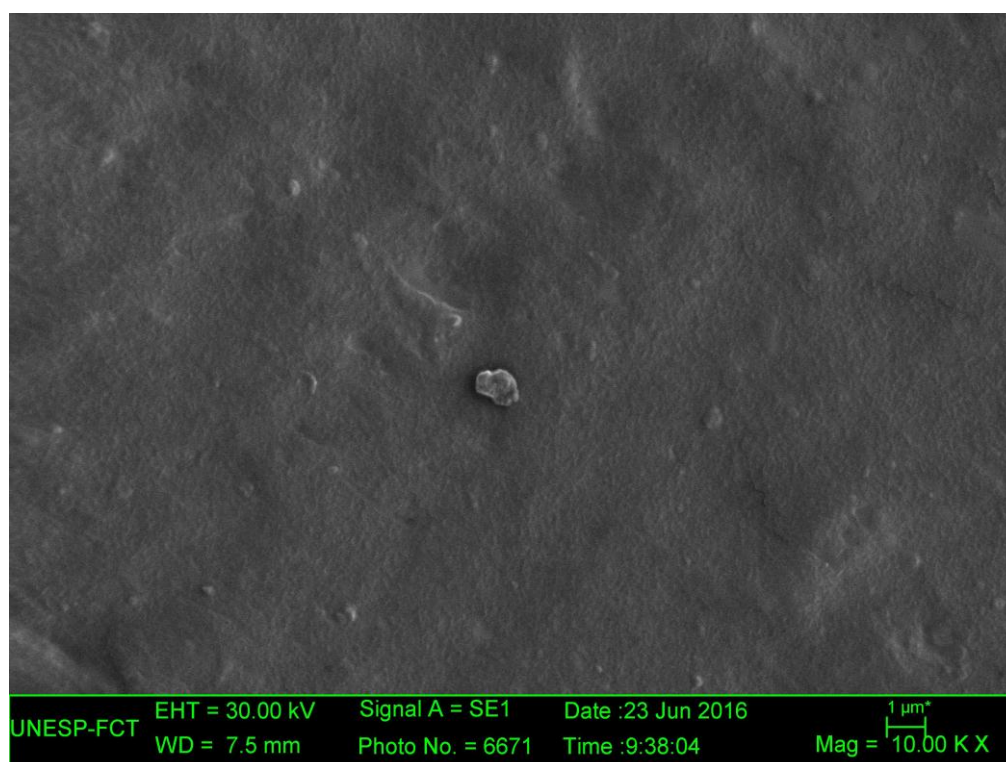
**Figura 39:** Imagem da membrana de borracha natural tratada a 60°C. Aumento de 10000 vezes.



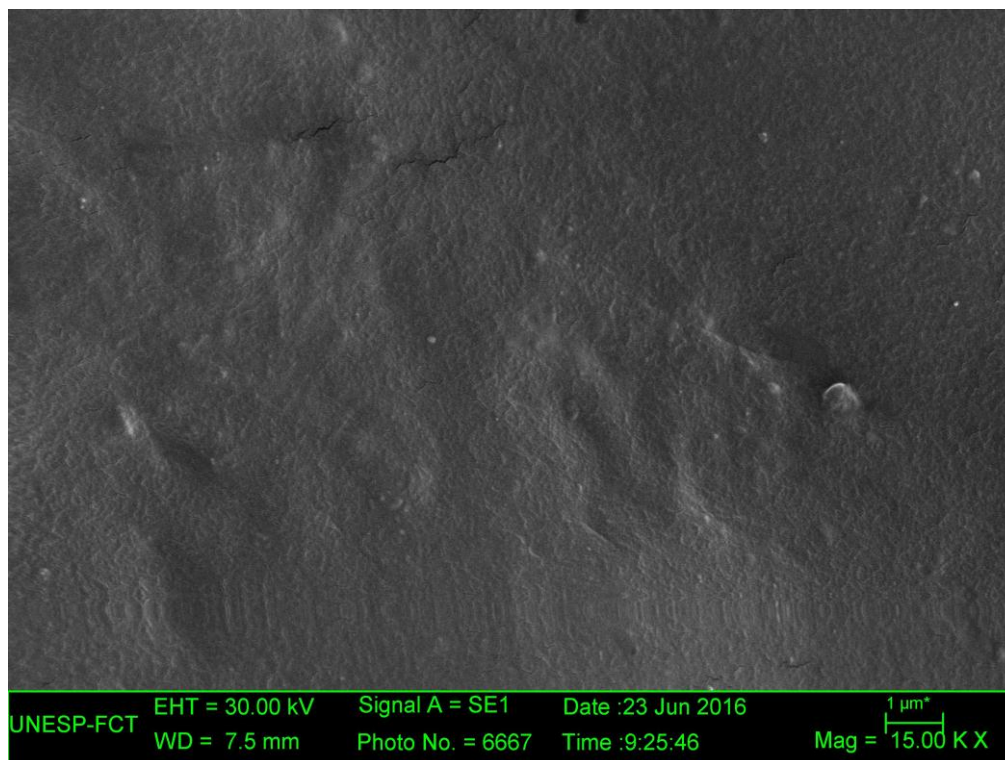
**Figura 40:** Imagem da membrana de borracha natural tratada a 60°C. Aumento de 15000 vezes.



**Figura 41:** Imagem da membrana luminescente de MEH-PPV/BN. Aumento de 15000 vezes.



**Figura 42:** Imagem da membrana luminescente de MEH-PPV/BN. Aumento de 10000 vezes.



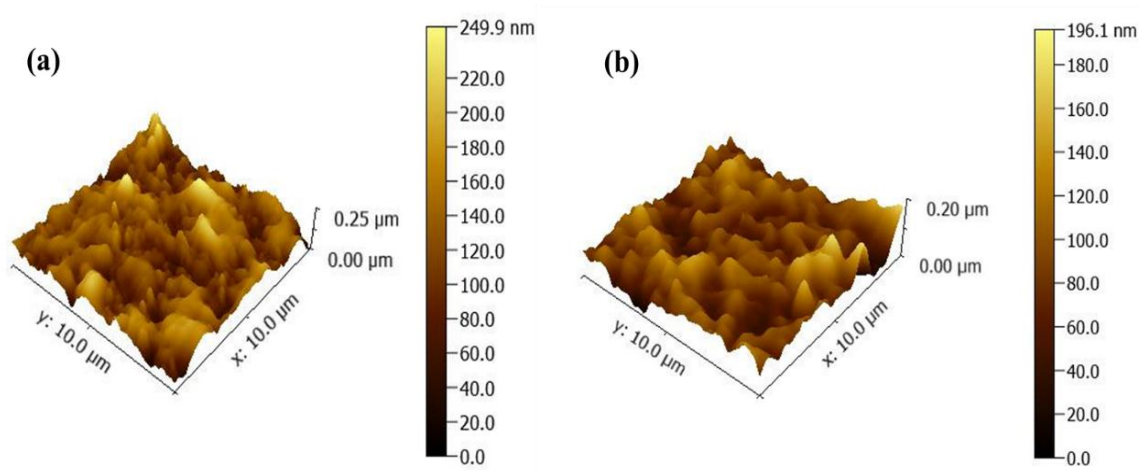
**Figura 43:** Imagem da membrana luminescente de MEH-PPV/BN. Aumento de 15000 vezes.

As Figuras 38 a 40 apresentam as imagens das membranas de BN com ampliação de 5000, 10000 e 15000 vezes respectivamente. Nestas imagens foi possível observar que houve um processo de evaporação muito rápido da água. De acordo com a literatura, este processo rápido leva consigo subprodutos do látex, formando regiões bem características. A evaporação destes subprodutos pode diminuir a concentração de substâncias de grande importância no processo de indução de angiogênese, impossibilitando o uso desta membrana como biomaterial<sup>10</sup>. No entanto, como o objetivo final desta membrana é a utilização da mesma como matriz de um sensor de radiação, tal aspecto mencionado não interfere no potencial uso da membrana como matriz.

Semelhantemente, analisou-se as membranas luminescentes para verificar a topografia da mesma após a deposição da camada ativa. Neste contexto, as Figuras 41, 42 e 43 apresentam as imagens das membranas de MEH-PPV/BN com ampliação de 5000, 10000 e 15000 vezes respectivamente. Diante das imagens apresentadas, observou-se uma topografia mais polida mas com presença de relevos ondulados e fissuras. Portanto, por *casting* não se obteve uma uniformidade da superfície bem como um alinhamento da camada ativa.

### 4.3.3 Microscopia de Força Atômica

Com o intuito de complementar a análise topográfica das membranas, obteve-se imagens superficiais por microscopia de força atômica.



**Figura 44:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica para (a) a membrana de borracha natural (b) e a membrana MEH-PPV /BN com tempo de exposição à radiação igual a zero.

A Figura 44 mostra as imagens AFM das membranas BN e MEH-PPV/BN. A imagem da membrana BN com uma área  $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$  apresenta uma superfície heterogênea com uma rugosidade média (Ra) de 26 nm e (root mean square) RMS de 33,1 nm. Para a membrana MEH-PPV/BN, os valores observados para Ra e RMS foram reduzidos para 19,1 e 25,1, respectivamente. Embora a distribuição das alturas de superfície tenha sido menor para a membrana luminescente, não observamos homogeneidade e uniformidade da superfície da camada ativa na matriz de BN. Portanto, através do estudo complementar por microscopia de força atômica, pode-se sugerir que a não homogeneidade da membrana se deve à técnica *casting*, uma vez que se sabe de relatos anteriores que esse método não permite qualquer controle sobre a ordem do alinhamento molecular final dos filmes/ membranas <sup>183</sup>. Assim, a técnica de fabricação (*casting*) das membranas não permitiu o controle sobre o alinhamento molecular e, portanto, os defeitos irão provocar o espalhamento da luz emitida diminuindo assim a eficiência luminosa da camada ativa de MEH-PPV.

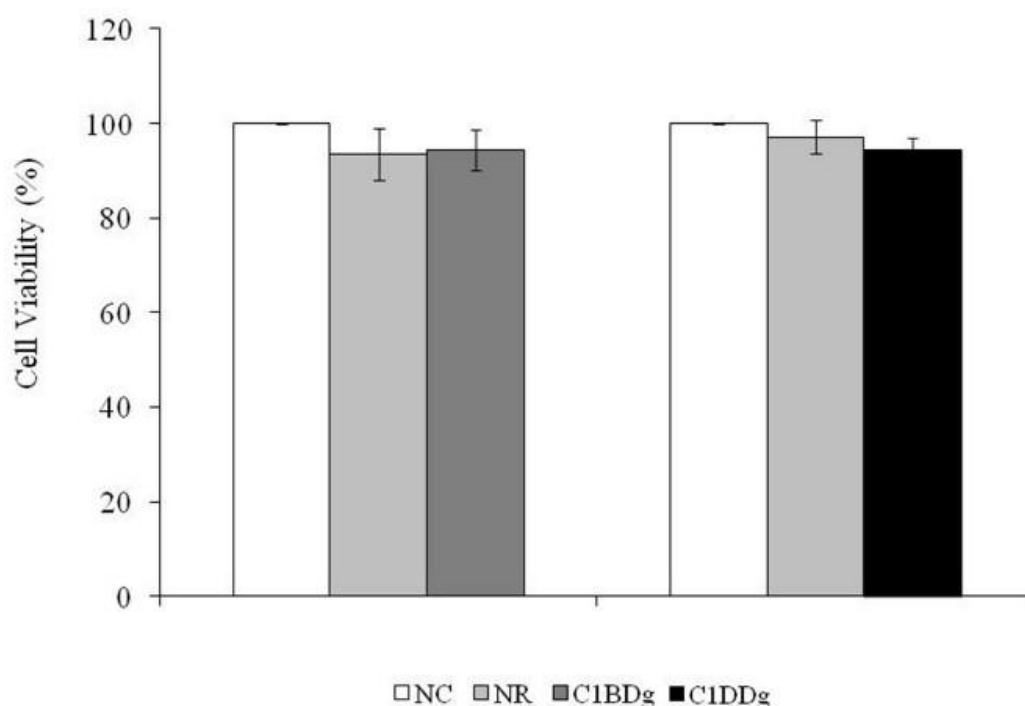
## 4.5 Caracterização Citotóxica

Para estudar o efeito citotóxico das membranas de BN e MEH-PPV/BN foram realizadas testes *in vitro* seguindo protocolos de exposição foto terapêuticas para o tratamento

da icterícia neonatal  $40 \mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$  de irradiância durante 24 horas. Sendo assim, as membranas foram caracterizadas conforme os procedimentos experimentais apresentados no capítulo 3, item 3.9.

#### 4.5.1 Citotoxicidade *in vitro*

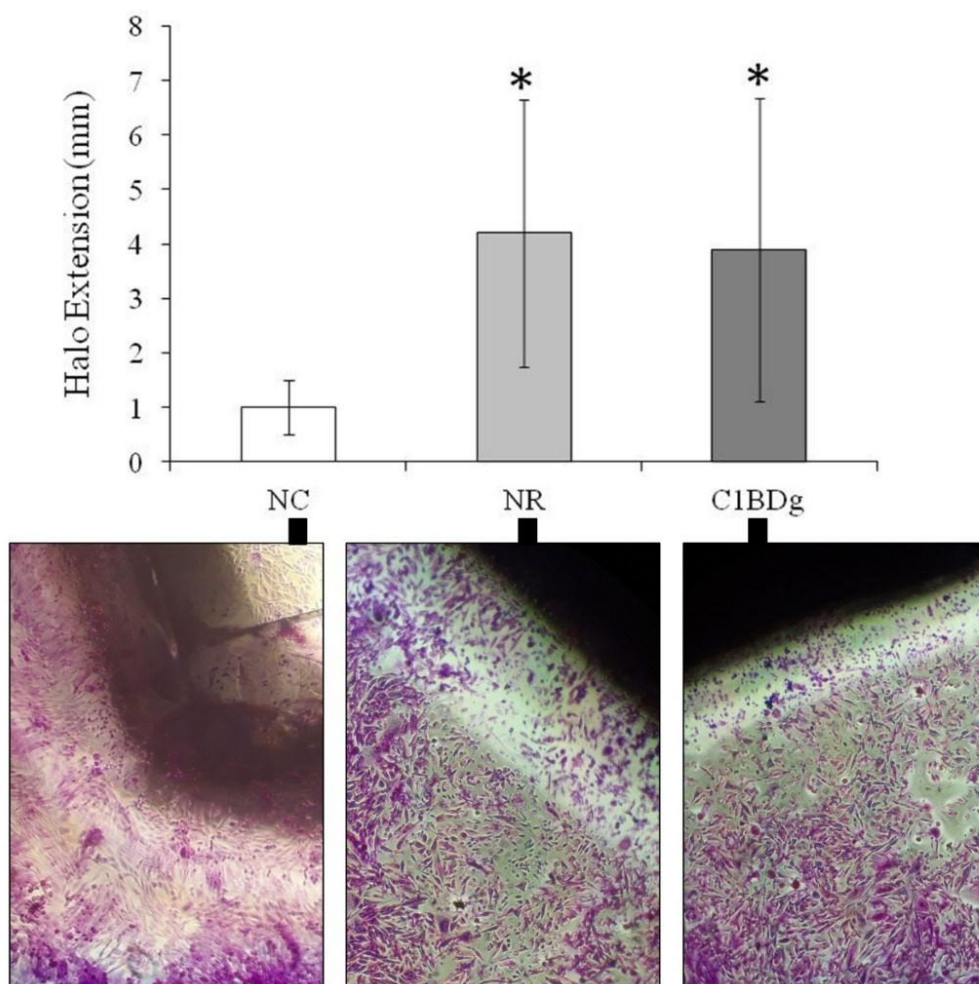
Testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados para a membrana MEH-PPV/BN visando potencial aplicação biomédica. Diante desse objetivo, este trabalho foi baseado em estudos científicos que mostraram que as membranas de BN são biocompatíveis e podem ser aplicadas a biomateriais<sup>185-188</sup>. Além disso, há na literatura científica poucos relatos sobre a biocompatibilidade de filmes contendo MEH-PPV, uma vez que as aplicações desses filmes geralmente têm foco em campos não biológicos.



**Figura 45:** Viabilidade celular das células CHO-K1 expostas a diferentes extratos ou apenas ao meio de cultura (NC) por 24 horas, quantificado pelo ensaio de MTT. As barras horizontais representam as médias e linhas verticais representam o desvio padrão.

Portanto, a partir dos resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando o método de extração (Figura 45), pode ser verificado que as membranas não apresentaram efeitos citotóxicos para a linha celular CHO-K1 durante o período de exposição de 24h, nem antes (C1BDg) nem após (C1DDG) a degradação do MEH-PPV. Com base nesses resultados, foi possível inferir que o MEH-PPV nas membranas não foi liberado nos extratos líquidos

testados e não entrou em contato com as células. Sabe-se que o MEH-PPV é hidrofóbico e solúvel em solventes orgânicos<sup>189</sup>. Neste contexto, a insolubilidade aquosa do MEH-PPV é uma característica favorável neste caso, uma vez que é sabido que os materiais insolúveis em água são geralmente menos capazes de penetrar na pele, reduzindo significativamente suas chances de causar danos biológicos<sup>190</sup>.



**Figura 46:** Extensão do halo formado entre as células CHO - K1 e os fragmentos (C1BDg) após exposição de 24 horas. As barras horizontais representam a média e a linha vertical o desvio padrão. \*: Indica diferença significativa em relação ao respectivo controle negativo (NC) ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* por contato direto (Figura 46) indicaram que ocorreu a formação de halo entre o fragmento C1BDg e as células expostas. Com base no padrão F813 / 2012<sup>177</sup>, foi possível atribuir a citotoxicidade da grade 2 da membrana C1BDg, indicando toxicidade leve. É considerado como tendo efeito citotóxico apenas materiais classificados com grau superior a 2 (ISO 10993-5 / 2009)<sup>191</sup>. Um halo de



extensão semelhante foi observado para as células que entraram em contato direto com a Borracha Natural (RN) sozinha. De acordo com a literatura científica, uma explicação para a formação do halo entre as células e o C1BDg estaria nos diferentes componentes de látex. Estes por sua vez podem ser extraídos dependendo do veículo usado e que o meio de cultura usado para a manutenção das células usadas no presente estudo poderia extrair componentes polares e não polares do látex que seriam tóxicos para as células<sup>190,192</sup>. Assim, inferimos que os efeitos citotóxicos leves dos filmes de C1BDg podem ter sido diretamente relacionados aos compostos liberados pela membrana de BN e não à presença de MEH-PPV.

Além disso, com base nos resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* do presente estudo, inferimos que as membranas MEH-PPV/BN apresentaram baixa citotoxicidade para o sistema de teste *in vitro* utilizado. Esses resultados foram corroborados com os de Filipa et al. (2015)<sup>7</sup> estudos estes que avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de filmes finos de MEH-PPV em células de mamíferos pela primeira vez. Foi estabelecido que, ao expor células da linha celular de fibroblastos L929 a fragmentos de filmes MEH-PPV durante 24 horas, os filmes não tinham efeitos citotóxicos nas células, conforme determinado utilizando o método de extração ou de contato direto. No entanto, realizamos apenas uma avaliação preliminar da toxicidade das membranas MEH-PPV/BN no presente estudo. Neste sentido, mais estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* serão necessários para uma avaliação mais completa dos riscos deste novo material para a saúde humana. Os resultados da citotoxicidade *in vitro* neste estudo mostraram-se promissores, deixando em aberto a possibilidade de aplicação deste novo material como dosímetro colorimétrico para o monitoramento da fototerapia neonatal.

*Citotoxicidade in vitro, por contato direto, em função do número de camadas de material luminescente.*

No que tange a investigação da citotoxicidade *in vitro* por contato direto em função do número de camadas de material luminescente observou-se que os valores dos tamanhos dos halos encontrados entre as células e as membranas investigadas foram menores que 0,5 cm por exposição de 24 horas. Neste contexto, considerando o padrão F813 / 2012<sup>177</sup>, classificou-se a citotoxicidade de grade 2, indicando toxicidade leve. A tabela 5 indica os respectivos valores dos halos em relação às camadas depositadas sobre a matriz de Borracha Natural. Ademais, também foram feitas observações microscópicas das células e os resultados obtidos foram classificados de acordo com o grau de citotoxicidade da ISO 10993/2009. Neste

contexto, a Tabela 6 indica os as observações microscópicas das células bem como seu respectivo grau de citotoxicidade segundo a ISO 10993/2009.

**Tabela 5:** Valores em cm do tamanho dos halos encontrados entre as células e as membranas testadas e a classificação de citotoxicidade correspondente baseada na ISO 10993/2009

Amostra	Valor encontrado (mm)	Tamanho do Halo	Citotoxicidade	Grau
BN.	4.25 ± 2.5	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C1	4.00 ± 2.94	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C2	4.25 ± 1.71	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C3	4.50 ± 1.73	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C4	4.25 ± 1.71	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C5	3.75 ± 2.22	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C6	4.00 ± 2.16	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C7	4.25 ± 0.96	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C8	4.00 ± 1.41	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C9	4.25 ± 1.71	Menor que 0,5 cm	Branda	2
C10	4.00 ± 0.82	Menor que 0,5 cm	Branda	2

**Tabela 6:** Resultado das observações microscópicas das células em todas as condições experimentais, baseando na classificação de grau de citotoxicidade da ISO 10993/2009.

Amostra	Condições da cultura encontradas microscopicamente	Citotoxicidade	Grau
BN C1 C2 C3 C4 C5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não mais do que 20% das células estão redondas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos</li> <li>• apresentam alterações na morfologia;</li> <li>• apenas ligeira inibição do crescimento observável.</li> </ul>	Leve	1
C6 C7 C8 C9 C10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não mais do que 50% das células estão redondas, desprovidas de grânulos intracitoplasmática</li> <li>• sem grande lise celular</li> <li>• não mais do que 50% de inibição de crescimento observável</li> </ul>	Branda	2

Diante dos resultados apresentados nas tabelas 5 e 6, inferiu-se que através dos testes de citotoxicidade *in vitro* por contato que as membranas MEH-PPV/BN com diferentes

camadas de material luminescente apresentaram baixa citotoxicidade. Estes resultados são importantes para a confecção de dosímetros uma vez que foi investigada a viabilidade de se aumentar a quantidade de material luminescente sem que estes sejam nocivos ao usuário. No entanto, mais estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* serão necessários para garantir ao usuário final deste potencial dosímetro uma segurança para a saúde humana.

## 5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi relatado neste trabalho o desenvolvimento e o desempenho de uma membrana luminescente com potencial grau de biocompatibilidade sensível à radiação não ionizante, especificamente à terapia com luz azul. A membrana foi confeccionada em uma matriz polimérica de BN e utilizou o MEH-PPV como uma camada ativa. Utilizamos as mesmas condições para a fototerapia neonatal para nossa análise óptica e os resultados experimentais mostraram que a resposta óptica foi favorável e proporcional ao tempo de exposição à radiação. Assim, foi possível verificar a mudança gradual de cor da membrana MEH-PPV/BN durante sua exposição à luz azul. A mudança de cor foi de fácil leitura, pois a membrana luminescente mudou sua cor de vermelho escuro para amarelo e depois para incolor. Além disso, ao ser exposto à luz azul, os espectros de luminescência da membrana de MEH-PPV/BN apresentaram redução na intensidade e deslocamentos para menores comprimentos de onda e, portanto, maiores energias. Essas alterações foram atribuídas ao fenômeno de fotodegradação no qual a redução da conjugação efetiva e, conseqüentemente, a deslocalização eletrônica é oriunda da oxidação das ligações vinílicas com a formação de carbonilas.

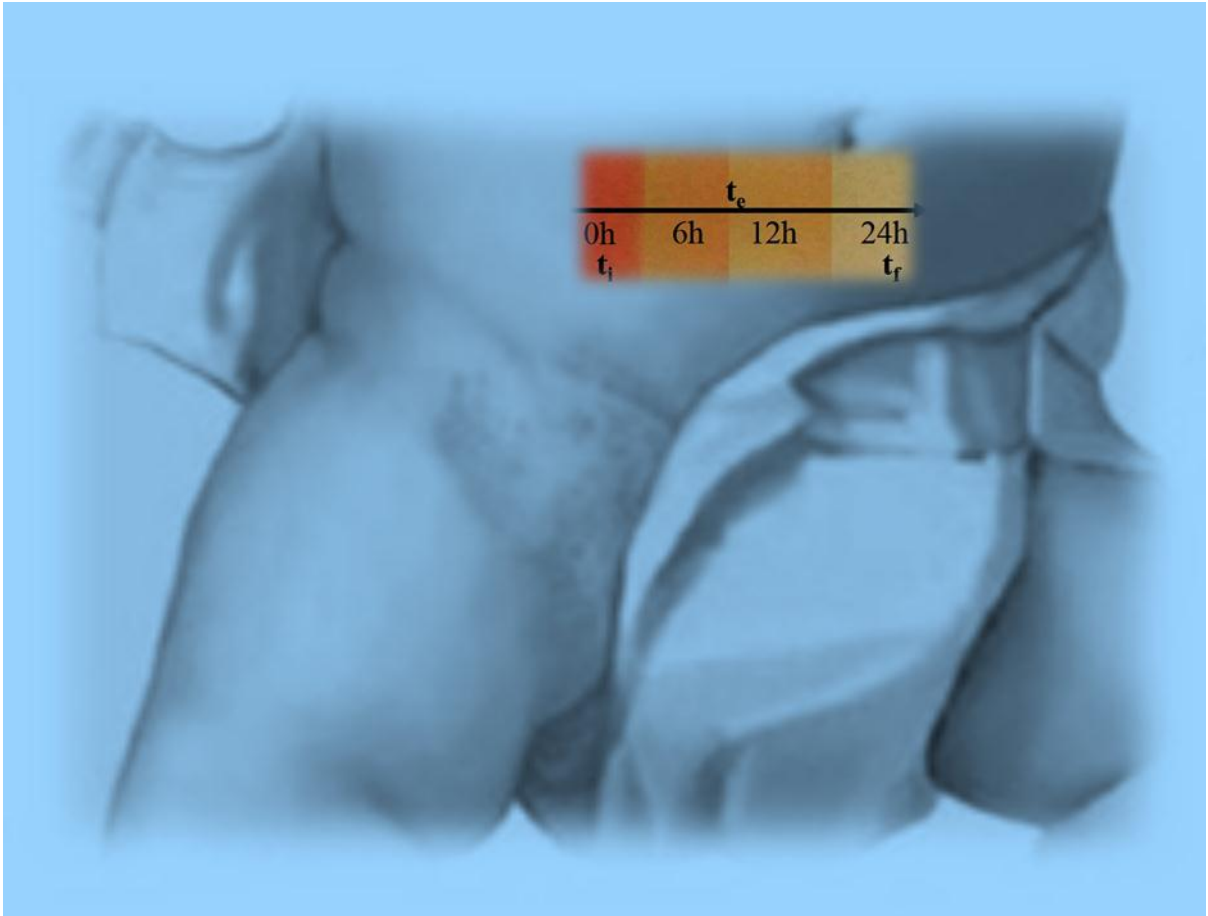
É importante destacar também que foi usado neste trabalho tempo de exposição à radiação, em vez de dose acumulada de radiação, uma vez que esta é a unidade usualmente utilizada em hospitais para tratamentos fototerápicos. O tempo médio de avaliação da concentração sérica de bilirrubina total no tratamento da icterícia neonatal é de 8 horas. No entanto, considerando que cada hospital gerencia o seu próprio protocolo de avaliação e não havendo portanto um modelo padrão a ser seguido, foram realizadas as medidas de espectroscopia de fotoluminescência na condição extrema de 24h de exposição. O que possibilita futuramente ajustes para atender aos requisitos específicos como sensibilidade e tempo de resposta do dispositivo de acordo com os protocolos de cada hospital.

Apesar de não ter sido observado a fotodegradação do polímero luminescente por espectroscopia de absorção no infravermelho, foi possível constatar que o elastômero de *Hevea brasilienses* não se degrada sob luz azul. É importante ressaltar que degradação da borracha natural, em decorrência da ação do oxigênio do ar, e mais especificamente, pela cisão da cadeia, provoca a diminuição da sua elasticidade. Portanto, reportar este resultado ressalva que a borracha natural não perderá elasticidade por processos oxidativos sob influência da luz azul durante a exposição ao tratamento de fototerapia neonatal. Outra característica relevante a ser mencionada é que a incorporação de uma matriz de polímero

natural nos permitiu criar um dispositivo similar ao proposto por Ferreira et al, com processo de fabricação mais simples, com uso de tecnologia verde e com baixo potencial tóxico. Ademais, o uso de polímero natural elastomérico de elevado grau de elasticidade, flexibilidade, de baixo custo, passível de ser moldado com designs inovadores além de possuir uma natural capacidade de aderência e adesividade. Contudo, considerando que já foi relatado na literatura a habilidade de ambos os polímeros (BN e MEH-PPV) apresentarem potencial afinidade com tecidos vivos, em especial, o corpo humano e diante de todas as características supracitadas a incorporação da matriz polimérica de borracha natural como matriz enobrecem a construção desse dispositivo.

Além disso, embora o potencial citotóxico *in vitro* da membrana para a linhagem de células CHO-K1 tenha sido leve, mais estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, assim como testes de irritação e alergenicidade, precisam ser realizados para uma avaliação mais completa desse novo material para a saúde humana e para confirmar a segurança do produto. Portanto, este estudo nos permitiu sugerir que as membranas MEH-PPV/BN poderiam ser usadas como sensores visuais e biocompatíveis, vestíveis, qualitativos e quantitativos para o acúmulo de radiação com intuito de melhorar os tratamentos médicos, especialmente para a hiperbilirrubinemia neonatal.

Portanto, apesar do avançado grau de desenvolvimento dos sensores de radiação para aplicação em fototerapia neonatal e radioterapia relatados na literatura a partir de polímeros conjugados, a utilização do polímero natural trouxe vantagens e diferentes propriedades aos sensores que ainda não eram conhecidas. Por exemplo, o contato direto do material com a pele pode ajudar na aquisição de dados ou servir como parâmetro de controle do tempo de respostas ótica desses sensores sem interferência externa. A Figura 48 demonstra de maneira ilustrativa a atuação do sensor biocompatível durante junto ao RN durante a fototerapia.



**Figura 47:** Demonstração ilustrativa do desempenho do sensor biocompatível luminescente em fototerapia junto ao recém-nascido.

## 6. PRINCIPAIS RESULTADOS GERADOS

BRAGA, N. O.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; GOMES, A. S.; BIANCHI, R. F.; JOB, A. E. . Photodegradable meh-ppv in a natural rubber matrix: toward a biocompatible colorimetric film for real-time light dosimetry. *Journal of Luminescence*, 2019.

BRAGA, N. O.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; GOMES, A. S.; BIANCHI, R. F.; JOB, A. E.. Biocompatible-luminescent membrane based-polymer conjugated in natural rubber matrix with potential application as radiation sensors. *18th International Conference on Luminescence*. 2017.

BRAGA, N. O.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; GOMES, A. S.; BIANCHI, R. F.; JOB, A. E.. Effect of non-ionizing radiation on optical properties of nanoparticles of MEH-PPV hydrophilic and your toxicological potential with exposure time. . *18th International Conference on Luminescence*. 2017.

BRAGA, N. O.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; GOMES, A. S.; BIANCHI, R. F.; JOB, A. E.. Medical device based-polymer conjugated in natural rubber matrix to application in neonatal phototherapy. *XB Brazilian MRS Meeting*. 2016.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Nia AM, Mozaffari-Kermani M, Sur-Kolay S, Nathan AR and Jha NK, Energy-efficient long-term continuous personal health monitoring. *Transactions on multi-scale computing systems*, vol. 1, n°. 2, April-june 2015.
2. Czolkos I, Hakonen B, Orwar O, and Jesorka A. High-resolution micropatterned teflon af substrates for biocompatible nanofluidic devices. *Langmuir* 2012, 28, 3200–3205. [dx.doi.org/10.1021/la2044784](https://doi.org/10.1021/la2044784)
3. Irimia-Vladu M. ‘Green’ electronics: biodegradable and biocompatible materials and devices for sustainable future. *Chem. Soc. Rev.*, 2014,43,558. DOI: 10.1039/c3cs60235d
4. Ferreira GR, Tannure AM, Cardoso LC, Siqueira MF, Bianchi AGC, Bianchi RF, Colorimetric dosimeter to promote most efficient use of neonatal phototherapy *Sensors and Actuators B* 240 (2017) 1003–1008
5. Talite MJ, Lin HT, Jiang ZC, Lin TN, Huang HY, Heredia E, Flores A, Chao YC, Shen JL, Lin CA, Yuan CT. Solid-state, ambient-operation thermally activated delayed fluorescence from flexible, non-toxic gold-nanocluster thin films: towards the development of biocompatible light-emitting devices. Published 13 July 2016. *Nanotechnology* 27 (2016) 345701 (8pp) doi:10.1088/0957-4484/27/34/345701
6. Padron S, Patlan R, Gutierrez J, Santos N, Eubanks T, Lozano K. Production and characterization of hybrid BEH-PPV/PEO conjugated polymer nanofibers by Forcespinning. Published 20 February 2012. *Journal of applied polymer science*. doi:10.1002/app.36420
7. Pires F, Ferreira Q, Rodrigues CAV, Morga J, Ferreira FC. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850 (2015) 1158–1168
8. Friend RH, Greenham NC. *Handbook of conductive polymers*; Marcel Dekker: New York, 1998; p 823.
9. Parker ID, Gymer RW, Harrison MG, Friend RH, and Ahmed H. Fabrication of a novel electro-optical intensity modulator from the conjugated polymer, poly(2,5-dimethoxy-p-phenylene vinylene) *Appl. Phys. Lett.* 62, 1519 (1993); <https://doi.org/10.1063/1.108626>
10. Antoniadis H, Hsieh BR, Abkowitz MA, Jenekhe SA, Stolka M. Photovoltaic and photoconductive properties of aluminum/poly(p-phenylene vinylene) interfaces. *Synth. Met.* 1994, 62, 625. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(94\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0379-6779(94)90215-1)



11. Lopes F A, Ferreira G R, Franco MR, Schimitberger T, Faria LO, Bianchi RF. A versatile radiochromic dosimeter for low-medium gamma radiation and its application to food irradiation. *Journal of applied polymer science* (online), v. 1, p. 1-5, 2017.
12. Schimitberger T, Ferreira GR, Akcelrud LC, Saraiva MF, Bianchi RF. X-rays sensing properties of MEH-PPV, Alq<sub>3</sub> and additive components: A new organic dosimeter as a candidate for minimizing the risk of accidents of patients undergoing radiation oncology. *Medical Engineering & Physics*, v. 35, p. 140-144, 2013.
13. Schimitberger T, Lopes FA, Franco MR, Curly PS, Bianchi RF, Faria LO. A new flexible film for high dose gamma dosimetry based on luminescent and biodegradable polymer blend. *Materials Research Society Symposia Proceedings*, v. 1576, p. ww04-ww06, 2013.
14. Schimitberger T, Ferreira GR, Bianchi AGC, Saraiva MF, Bianchi RF. X-ray dose detector based on color changing of light-emitting polymer - metal complex hybrid material. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 168, p. 131-137, 2012.
15. Green M, Howes P, Berry C, Argyros O and Thanou M. Simple conjugated polymer nanoparticles as biological labels. *Proc. R. Soc. A* (2009) **465**, 2751–2759. Published online 24 June 2009. doi:10.1098/rspa.2009.0181.
16. Doshi M, Krienke M, Khederzadeh S, et al. Conducting polymer nanoparticles for targeted cancer therapy. *RSC Adv.*, 2015, 5, 37943. DOI: 10.1039/c5ra05125h
17. Doshi M, Copik A, Gesquiere AJ. Development and characterization of conducting polymer nanoparticles for photodynamic therapy in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (2015) 12, 476-489. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.04.010>.
18. Xu J, Zhou Y, Cheng G, Liu S, Dong M and Huang C. ‘Imperfect’ conjugated polymer nanoparticles from MEH-PPV for bioimaging and Fe(III) sensing. *Luminescence* 2015; 30: 451–456. DOI 10.1002/bio.2759
19. Bhutani VK, Johnson LH, Keren R. Diagnosis and management of hyperbilirubinemia in the term neonate: for a safer first week, *Pediatr Clin North Am.* 2004 Aug;51(4):843-61, vii.
20. Maisels MJ, Baltz RD, Bhutani VK, et al. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation, *Pediatrics* 114 (2004) 297–316.
21. Agati G, Fusi F, Pratesi S, Galvan P, Donzelli GP, Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler—Najjar type I patient treated by phototherapy, *J.*

*Photochem. Photobiol. B* 47 (1998) 181–189. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00221-8)

22. Carvalho M. “Tratamento da icterícia neonatal”. *Jornal de Pediatria* - Vol. 77, Supl.1, 2001.
23. Maisels J, McDonagh AF. Phototherapy for neonatal jaundice. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 9, p. 920-928, 2008.
24. Prgomet M, Georgiou A, WestbrookJI. The impact of mobile handheld technology on hospital physicians’ work practices and patient care: a systematic review. *J Am Med Inform Assoc*. 2009 Nov-Dec;16(6):792-801.
25. Mickan S, Tilson JK, Atherton H, Roberts NW, Heneghan C. Evidence of effectiveness of health care professionals using handheld computers: a scoping review of systematic reviews. *J Med Internet Res*. 2013 Oct 28;15(10):e212. doi: 10.2196/jmir.2530
26. Mruea F, Netto JC, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H .Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Materials Research*. 2004; 7(2): 277-283.
27. Sader SL, Coutinho Netto J, Barbieri Neto J, Mazzetto SA, Alves Jr. P, Vanni JC, Sader AA. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc*.2000; 15(4): pp.338-344.
28. Neves Junior WFP, Ferreira M, Alves COM, Graeff CFO, et al. Influence of fabrication process in the final properties of natural-rubber latex for vascular prosthesis. *Brazilian Journal of Physics*. v. 36, p. 586-591,2006
29. Pinho EC, Sousa SJ, Schaud F, Lachat JJ. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arq Bras Oftalmol*. 2004; 67(1): 27-32.
30. Rabelo RE, Paulo NM, Silva LAF, Silva OC. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0.1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005; 33(2): pp. 169-175.
31. Balabanian CA, Netto JC, Carvalho TL, Suzie A. Lacerda AS, Brentegani LG. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science*. 2006; 48(4): pp. 201-205.
32. Nascimento RM, Faita FL, Agostini DLS, Job AE, Guimarães FE, Bechtold IH. Production and characterization of natural rubber–Ca/P blends for biomedical purposes. *Materials Science and Engineering C* 39 (2014) 29–34

33. Rastegari AA, Bordbar AK, Taheri-Kafrani A. “Interactions of cellulose with cationic surfactants: Using surfactant membrane selective electrodes and fluorescence spectroscopy”. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;73:132–9.
34. Anuchai K, Weder C, Magaraphan R. Strain sensitive photonic natural rubber. *Plast Rubber Compos* 2008;37:281–7. doi: 10.1179/174328908X309394
35. Cabrera FC, Agostini LS, dos Santos RJ, et al. Organic acids and protein compounds causing the photoluminescence properties of natural rubber membranes and the quenching phenomena from Au nanoparticle incorporation. *Luminescence*. 2014 Dec;29(8):1047-52. doi: 10.1002/bio.2657.
36. Bassegio DM. Avaliação da Irradiância dos Aparelhos de Fototerapia no Vale do Rio dos Sinos. 62 folhas. 2005 Monografia - Centro Universitário FEEVALE. Novo Hamburgo. 2005.
37. Guinsburg R. Avaliação e tratamento da dor no recém-nascido. *Jornal de Pediatria*, v. 75, n. 3, p. 149-160,1999.
38. Silva MJ P, Tamez RN. Assistência ao Recém-Nascido de Alto Risco. 3ª Edição. São Paulo: Editora Guanabara, 2009. 280 páginas.
39. Sisson TRC. Photherapy of jaundice in the newborn infant II. Effect of various light intensities. *The Journal of Pediatrics*, v. 81, n. 1 , p. 35-38, 1972.
40. Whaley LF, Wong DL. Enfermagem Pediátrica: elementos essenciais à intervenção efetiva. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
41. Maisels MJ, Ostrea EM, Touch S, Clune SE, Cepeda E, Kring E. Evaluation of a New Transcutaneous Bilirubinometer, *Pediatrics*, 113, 1628-1635,2004.
42. Vandborg PK, Hansen BM, Greisen G, Ebbesen F. Dose–response relationship of phototherapy for hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2012; 130(2): e352–7, <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2011-3235>
43. Stokowski LA. “Fundamentals of photherapy for neonatal jaundice”. *Advance in neonatal care*. 2011.
44. Shapiro SMV, Bhutani K, Johnson L .Hyperbilirubinemia and kernicterus. *Clinics in Perinatology* , vl. 33, p. 387-410, 1996.
45. Comitê de Neonatologia da SMP. Icterícia Neonatal. Textos científicos Sociedade Mineira de Pediatria. Disponível em: <http://www.smp.org.br>. Acesso em maio de 2018.

46. Silva MM, Novais SMV, Silva ESS, Schimitberger T, Macedo ZS, Bianchi RF. CdWO<sub>4</sub>-on-MEH-PPV:PS as a candidate for real-time dosimeters. *Materials Chemistry and Physics*, v. 136, p. 317-319, 2012.
47. Schimitberger T, Ferreira GR, Souza CJ, Silva MM, Saraiva MF, Bianchi RF. Detector de radiação orgânico e inteligente para raios x de uso em radioterapia clínica. *Tecnologia em Metalurgia Materiais e Mineração*, v. 9, p. 48-52, 2012.
48. Thomas S, Chan CH, Pothen LA, Joy J, Maria HJ. “Natural Rubber Materials” . v 2. P 170. 2014.
49. Rastegari AA, Bordbar A-K, Taheri-Kafrani A. “Interactions of cellulose with cationic surfactants: Using surfactant membrane selective electrodes and fluorescence spectroscopy”. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;73:132–9.
50. Anuchai K, Weder C, Magaraphan R. “Strain sensitive photonic natural rubber”. *Plast Rubber Compos* 2008;37:281–7.
51. Dall’Antonia AC et all, Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica Polímeros: *Ciência e Tecnologia*, vol. 16, nº 3, p. 239-245, 2006.
52. Oliveira FA, Alves N, Giacometti JA, Constantino CJL, Mattoso LHC, Balan AMOA, Job AE. Study of the thermo-mechanical and electrical properties of conducting composites containing natural rubber and carbon black. *Journal of Applied Polymer Science*. v.106, p.1001 - 1006, 2007.
53. Bellucci FS, Budenberg ER, Nobre MAL, Saja JA, Aroca RF, Pérez MAR, Job AE. Mechanical Properties of Vulcanized Natural Rubber Nanocomposites Containing Functional Ceramic Nanoparticles. *Science of Advanced Materials*, v. 5, p. 637-646. 2013.
54. Bellucci FS, Salmazo LO, Budenberg ER, Silva MR, Pérez MAR, Nobre MAL, Job AE. Preparation and structural characterization of vulcanized natural rubber nanocomposites containing nickel-zinc ferrite nanopowders. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. v.12, p. 2691 - 2699, 2012.
55. Cabrera FC, Mohan H, dos Santos RJ, Agostini DLS, Aroca RF, Pérez MAR, Job AE. Green synthesis of gold nanoparticles with self-sustained natural rubber membranes. *Journal of Nanomaterials*. 2013.
56. Cabrera FC, Aoki PHB, Aroca RF, Constantino CJL, dos Santos DS, Job AE. Portable smart films for ultrasensitive detection and chemical analysis using SERS and SERRS. *Journal of Raman Spectroscopy*. v. 43, p.474 - 477, 2012.

57. Cabrera FC, Agostini DLS, dos Santos RJ, Teixeira SR, Rodríguez-Pérez MA, Job AE. Characterization of natural rubber/gold nanoparticles SERS-active substrate. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 130, p.186-192. 2013.
58. Barboza-Filho CG, Cabrera FC, dos Santos RJ, de Saja Saez JA, Job AE. The influence of natural rubber/Au nanoparticle membranes on the physiology of *Leishmania brasiliensis*. *Experimental Parasitology*. v. 130, p.152 - 158, 2012.
59. Souza NC, Cavalheri AS, Brito JB, Job AE, Oliveira ON, Giacometti JA, Silva JR. Photo induced orientation in natural rubber. *Chemical Physics Letters*. v.531, p.110 - 113, 2012.
60. Cabrera FC, Agostini DLS, dos Santos RJ, Guimarães FEG, Guerrero AR, Arocac RF, Job AE. "Organic acids and protein compounds causing the photoluminescence properties of natural rubber membranes and the quenching phenomena from Au nanoparticle incorporation" 24 de Abril de 2014.
61. Keahey, P. A., Simeral, M. L., Schroder, K. J., Bond, M. M., Mtenthaonnga, P. J., Miros, R. H., ... Richards-Kortum, R. R. (2017). *Point-of-care device to diagnose and monitor neonatal jaundice in low-resource settings. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(51), E10965–E10971*.doi:10.1073/pnas.1714020114
62. National Institute for Health and Care Excellence. Neonatal jaundice: clinical guideline 98. May, 2010. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg98> (accessed March 25, 2018).
63. Bhutani VK, Stark AR, Lazzeroni LC, et al. Predischarge screening for severe neonatal hyperbilirubinemia identifies infants who need phototherapy. *J Pediatr* 2013; 162: 477–82.
64. UNICEF. The state of the world's children 2017. Children in a digital world. December, 2017. [https://www.unicef.org/publications/index\\_101992.html](https://www.unicef.org/publications/index_101992.html) (accessed March 25, 2018).
65. Olusanya, B. O., Kaplan, M., & Hansen, T. W. R. (2018). Neonatal hyperbilirubinaemia: a global perspective. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 2(8), 610–620. doi:10.1016/s2352-4642(18)30139-1
66. Bhutani VK, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and Rhesus disease of the newborn: Incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. *Pediatr Res* 74:86–100. 2013
67. <[www.designthatmatters.org/portfolio/projects/firefly/](http://www.designthatmatters.org/portfolio/projects/firefly/)>. Acesso em: 10 nov. 2016.

68. Gazzin S, Teribelli C. Bilirubin-induced neurological damage. *The Journal of Maternal Fetal and Neonatal Medicine*, v. 24, 154-155, 2011.
69. Carvalho ES, Carvalho WB. *Terapêutico e Prática Pediátrica*. São Paulo, Editora Atheneu, 1996.
70. Cremer RJ, Perryman PW, Richard DA. "Influence Of Light On Hyperbilirubinemia Of Infants"; *Lancet*, 1: 1094-1101, 1958.
71. [http://www.d-rev.org/assets/2011\\_pas\\_global\\_unmet\\_need\\_for\\_phototherapy.pdf](http://www.d-rev.org/assets/2011_pas_global_unmet_need_for_phototherapy.pdf). Acesso em Maio de 2018.
72. <<http://www2.datasus.gov.br/datasus/index.php?acao=11&id=30730>>. Acesso em junho de 2013.
73. Manning D, Todd P, Maxwell M, Platt MJ. Prospective surveillance study of severe hyperbilirubinaemia in the newborn in the UK and Ireland. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal*, v. 92, p. F342–346, 2007
74. Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinaemia in Canada. *Canadian Medical Association*, v. 175, p. 587–590, 2006.
75. Bhutani VK, Johnson L. Kernicterus in the 21st century. Frequently asked questions. *Journal of Perinatologia*, v. 29, 520–522, 2009.
76. Kaplan M, Bromiker R, Hammerman C. Severe Neonatal Hyperbilirubinemia and Kernicterus: Are These Still Problems in the Third Millennium? *Neonatology*, v. 100, p. 354–362, 2011.
77. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: A Hidden Risk for Kernicterus. *Seminar in Perinatology*, v. 28. 356-364, 2004.
78. The Young Infants Clinical Signs Study Group. Clinical signs that predict severe illness in children under age 2 months: a multicenter study. *Lancet* 2008; 371: 135–42.
79. Lain SJ, Roberts CL, Bowen JR, Nassar N. Early discharge of infants and risk of readmission for jaundice. *Pediatrics* 2015; 135: 314–21.
80. Battersby C, Michaelides S, Upton M, et al. Term admissions to neonatal units in England: a role for transitional care? A retrospective cohort study. *BMJ Open* 2017; 7: e016050.
81. The Lancet. (2018). *Medical negligence: there are no winners*. *The Lancet*, 391(10135), 2079. doi:10.1016/s0140-6736(18)31119-x
82. The Lancet. "Detection and treatment of neonatal jaundice". volume 375, issue 9729, p1845, may 29, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60852-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60852-5)

83. Ministério da Saude. Atenção à saúde do Recém-Nascido: Guia para os profissionais de saúde. 2º ed. Brasília-DF, 2013
84. Moreira MEL, Lopes JMA and Caralho M, O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564 p. ISBN 85-7541-054-7. Available from SciELO Books .
85. Almeida MFB, Nader PJH, Draque CM, Icterícia neonatal. In: LOPEZ, F. A.; CAMPOS JR, D. (Eds). Tratado de Pediatria. 2. ed. São Paulo: Manole, 2010. p. 1515–1526.
86. Valaes T, Kipouros K, Petmezakis M. Effectiveness and safety of prenatal Phenobarbital for the prevention of neonatal jaundice. *Pediatr Res* 1980;14:947-52.
87. Rayburn W, Donn S, Piehl E. Antenatal phenobarbital and bilirubin metabolism in the very low birth weight infant. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1491-3.
88. Barreto SMV, Gonçalves AL, Martinez FE. Efeito do fenobarbital sobre os níveis de bilirrubina em recém-nascidos a termo. *J Pediatr (Rio J)* 1985;58:25-8.
89. Vreman HJ, Stevenson DK. Selection of metalloporphyrin heme oxygenase inhibitors based on potency and photoreactivity. *Pediatr Res* 1993;33:195-9. 5
90. Valaes T, Petmezaki S, Henschke C, Drumond GS, Kapas A. Control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubin production: studies with tin-mesoporphyrin. *Pediatrics* 1994;93:1-11
91. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001;344:581-90.
92. Brown A.K., Kernicterus: Past, Present, and Future. *NeoReviews*. *Am. Acad. Pediatrics*. 4 (2), 2003.
93. Click, R., Dahl-Smith, J., Fowler, L., DuBose, J., Deneau-Saxton, M., and Herbert, J., An osteopathic approach to reduction of readmissions for neonatal jaundice. *Osteopathic Family Physician*. 5(1):17–23, 2013.
94. Howitt, P., Darzi, A., Yang, G.-Z., Ashrafian, H., Atun, R., Barlow, J., ... Wilson, E. (2012). *Technologies for global health. The Lancet*, 380(9840), 507–535.doi:10.1016/s0140-6736(12)61127-1
95. Aydın M, Hardalaç F, Ural B, Karap S, Neonatal Jaundice Detection System. *J Med Syst* (2016) 40: 166 DOI 10.1007/s10916-016-0523-4
96. Facon J, Técnicas de Processamento Digital de Imagens Aplicadas à Área da Saúde. XIII Escola Regional de Informática da SBC - Paraná

97. Viglioglia PA. Biologia cutânea da pele normal. In: VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. Cosmiatria II. 2a ed. Buenos Aires: AP Americana, p.22-37, 1991.
98. Ferreira GR, “Caracterização física e química e controle cinético do efeito da luz azul em polímeros luminescentes: aplicação no desenvolvimento de sensores de radiação para uso em fototerapia neonatal”. Tese de doutorado.2013
99. AAP (American Academy of Pediatrics). Practice parameter: management of hyperbilirrubinemia in the healthy term newborn. Pediatrics 1994; 94: 558-62.
100. Vieira AA, Lima CLMA, Carvalho M,Moreira MEL, O uso da fototerapia em recém-nascidos: avaliação da prática clínica. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. vol.4 no.4 Recife Oct./Dec. 2004
101. Tan KL. The nature of the dose-response relationship of phototherapy for neonatal hyperbilirrubinemia. J Pediatr 1997; 90: 448-52.
102. Maisels MJ. Why use homeopathic doses of phototherapy? Pediatrics 1996; 98: 283-7.
103. Disponível em: [www.phoenixmedicalsystems.com](http://www.phoenixmedicalsystems.com). Acesso em: 29 jul. 2019
104. Hine GJ, Brownell GL, Radiation Dosimetry. Academic Press Inc. New York.1956.
105. Salvajoli JV, Sauhami L, Faria SL, Radioterapia em oncologia, Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, 1999.
106. Bitelli T, Física Nuclear. In: Física e dosimetria das radiações. 2. ed. São Paulo: Centro Universitário São Camilo,2006.
107. Molins RA, Food irradiation: principles and applications. 2001 by John Wiley & Sons, 493pg.
108. Bogdanich W. The Radiation Boom “Radiation Offers New Cures, and Ways to Do Harm”. Disponível em: <http://www.nytimes.com/2010/01/24/health/24radiation.html>. Acesso em: 3 mar.2018
109. Tauahata L, SalatiIPA, Prinziio RDi, Prinziio ARRDi, Radioproteção e dosimetria: fundamentos, 5ª edição, Rio de Janeiro, 2003
110. Schimitberger T. Avaliação de dosímetro orgânico inteligente para aplicação em radioterapia. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais)-REDEMAT, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, mar. 2011.
111. Daros CAK, Detectores de radiação ionizante.pdf. Acessado em: <http://www.higieneocupacional.com.br/download/detectores-daros.pdf>
112. Thomas E. Johnson, Herman Cember. Introduction to Health Physics 4th ed. McGraw-Hill, 888 pg.



113. <http://super.abril.com.br/saude/braquiterapia-alta-dose-golpe-certeiro-cancer440148.shtml> acessado em 28/02/2011.
114. Furnari L, RBFM, de: Controle de qualidade em radioterapia, Revista Brasileira de Física Médica. 2009;3(1):77-90.
115. Vinhal RM, Cardoso TRC, Formiga CKM. Icterícia neonatal e kernicterus: Conhecer para prevenir. Rev Mov 2009;2(3):93-101.
116. Silva MJP, Tamez RN. Assistência ao recém-nascido de alto risco. 3º edição, Editora Grupo GEN, São Paulo.
117. Mimms L, Estrada M, Goden D, “Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia - A Dose: Reponse Relationship”, *Journal of Pediatrics*, v. 83, p. 658-662, 1973.
118. Stokowski LA. Fundamentals of phototherapy for neonatal jaundice. *Advance in neonatal care*. 2011.
119. Vandborg PK, Hansen BM., Greisen G, Ebbesen F, Dose–response relationship of phototherapy for hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2012; 130(2): e352–7, <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2011-3235>
120. Ferreira GR. Preparação, caracterização e fabricação de sensores de acúmulo de dose de radiação azul baseado em sistemas orgânicos luminescentes. 113 folhas. 2009. (Mestrado em Engenharia de Materiais) – REDEMAT/UFOP, 2009.
121. Akcelrud Li. Fundamentos da Ciência dos Polímeros, Edição 1, Barueri - SP, Editora Manole, 2007. 288 páginas.
122. Marinho JRD, Macromoléculas e Polímeros. 1º Edição. Barueri - SP: Editora Manole, 2005. 506 páginas.
123. Solomons TWG, Fryhle CB. Reações de Radicais. In: \_\_\_\_\_. Química orgânica. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC. 2001. p. 398. v. 1. cap.10. Tópico Especial A: Polímeros de Crescimento de Cadeia.
124. Mano EB, Mendes LC, Introdução a polímeros. 2 ed. Edgard Blucher.1999
125. <http://www.apabor.org.br/sitio/index.php>
126. <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/index.php>
127. Gomes M, Azevedo H, Malafaya P, Silva S, Oliveira J, Silva G, Mano RSJ, Reis R. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. Plastics Design Library. 2013: 385-425. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00016-1>

128. Conde LMS. Polímeros naturais para aplicações biomédicas. 2001. Dissertação (Mestrado em Química- Química Medicinal) - Universidade do Minho- Uminho, Braga, Portugal.
129. IAPAR – INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, <http://www.iapar.br>, consultado em 13/07/18.
130. W Qiang, Deng N, Guo J, Deng J. Synthetic Polymers for Biomedical Applications. International Journal of Biomaterials. 2018
131. SCHWARTZ, B. J. Conjugated Polymers as Molecular Materials: How Chain Conformation and Film Morphology Influence Energy Transfer and Interchain Interactions Annu. Rev. Phys. Chem., v. 54, p. 141-172, 2003.
132. Hueder P. M. de Oliveira, Rafael F. Cossiello e Teresa D. Z. Atvars Leni Akcelrud. Dispositivos poliméricos eletroluminescentes. Quim. Nova, Vol. 29, No. 2, 277-286, 2006
133. Recent Advances of the Polymer Micro/Nanofiber Fluorescence Waveguide Hongyan Xia, Tingkuo Chen, Chang Hu and Kang Xie, Polymers 2018, 10, 1086; doi:10.3390/polym10101086.
134. Allinger Norman L., Cava, Michael P., Jongh, Don C. De, Química Orgânica, Editora, LCT.
135. Dechant, J. Mechanisms of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters, v. 26, n. 6, 1988.
136. A Review on the Emitting Species in Conjugated Polymers for Photo- and Electroluminescence. Show-An Chen\* ( ), Tzu-Hao Jen ( ) and Hsin-Hung Lu ( ) Journal of the Chinese Chemical Society, 2010, 57, 439-458.
137. Atvars, Tereza D.Z. and Martelli, Cláudia. Espectroscopia de Luminescência, in [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)
138. Blow CM. Rubber technology and manufacture, 2. ed. Institution of therubber industry, 1975.
139. Agostini DLS. “Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese”.2009
140. Van Beilen JB, Poirier Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. Trends Biotechnol 2007;25:522–9.
141. Cabrera FC, Agostini DLS, dos Santos RJ, Teixeira SR, Rodríguez-Pérez MA, Job AE. Thermal degradation of both latex and latex cast films forming membranes. J Appl Polym Sci 2013. n/a–n/a.

142. Dall'antonia A C. *et al.*; Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 16, n° 3, p. 239-245, 2006.
143. Flory, P. J. Network structure and the elastic properties of vulcanized rubber. *Chemical Reviews*, v. 35, p. 51-75, 1944.
144. Rochmadi H A, Honggokusumo S H. Vulcanization kinetics of naturalrubber based on free sulfur determination. *Indonesian Journal Chemistry*, v. 13, p. 21-27, 2013.
145. Scherillo G. *et al.* Tailoring assembly of reduced graphene oxide nanosheets to control gas barrier properties of natural rubber nanocomposites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 2230-2234, 2014.
- 146.** Cottinet, P-J. *et al.* Electro-thermo-elastomers for artificial muscles. **Sensors and Actuators A**, v. 180, p. 105-112, 2012.
147. Lin T. *et al.* New Design of Shape Memory Polymers Based on Natural Rubber Crosslinked via Oxa-Michael Reaction. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 5695-5703, 2014.
148. Quitmann D. *et al.* Environmental Memory of Polymer Networks under Stress. **Advanced Materials**, v. 26, p. 3441-3444, 2014.
149. QUITMANN, D. *et al.* Solvent-Sensitive Reversible Stress-Response of Shape Memory Natural Rubber. **Applied Materials and Interfaces**, v. 5, p. 3504-3507, 2013.
150. Qiu T, Zeng Q, Ao N. Preparation and characterization of chlorinated nature rubber (CNR) based polymeric quaternary phosphonium salt bactericide. **Materials Letters**, v. 122, p. 13-16, 2014.
151. Zhang Y. *et al.* Morphology and Antibacterial Properties of Natural Rubber Composites Based on Biosynthesized Nanosilver. **Journal Applied Polymer Science**, DOI: 10.1002/APP.40746, 2014.
152. Rastegari AA, Bordbar A-K, Taheri-Kafrani A. Interactions of cellulose with cationic surfactants: Using surfactant membrane selective electrodes and fluorescence spectroscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;73:132–9.
153. Anuchai K, Weder C, Magaraphan R. Strain sensitive photonic natural rubber. *Plast Rubber Compos* 2008;37:281–7.
154. Dos Santos K A M. Estudo da fotodegradação de poliisoprenos naturais (borrachas naturais) em radiações específicas do ultravioleta (UV), *Univ. Ci. Saúde, Brasília*, V. 3, N. 2, 303-312, 2005.

155. Cabrera F C. “Membranas de borracha natural recobertas com nanopartículas de ouro: Síntese e Caracterização”. 2012.
156. Cumpston BH, Jensen KF. Photo-oxidation of polymers used in electroluminescent devices, *Synth. Met.* 73 (1995) 195–199.
157. FRIEND, R. H. et al. *Electroluminescence in conjugate polymers*, Nature, v.397, n.14, jan. 1999.
158. PARKER, C.A. *Photoluminescence of Solutions*. 1968, Amsterdam: American Elsevier.
159. SCOTT, J. C.; KAUFMAN, J. H.; BROCK , P. J.; DIPIETRO, R.; SALEM, J. e GOITIA, J. A. Degradation and failure of MEH-PPV light-emitting diodes. v. 79, n. 5, p. 2745 - 2751, 1996.
160. ZYUNG, T. e KIM, J. Photodegradation of poly( p- phenylenevinylene) by laser light at the peak wavelength of electroluminescence. *Applied Physics Letter*, v. 67, n. 23, p. 3420-2422, 1995.
161. COSSIELLO, R. D. F. *Fotofísica de Polímeros Emissores de Luz: MEH-PPV*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas. 2003.
162. CUMPSTON, B.; JENSEN, H.; e KLAVS F. Photo-oxidation of polymers used in electroluminescent devices. *Synthetic Metals*, v. 73, p. 195-99, 1995.
163. SCURLOCK, R. D.; WANG, B.; OGILBY, P. R.; SHEATS, J. R. e CLOUGH, R. L. Singlet Oxygen as a Reactive Intermediate in the Photodegradation of an Electroluminescent Polymer. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, p. 10194-10202, 1995.
164. SUTHERLAND, D. G.; CARLISLE, A.; ELLIKER, P.; FOX, G.; HAGLER, T. W.; JIMENEZ, I.; LEE H. W.; PAKBAZ, K.; TERMINELLO, L. J. e WILLIAMS, S. C. Photo-oxidation of electroluminescent polymers studied by core-level photoabsorption spectroscopy. *Applied Physics Letter*, v. 68, n. 15, p. 2046-2048, 1996.
165. Ferreira G. R. “Caracterização física e química e controle cinético do efeito da luz azul em polímeros luminescentes: aplicação no desenvolvimento de sensores de radiação para uso em fototerapia neonatal”. 2015
166. SANDERS, J. P. et al. Devices for self-monitoring sedentary time or physical activity: a scoping review. *Journal of medical Internet research*, JMIR Publications Inc., v. 18, n. 5, 2016.

167. CHORTOS, A.; BAO, Z. Skin-inspired electronic devices. *Materials Today*, Elsevier, v. 17, n. 7, p. 321–331, 2014. ASTM F619 (2014) Standard practice for extraction of medical plastics. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
168. PAUL, B. K. et al. Manufacturing of smart goods: Current state, future potential, and research recommendations. *Journal of Micro and Nano-Manufacturing*, American Society of Mechanical Engineers, v. 4, n. 4, p. 044001, 2016.
169. ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environment international*, Elsevier, v. 35, n. 2, p. 438–449, 2009.
170. HAGHI, M.; THUROW, K.; STOLL, R. Wearable devices in medical internet of things: scientific research and commercially available devices. *Healthcare informatics research*, v. 23, n. 1, p. 4–15, 2017.
171. STOPPA, M.; CHIOLERIO, A. Wearable electronics and smart textiles: a critical review. *sensors*, v. 14, n. 7, p. 11957–11992, 2014.
172. AJAMI, S.; TEIMOURI, F. Features and application of wearable biosensors in medical care. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 20, n. 12, p. 1208, 2015.
173. PAGE, T. A forecast of the adoption of wearable technology. *International Journal of Technology Diffusion (IJTD)*, IGI Global, v. 6, n. 2, p. 12–29, 2015.
174. Rippel, M. M. “Caracterização microestrutural de filmes e partículas de latex de borracha natural”. 2005.
175. <http://radiant-imaging-color-calculator.software.informer.com/>
176. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
177. ASTM F813-07 (2012) Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. ASTM International, West Conshohocken, PA.
178. Sze SM. *Physics of semiconductor devices*. 2007.
179. Chiang CK, Finger CR, Park YW, et al. Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Phys. Rev. Lett.*, v 39, n 17, p 1098-1101, 1977.
180. Silva MM, Novais SMV, Silva ESS, Schimitberger T, Macedo ZS, Bianchi RF. CdWO<sub>4</sub>-on-MEH-PPV:PS as a candidate for real-time dosimeters. *Materials Chemistry and Physics*, v. 136, p. 317-319, 2012.

181. Schimitberger T, Ferreira GR, Souza CJ, Silva MM, Saraiva MF, Bianchi RF. Detector de radiação orgânico e inteligente para raios x de uso em radioterapia clínica. *Tecnologia em Metalurgia Materiais e Mineração*, v. 9, p. 48-52, 2012.
182. Stokowski LA. Fundamentals of phototherapy for neonatal jaundice. *Advance in neonatal care*. 2011.
183. Piovesan E, Hidalgo AA, Marletta A, Veja ML, Ruggiero R. Influência da espessura nas propriedades de absorção e emissão e na morfologia de filmes automontados de poli(p-fenileno vinileno). *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 5, 916-921, 2006.
184. Chambon S, Rivaton A, Gardette JL, Firon M, Lutsen L. Aging of a donor conjugated polymer: photochemical studies of the degradation of poly[2-methoxy-5-(3,7-dimethyloctyloxy)-1,4-phenylenevinylene], *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 45 (2007) 317–331.
185. Hale GD, Oldenburg SJ, Halas NJ. Effects of photo-oxidation on conjugated polymer films, *Appl. Phys. Lett.* 71 (1997) 1483–1485.
186. Frade MA, Valverde RV, Assis RV, Coutinho-Netto J, Foss NT. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int J Dermatol.* 2001;40:238–40.
187. Floriano JF, da Mota LS, Furtado EL, Rossetto VJ, Graeff CFO. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2014) 25: 461. doi:10.1007/s10856-013-5089-9
188. Dick TA, dos Santos LA. In situ synthesis and characterization of hydroxyapatite/natural rubber composites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 77 (2017) 874–882.
189. Akcelrud, L. Electroluminescent Polymers. *Progress in Polymer Science*,28:875-962, 2003
190. Kent C. Basics of Toxicology. Wiley. 416 pages. 1998.
191. ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity, Eur. Comm. (2009).
192. Baek HS, Yoo JY, Rah DK, et al. Evaluation of the Extraction Method for the Cytotoxicity Testing of Latex Gloves. *Yonsei Medical Journal* Vol. 46, No. 4, pp. 579 - 583, 2005.
193. J.F. Borin, E.S. Brito, P. Nicolutti, C.F.O. Graeff, R.F. Bianchi,2005
194. Burroughes, J. H.; Bradley, D. D. C.; Brown, A. R.; Marks, R. N.; Mackay, K.; Friend, R. H.; Burns, P. L. & Holmes, A. B. - Nature, 347, p.539 (1990).

195. Argyrakis, P.; Kobryanskii, M. V.; Sluch, M. I. & Vitukhnovsky, A. G. - Synth. Met., 91, p.159-160 (1997).
196. Y Galvão Gobato, A. Marletta, R.M. Faria, F.E.G. Guimaraães, J.M. de Souza, and E.C. Pereira, Appl. Phys. Lett. 81, 942 ~2002!.
197. Schwartz, B. J. Conjugated polymers as molecular materials: how chain conformation and film morphology influence energy transfer and interchain interactions. Annu. Rev. Phys. Chem. 54, 141–172 (2003).
198. Anni, M.; Gigli, G.; Cingolani, R.; Gobato, Y. G.; Vercik, A.; Marletta, A.; Guimarães, F. G. E. & Faria, R. M. - Phys. Rev. Condens. Matter Mater. Phys., **68**, 035215.1-035215.6 (2003).
199. De Vasconcelos, C. K. B.. Estudo das propriedades óticas do MEH-PPV induzidas por luz azul. 2011. 124 páginas. Dissertação (Mestrado – Engenharia de Materiais). REDEMAT – UFOP 2011.
200. Murase, M. S. W.. Sistema luminescente à base de PVC:MEH-PPV visando aplicação em dosimetria tridimensional. 2015. 79 páginas. Dissertação (Mestrado – Física dos Materiais). FIMAT – UFOP 2015.
201. Ferreira, G. R., De Vasconcelos, C. K. B., Schimitberger, T., Silva, M. M., Duarte, A. S., Bianchi, R. F.. Caracterização de filmes de ps/meh-ppv/alq3 para aplicação em sensores de acúmulo de radiação azul. Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009. 98
202. Braga, N. O.. Nano e microfibras luminescentes à base de poli(2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi)*p*-fenilenovinileno) - MEH-PPV e o poli (cloreto de vinila) – PVC. 2015. 96 páginas. Dissertação (Mestrado – Física dos Materiais). FIMAT – UFOP 2015.

## **Anexo I**

### **Estudo do efeito da radiação não ionizante nas propriedades óticas e toxicológicas de nanopartículas de MEH-PPV hidrofílicas**



Nanopartículas de MEH-PPV hidrofílicas



## Resumo

Este trabalho descreve a síntese e a caracterização de nanomateriais fotoluminescentes hidrofílicas obtidas a partir do polímero conjugado poly[2-methoxy,5-(2'etilhexyloxy-p-fenilenovileno) (MEH-PPV). As partículas foram preparadas usando o método descrito por Greem *et al* (2009). A temperatura ambiente, e estas foram irradiadas sob as mesmas condições ideais usadas no tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal (460 nm, 40  $\mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$ ). Neste contexto, as propriedades óticas foram investigadas por espectroscopias de absorção e emissão, microscopia de fluorescência e seu potencial toxicológico foi investigado por teste de citotoxicidade *in vitro* pelo método de redução do MTT. A partir dos resultados encontrados, abre-se a possibilidade de aplicação destas nanopartículas de MEH-PPV hidrofílicas como alternativas atraentes não somente para imageamento celular, mas também para fabricação de dispositivos emissores de luz com potencial aplicação médico-hospitalar.

**Palavras-chave:** *nanomateriais, partículas luminescentes, radiação, sensor colorimétrico, toxicidade.*

## Introdução

Diversos tipos de radiações são usados em tratamentos médicos, como radioterapia para câncer, a fototerapia com luz azul para icterícia. Por isso, alguns dispositivos que auxiliem no progresso do tratamento médico são de suma importância<sup>1</sup>. Nos últimos anos, a biotecnologia de fluorescência atraiu atenção considerável e forneceu ferramentas poderosas para uma variedade de aplicações, como a imageamento celular<sup>2</sup>. Neste contexto, os polímeros conjugados se tornaram alternativas atraentes pois são materiais extremamente luminescentes feitos inteiramente de constituintes relativamente benignos<sup>3</sup>. A fotofísica destes polímeros já é bem compreendida devido a aplicações em dispositivos de emissão de luz, células solares e eletroeletrônicos orgânicos. Ademais, vários grupos já exploraram o seu potencial em biologia e em escalas nanométricas e também já induziram a sua hidrofílicidade através da incorporação de grupos laterais iônicos ou solúveis em água. No entanto, o efeito da radiação sobre essas nanopartículas luminescentes ainda não foi compreendido. A este respeito, buscou-se neste trabalho investigar os efeitos óticos e citotóxicos da radiação azul nas nanopartículas hidrófilas de MEH-PPV.

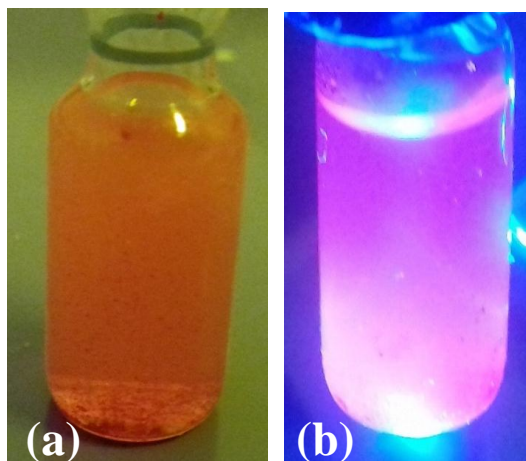
## Materiais e Métodos

O poli[2-metóxi,5-etil(2-hexilóxi) parafenileno] -MEH-PPV foi adquirido da Sigma Aldrich. O MEH-PPV (CAS No. 138184-36-8) utilizado nesse trabalho apresenta massa molar numérica média ( $M_n$ ) dentro do intervalo 70.000 a 100.000 g/mol e absorção e emissão máximas em comprimentos de onda em torno de, respectivamente, 495 nm e 555 nm<sup>4,5</sup> quando solubilizado em tolueno. As nanopartículas foram sintetizadas a partir do método descrito por *Gerhardt et al* (2009), como mostrado as etapas na Figura 1.

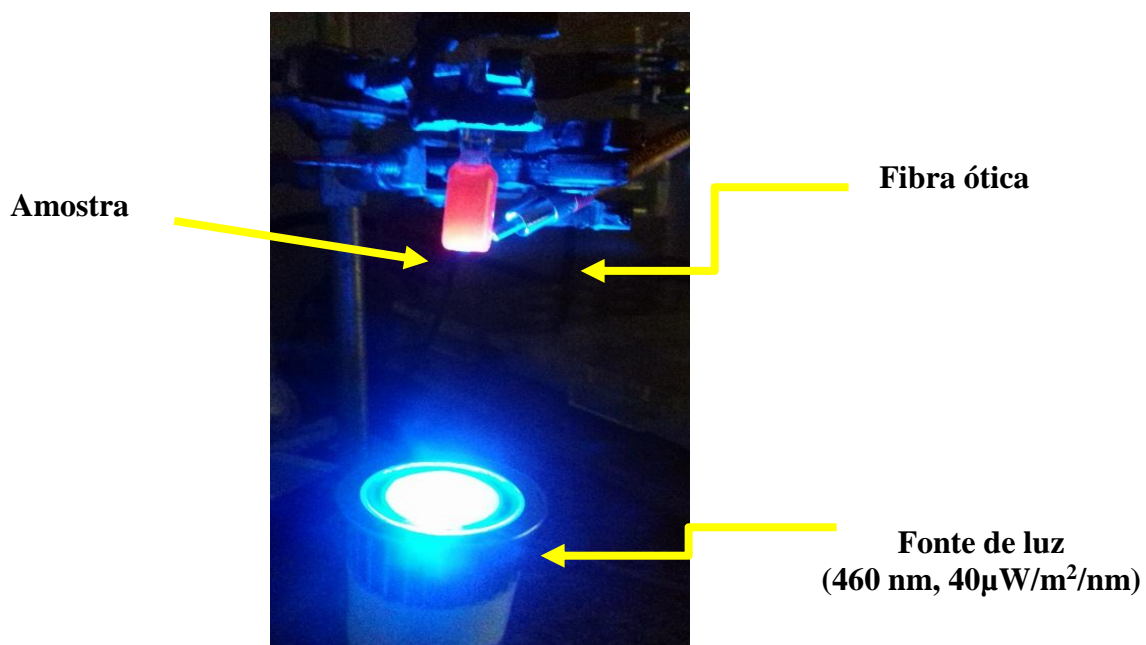


Figura 1: (a) Solução MEH-PPV (b) As nanopartículas foram preparadas usando o método similar ao descrito por Gerhardt et al (2009), (c) banho ultrassônico por 2 h e (d) solução contendo partículas de MEH-PPV hidrofílicas não filtrada.

Após a preparação das partículas hidrofílicas de MEH-PPV, a solução contendo as mesmas foi filtrada em filtro de seringa de 220 nm, Figura 2. Em seguida, a solução filtrada contendo nanopartículas foi condicionada às mesmas condições usadas no tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal ( $40\mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}, 460\text{nm}$ ), como mostrado na Figura 3.



**Figura 2:** (a) Solução não filtrada contendo partículas de MEH-PPV hidrofílicas, sob luz azul. (b) Solução filtrada, em filtro de seringa de 220 nm, contendo nanopartículas de MEH-PPV hidrofílicas.



**Figura 3:** Sistema adaptado para investigação da luminescência da solução contendo nanopartículas de MEH-PPV em função do tempo de exposição à radiação não ionizante (azul).

O efeito da radiação não ionizante (luz azul) sobre as nanopartículas luminescentes foi investigado através de caracterizações óticas (UV-Vis, Fluorímetro e Fotoluminescência), microscopia de fluorescência e seu potencial citotóxico foi investigado pelos testes de citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio MTT (Mosmann, 1983) usando células CHO-k1 (Células de Ovário de Hamster Chinês). As células foram cultivadas em 10 mL de DMEM/F10 (Sigma) suplementada com 10% soro bovino fetal em frascos de 25-cm<sup>2</sup> e mantidas em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

Ensaio de citotoxicidade baseado na atividade metabólica – MTT: A citotoxicidade será avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Para tanto, as células serão semeadas em uma densidade de  $1,2 \times 10^5$  células por poço, em placa de 24 poços transparente. Após 48 horas de estabilização em estufa com CO<sub>2</sub> a 37° C, as células serão expostas tanto as amostras sólidas quanto aos extratos líquidos por períodos a serem determinados. O controle negativo e o

controle positivo também serão realizados. Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental serão feitas 4 repetições. Após o período de incubação será adicionado o MTT e as células serão novamente incubadas por mais 4 horas. Em seguida, o meio de cultura será retirado, e será adicionado DMSO para a precipitação do cristal de formaram e a absorbância correspondente a cada amostra será determinada em leitora de microplaca a 540 nm. A absorbância obtida para as células do CTR será considerada como 100% de viabilidade celular (VC). A VC das outras amostras será determinada pela seguinte fórmula:

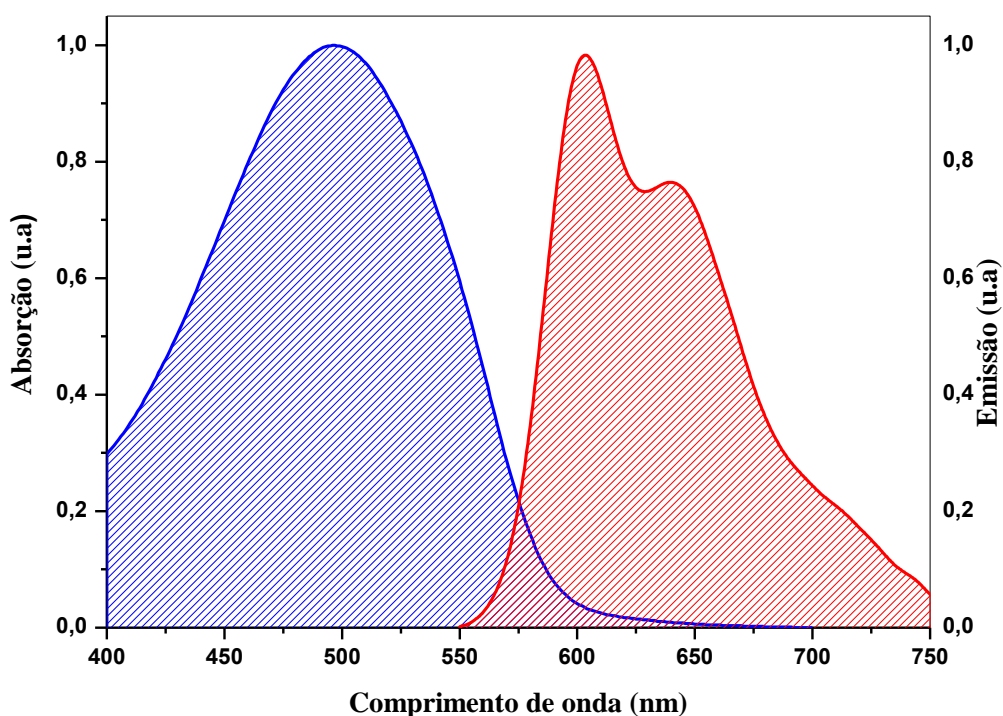
$$VC_{ELC} = [(Abs_{ELC} - Abs_{Br}) / (Abs_{CTR} - Abs_{Br})] \times 100.$$

Onde:  
VC<sub>ELC</sub> = Viabilidade Celular das células expostas ao ELC  
Abs<sub>AF</sub> = Absorbância encontrada para as células expostas a ELC  
Abs<sub>CTR</sub> = Absorbância encontrada para as células do controle negativo  
Abs<sub>Br</sub> = Absorbância encontrada para o branco (poço apenas com meio de cultura)

## **Resultados preliminares e Discussão**

### *Caracterização ótica das nanopartículas hidrofílicas de MEH-PPV*

Por espectroscopia de absorção e emissão foi possível identificar as principais respostas óticas frente à uma irradiação. As respostas óticas das nanopartículas hidrofílicas de MEH-PPV foram mostradas na Figura 4. Neste contexto, para as nanopartículas de MEH-PPV observou-se que as principais bandas foram em 495 nm para absorção e em 603 nm emissão. Quando comparado aos dados fornecidos pelo fabricante, detectou-se que houve um deslocamento da banda de emissão, de 555 nm para 603 nm. Essa pequena diferença observada na banda de emissão pode ser justificadas segundo a literatura<sup>6,7</sup> pelo efeito de solvatocromismo uma vez que as nanopartículas estão solúveis em água. No entanto, as características do cromóforo MEH-PPV prevaleceram pois as nanopartículas absorvem no azul e emitem no vermelho



**Figura 4:** Espectros de Absorção e Emissão da solução filtrada (filtro de seringa de 220 nm) contendo nanopartículas de MEH-PPV. O espectrofotômetro de absorção da marca Varian, modelo Cary 50, operando numa faixa de 190 a 800 nm, com razão de *scan* de  $600 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para a avaliação das regiões de emissão das membranas foi utilizado o espectrofluorímetro de bancada PerkinElmer Modelo LS55 com emissão no intervalo de 200 a 900 nm.

Já a Figura 5 mostra a avaliação do efeito da luz azul (460nm) sobre as nanopartículas luminescentes. O espectro de fotoluminescência das nanopartículas luminescentes mostra uma diminuição da intensidade da emissão em função do tempo de exposição à radiação durante aproximadamente 15 horas. Neste contexto, o espectro de Fotoluminescência (PL) para a membrana MEH-PPV/BN se assemelha aos resultados relatados por Ferreira et al (2017) descritos sobre a influência da radiação não-ionizante, especialmente luz azul. Outra característica relevante é o deslocamento para menores (*blue shift*) comprimentos de onda também observados na Figura 5.

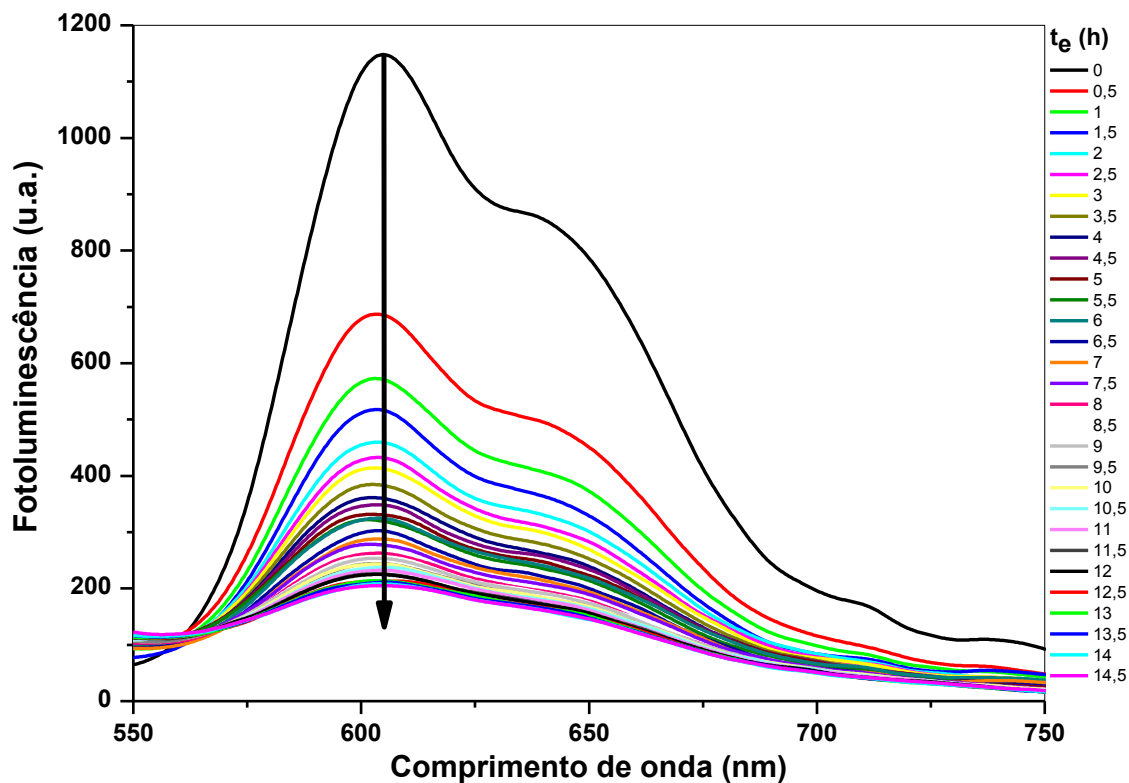


Figura 5: Espectro de fotodegradação por tempo de exposição da solução filtrada (filtro de seringa de 220 nm) contendo nanopartículas de MEH-PPV sob irradiação de luz azul (460 nm,  $40\mu\text{W}/\text{m}^2/\text{nm}$ ). Espectrofotômetro *Ocean Optics USB 2000* acoplado a uma lâmpada de LED *Spot Ligth* azul ( $\lambda$  máx = 460 nm, MCL 127-00-F), como fonte de excitação das amostras.

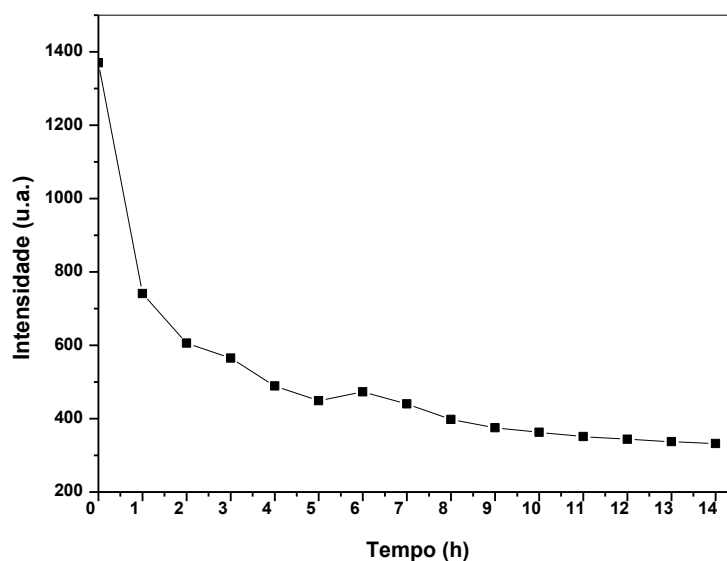
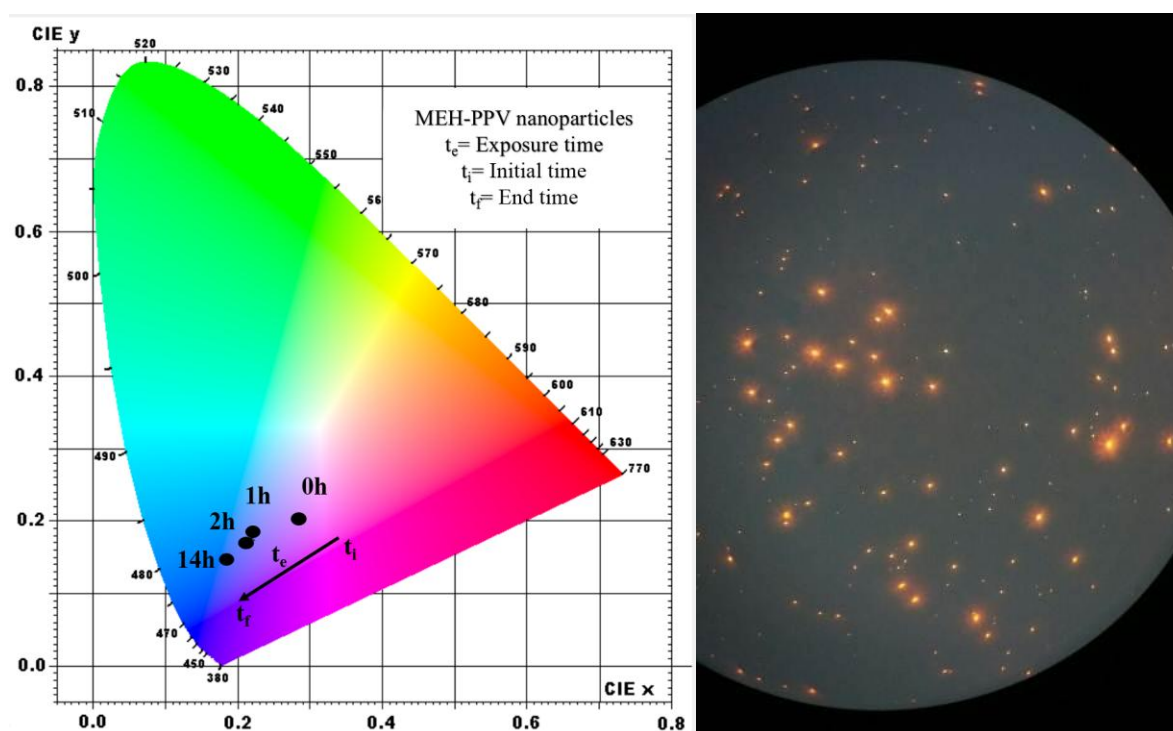


Figura 6: Gráfico de Intensidade da luz emitida da solução de nanopartículas hidrofílicas de MEH-PPV por um tempo de exposição ( $t_e$ ).

O deslocamento *blue shift* é resultante da diminuição do comprimento de conjugação do MEH-PPV ocasionado pelo processo de fotooxidação das ligações vinílicas ( $C = C$ ) por carbonilas ( $C = O$ ). Este comportamento confere ao cromóforo perda da luminescência bem como alteração da sua cor característica<sup>8,9,10</sup>.

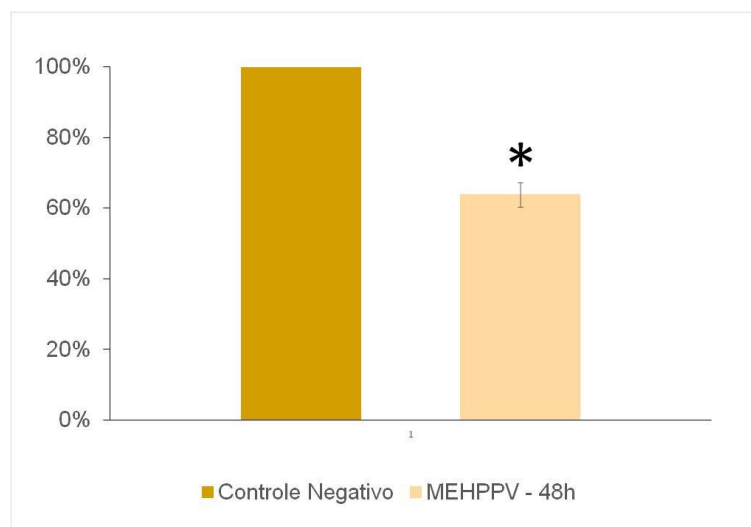
Para melhor compreender o comportamento das nanopartículas luminescentes quando exposta à luz azul foi projetado o Diagrama de Cromaticidade CIE como mostrado na Figura 7. Os dados foram extraídos da Figura 5 obtidos por medição direta. E, para a visualização da cor real encontra-se ao lado do diagrama uma imagem obtida por um microscópio de fluorescência. Neste contexto, foi possível observar que houve um degrade de cores.



**Figura 7:** Diagrama de cromaticidade CIE (1931) representando as mudanças de cor refletida ao longo da exposição à luz azul. Ao lado encontra a imagem obtida a partir de um microscópio de fluorescência (com aumento de 1000 vezes) de um conjunto de nanopartículas luminescente sob a luz azul.

Os resultados óticos encontrados a partir das Figuras 5, 6 e 7 corroboram com os descritos na literatura<sup>6,7</sup> sobre a influência da radiação não-ionizante, especialmente luz azul, sobre os espectros de absorção e emissão do MEH-PPV. Estes sofrem alterações em suas formas e intensidades devido principalmente aos efeitos de fotooxidação da cadeia principal do polímero.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* do material foi realizada através do teste de citotoxicidade pelo método MTT.



**Figura 8: A avaliação da citotoxicidade *in vitro* do material foi realizada através do teste de citotoxicidade pelo método MTT.**

Observando os resultados, percebe-se que a viabilidade das células expostas às nanopartículas na diluição 1:1 foi estatisticamente menor (64%) quando se compara com o seu respectivo controle negativo (100 %). Segundo a norma ISO 10993/5, um material que apresenta uma viabilidade celular maior que 70 %, é considerado atóxico para o meio biológico. Sendo assim, baseado nestes resultados, novos experimentos precisam ser realizados com diluições maiores de solução de nanopartículas, afim de estabelecer uma curva dose - resposta e enquadrar das nanopartículas de MEH –PPV como biocompatíveis.

## Conclusão

A partir dos resultados encontrados, abre-se a possibilidade de aplicação destas nanopartículas de MEH-PPV hidrofílica como alternativas atraentes não somente para imageamento celular, mas também para fabricação de dispositivos emissores de luz com potencial aplicação como nano sensores de radiação médico-hospitalar. E apesar do seu potencial citotóxico *in vitro* ter sido tóxico para a linhagem celular CHO-K1 mais estudos experimentais de toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* e testes de irritação e de alergenicidade, precisam ser executados, a fim de realizar uma avaliação de risco mais



completa sobre os potenciais riscos deste novo material para a saúde humana e garantir a segurança do produto.

## Referências Bibliográficas

1. M. Doshi, A. Copik, A. J. Gesquiere. Development and characterization of conducting polymer nanoparticles for photodynamic therapy *in vitro*. 2015.
2. J. Xu, Y. Zhou, G. Cheng, S. Liu, M. Dong, C. Huang. 'Imperfect' conjugated polymer nanoparticles from MEH-PPV for bioimaging and Fe(III) sensing. 2014.
3. B. M. Green, P. Howes, C. BERRY, O. ARGYROS, M. THANOU. Simple conjugated polymer nanoparticles as biological labels. 2009.
4. M. V. M. Pereira. Propriedades ópticas de blendas e bicamadas de polímero semicondutor e aplicações em dispositivos emissores de luz. 2008
5. D. L. M. Bazani. Caracterização de polímeros semicondutores para o uso de sensores de radiação gama. 2008.
6. G. R. Ferreira. "Preparação, caracterização e fabricação de sensores de acúmulo de dose de radiação azul baseado em sistemas orgânicos luminescentes". 2009.
7. G.R. Ferreira, A.M. Tannure, L.C. Cardoso, M.F. Siqueira, A.G.C. Bianchi, R.F. Bianchi, Colorimetric dosimeter to promote most efficient use of neonatal phototherapy. 2017
8. J.F. Borin, E.S. Brito, P. Nicolutti, C.F.O. Graeff, R.F. Bianchi, 2005
9. Burroughes, J. H.; Bradley, D. D. C.; Brown, A. R.; Marks, R. N.; Mackay, K.; Friend, R. H.; Burns, P. L. & Holmes, A. B. - Nature, 347, p.539 (1990).
10. Argyrakis, P.; Kobryanskii, M. V.; Sluch, M. I. & Vitukhnovsky, A. G. - Synth. Met., 91, p.159-160 (1997)
11. Pires, F., Ferreira, Q., Rodrigues, C. A. V., Morgado, J., & Ferreira, F. C. (2015). Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(6), 1158–1168. doi:10.1016/j.bbagen.2015.01.020
12. Wu, C., Bull, B., Szymanski, C., Christensen, K., & McNeill, J. (2008). Multicolor Conjugated Polymer Dots for Biological Fluorescence Imaging. *ACS Nano*, 2(11), 2415–2423. doi:10.1021/nn800590n

13. Dai, R., Wu, F., Xu, H., & Chi, Y. (2015). Anodic, Cathodic, and Annihilation Electrochemiluminescence Emissions from Hydrophilic Conjugated Polymer Dots in Aqueous Medium. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(28), 15160–15167. doi:10.1021/acsami.5b04305