

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais
(POSMAT)



Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos

Tese de Doutorado
Pedro Henrique Benites Aoki

Presidente Prudente

2014

Pedro Henrique Benites Aoki

Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração “Materiais Poliméricos, Híbridos e Nano-Estruturados”, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Presidente Prudente, SP.

Prof^a. Dr^a. Marystela Ferreira

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Campus de Sorocaba, SP.

Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de São José do Rio Preto, SP.

Prof. Dr. Noboru Hioka

Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá, PR.

Prof. Dr. Henrique de Santana

Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina, PR.

Presidente Prudente, SP

2014

Aoki, Pedro Henrique Benites.

Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de
Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos/
Pedro Henrique Benites Aoki, 2014

145 f. : il.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino
Tese (Doutorado)- Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Presidente Prudente, 2014

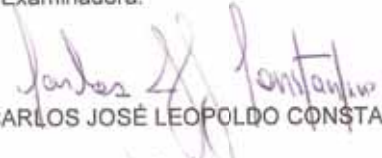
1. Filmes Finos. 2. Vesículas lipídicas. 3. Língua
eletrônica. I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.

Ata da Defesa



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE PRESIDENTE PRUDENTE.

Aos 28 dias do mês de novembro de 2014, às 8:00 horas, na Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO, do Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA, do(a) Departamento de Física / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Prof.^a Dr.^a MARYSTELA FERREIRA, do(a) Campus de Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA, do(a) Departamento de Química / Universidade Estadual de Londrina, Prof. Dr. NOBORU HIOKA 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 PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI, intitulado "SISTEMAS BIOINSPIRADOS APLICADOS NO ESTUDO DE INTERAÇÃO E SENSORIAMENTO DE DERIVADOS XANTENICOS". Após a exposição, o discente foi arguido 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. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO


Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA


Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA


Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA


Prof. Dr. NOBORU HIOKA

*Dedico este trabalho a minha família:
Meus pais Pedro e Marinês, minha irmã
Natália e minha esposa Sabrina.*

*"Education is the most powerful weapon which
we can use to change the world."*

*“A educação é a arma mais poderosa que
podemos usar para mudar o mundo”*

- Nelson Mandela

Agradecimentos

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta e/ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Em particular, agradeço:

À meu orientador Casé, com quem pude construir uma grande amizade ao longo destes quase 10 anos de iniciação científica, mestrado e doutorado. Obrigado por todos os ensinamentos, incentivo e confiança, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha esposa Sabrina... parceira para todas as horas....que acorda cantarolante pela manhã, me trazendo alegria e felicidade, mesmo em dias mais difíceis. Obrigado por tudo, principalmente por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando e por nunca me deixar desistir.

À minha família, meus pais Pedro e Marinês, e minha irmã Natália, que não mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigado pela base sólida que me deram, pela paciência e compreensão.

Ao Totó que me trouxe para o grupo, pelos ensinamentos e exemplo de humildade/simplicidade. Agradeço o prof. Eloi Feitosa e meu co-orientador Wilker Caetano, quem me apresentou aos sistemas bioinspirados. Agradeço também a valiosa contribuição dos profs. Fernando V. Paulovich, Milton H. Shimabukuro e Osvaldo N. Oliveira Jr.

Aos professores do DFQB e POSMAT em especial os professores Paulo Noronha, Aldo Job e Carlos Tello além das secretárias Andressa Talon e Juvanir Ruys de Mello.

I would like to express here my deepest appreciation to all M³ group members. Particularly, I would like to thank Dr. Carlos Marques and Dr. André Schroder for their support, their ideas and the fruitful discussions that guided me during the whole period I was in Strasbourg, France.

A special thanks to Dr. Ricardo Aroca and his team at University of Windsor, Canada. Thanks for the warm welcome, the experiments, discussions, papers and the life lessons I had the privilege to share.

À formação atual do grupo “NOIX”, Pri, Bina, Leo, João, Gabi, Diego, Rafa, Mateusão, Mateus e Mateuzinho. A velha guarda do grupo, Diogão, Felipão, Zanfa, Adriana, Iglu Batera, Gabriel, Vini Lopes, entre outros igualmente importantes pelos cafés, churrascos, discussões e convivência diária.

À “família” Balão Mágico: Diogão, Caito, Da Pontinha, Duuuber, Julião, Paulinho, Luizão e Alvarito. Hoje não compartilhamos mais o mesmo teto de república, mas um forte laço de amizade, onde quer que cada um esteja. Nesse time, não poderia deixar de escalar, Flavinho, Pirapó e Ricão.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

Resumo

AOKI, P.H.B., **Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos**. 2014. 145f. Tese (Doutor em Ciências e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Presidente Prudente, 2014.

Nesta tese de doutorado foram apresentadas duas vertentes de trabalho. A primeira trouxe os resultados referentes à fabricação de filmes finos (nanômetros de espessura) de fosfolipídios utilizando as técnicas *Layer-by-Layer* (*dipping* e *spray*) e Langmuir-Blodgett (LB). Os objetivos principais foram: i) otimizar o crescimento dos filmes finos contendo diferentes arquiteturas moleculares; ii) explorar a eficiência destas diferentes arquiteturas moleculares na detecção de derivados xantênicos em soluções diluídas; iii) investigar a influência de filmes contendo fosfolipídios como matrizes para a imobilização de enzimas na construção de biossensores. Na segunda vertente do trabalho foi abordado o estudo de interação entre o derivado xantênico eritrosina e sistemas miméticos de membrana biológica baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUV). Arquiteturas moleculares significativamente distintas foram obtidas dependendo da técnica empregada no crescimento dos filmes (LB, *dipping*- e *spray*-LbL). Essas diferentes arquiteturas moleculares mostraram-se fundamentais para a resposta dos sensores e, conseqüentemente, sobre as discriminações das soluções. Além disso, matrizes formadas por filmes de fosfolipídios demonstraram-se superiores para a imobilização de enzimas na construção de biossensores, possivelmente por apresentar um ambiente biologicamente compatível para a adsorção de biomoléculas. Em termos de interação, o derivado xantênico eritrosina apresentou interações com a membrana lipídica, principalmente quando formada por fosfolipídios insaturados. De particular relevância, os efeitos da oxidação lipídica em GUV, gerados pela foto-ativação do xantênico, foram relacionados a interações entre os oxigênios singletos e as insaturações das cadeias dos fosfolipídios.

Abstract

AOKI, P.H.B., **Bioinspired Systems Applied on the Interaction and Sensing Studies of Xanthene Derivatives**. 2014. 145f. Thesis (Doctor in Science and Technology of Materials) - UNESP, Presidente Prudente, 2014.

In this thesis we have presented two pathways of work. The first one brought the results of the phospholipid immobilization as thin films (nanometer thickness) by using the Layer-by-Layer (dipping and spray) and Langmuir-Blodgett (LB) techniques. The main goals were to: i) optimize the thin film growth toward different molecular architectures; ii) explore the efficiency of these different molecular architectures to detect xanthenes derivatives in diluted water solutions; iii) investigate the influence of phospholipids matrices for the immobilization of enzymes in the design of biosensors. In the second pathway, we have addressed the interaction study between the xanthene erythrosine and Langmuir films and giant unilamellar vesicles (GUV) as mimetic systems of biological membrane. Significantly different molecular architectures were obtained depending on the technique used in the growth of the films (LB, dipping- and spray-LbL). These different molecular architectures have shown to be essential for the response of the sensing units and, therefore, to the discrimination of the solutions. In addition, matrices composed by phospholipid films were proved be superior for the immobilization of enzymes in the design of biosensors, possibly due to a more biologically friendly environment to adsorb biomolecules. Interactions were observed between the xanthene erythrosine and the lipid membrane, especially when composed by unsaturated phospholipids. The effects of lipid oxidation in GUV, generated by the xanthene photo-activation, were assigned to the interaction between singlet oxygen and unsaturations of phospholipid chains.

Lista de figuras

Figura 1: fluxograma apresentando a estruturação desta tese de doutorado.....	2
Figura 2: membrana celular representada pelos modelos (a) de "mosaico-fluido (S-N)" e b) versão atualizada baseada no conceito " <i>Membranes are More Mosaic than Fluid</i> " (Nature, 2005). Reproduzido de [12]	6
Figura 3: diagrama de Jablonski ilustrando os processos de absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência e geração de oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$). Adaptado de [85].	13
Figura 4: área de superfície ótima a_0 encontrada para o ponto de mínima energia total, resultado do balanço entre a energia atrativa (interação hidrofóbica entre as cadeias) e repulsiva (repulsão entre as cabeças polares). Adaptado de [87].....	15
Figura 5: diferentes possibilidades para o fator de estruturação $\frac{V}{a_0 l}$ e suas respectivas estruturas automontadas. Adaptado de [87]......	16
Figura 6: diferentes mecanismos para a formação de vesículas. Adaptado de [88].	17
Figura 7: princípio de funcionamento da técnica RICM e imagem de interferência gerada pela observação de uma GUV nas proximidades do substrato. Adaptado de [92].	18
Figura 8: (a) princípio de funcionamento de um microscópio de fluorescência. (b) sistema de <i>pinhole</i> utilizado na microscopia confocal. A definição de uma imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente de regiões fora do plano focal (verde). Adaptado de [92].	20
Figura 9: estruturas moleculares dos materiais utilizados	22
Figura 10: (a) metodologia experimental aplicada na fabricação dos filmes <i>spray</i> -LbL; (b) fotografia do sistema experimental utilizado na fabricação dos filmes <i>spray</i> -LbL. O <i>zoom</i> mostra em detalhes o posicionamento dos aerógrafos em relação ao substrato.....	24
Figura 11: método utilizado para a eletroformação onde os fosfolipídios de interesse são espalhados em uma célula para a eletroformação (1V, 10Hz) de GUV.	32
Figura 12: célula de observação contendo três compartimentos para a observação das GUV.	33
Figura 13: variação da massa (QCM) depositada por bicamada para filmes <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG crescidos sob diferentes pressões (10, 20 e 30 psi).	36
Figura 14: variação da massa (QCM) depositada por bicamada para filmes <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG crescidos sob diferentes tempos de <i>spray</i> (2, 4 e 6 s).....	37
Figura 15: imagens de topografia AFM obtidas para filmes <i>spray</i> -LbL contendo 10 bicamadas de PAH/DPPG fabricados com (a) 2 s, (b) 4 s e (c) 6 s de tempo de <i>spray</i>	38
Figura 16: (a) variação de massa (QCM) para o crescimento de 20 bicamadas <i>spray</i> -LbL depositadas com e sem a etapa de lavagem entre as camadas de PAH e DPPG; (b) frequência relativa QCM em função do tempo para a deposição de 16 bicamadas <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG. A inserção mostra o <i>zoom</i> da frequência relativa para a primeira bicamada depositada.....	39

Figura 17: (a) espectros de UV-Vis para 12 bicamadas <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG. Dependência linear da (b) absorbância em 200 nm e (c) massa (medidas de QCM) em função do número de bicamadas depositadas para os filmes <i>dipping</i> e <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG....	40
Figura 18: espectro de FTIR para 12 bicamadas <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG depositadas sobre ZnSe nas regiões de (a) 600-4000 cm^{-1} e (b) abaixo de 1900 cm^{-1} . Os espectros FTIR dos filmes <i>casting</i> de PAH e DPPG são dados como referências.....	42
Figura 19: espectros FTIR para 17-camadas LB de (PAH+DPPG), 21 bicamadas <i>dipping</i> -LbL e 12 bicamadas <i>spray</i> -LbL.....	43
Figura 20: imagens de topografia AFM para 10 bicamadas <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG exibidas em (a) 2 e (b) 3 dimensões. (c) Perfil de uma vesícula de DPPG e (d) histograma com a distribuição de diâmetro (nm) de vesículas encontradas no filme <i>spray</i> -LbL.....	45
Figura 21: imagens topográficas de AFM mostrando o perfil ao longo de um degrau feito pela remoção de material com uma agulha nos filmes (a) <i>dipping</i> e (b) <i>spray</i> -LbL contendo 10 bicamadas cada.	47
Figura 22: arquitetura molecular para tetracamadas <i>dipping</i> -LbL estruturadas como (a) PAH/AgNP/DPPG/AM e (b) PAH/DPPG/AM/AgNP.	49
Figura 23: espectros Raman e SERS para o filme <i>spray</i> -LbL contendo 1 tetracamada de PAH/AgNP/DPPG/eosina. A inserção mostra o mapeamento Raman para uma área de 80 $\mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ coletando espectros com passo de 2 μm (total de 1681 espectros) e plotando a intensidade da banda em 1502 cm^{-1} . O espectro Raman foi selecionado de um ponto escuro e o espectro SERS de um ponto claro do mapeamento.	50
Figura 24: espectros UV-Vis para os filmes (a) <i>dipping</i> - e (b) <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG depositados até 12 bicamadas. Dependência aproximadamente linear da (c) absorbância em 200 nm e (d) massa (medidas de QCM) em função do número de bicamadas depositadas para os filmes <i>dipping</i> e <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG. A absorbância em (c) e massa em (d) referem-se ao material adsorvido em ambos os lados dos substratos para os filmes de <i>dipping</i> -LbL.....	53
Figura 25: frequência relativa QCM em função do tempo para a deposição de 7 bicamadas <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG. A inserção mostra o <i>zoom</i> da frequência relativa para as primeiras 2 bicamadas.....	54
Figura 26: (a) espectro FTIR para 28 bicamadas <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG depositadas em Ge. Os espectros FTIR para os filmes <i>casting</i> de DODAB e DPPG são dados como referências; (b) <i>zoom</i> da região abaixo de 1900 cm^{-1} exibida em (a); (c) espectros FTIR para 28 bicamadas dos filmes <i>dipping</i> - e <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG.	57
Figura 27: dados de QCM para o crescimento de filmes <i>spray</i> -LbL contendo bicamadas de (a) PAH(+)/DPPG(-), DODAB(+)/DPPG(-), PAH(+)/DPPC (zwitteriônico) e PAH(+)/DODAB(+). (b) Camadas de PAH, DODAB, DPPC e DPPG depositadas individualmente.	58
Figura 28: imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas de DODAB/DPPG depositadas via (a) <i>dipping</i> - e (b) <i>spray</i> -LbL. Perfis de vesículas traçados para os filmes (c) <i>dipping</i> - e (d) <i>spray</i> -LbL. Histogramas de distribuição de diâmetro (nm) de vesículas encontradas nos filmes (e) <i>dipping</i> - e (f) <i>spray</i> -LbL.	61
Figura 29: possíveis arquiteturas moleculares em filmes <i>dipping</i> - e <i>spray</i> -LbL de DODAB/DPPG. Filmes <i>dipping</i> -LbL: camadas estratificadas com DODAB e DPPG	

formando estruturas esféricas semelhantes. Filmes spray-LbL: camadas não-estratificadas com DODAB e DPPG formando esferóides. 61

Figura 30: (a) espectros Raman convencional e SERS coletados para filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo ambos a tetracamada DODAB/AgNP/DPPG/eritrosina. A inserção mostra o mapeamento Raman para uma área de $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ coletando espectros com passo de $2\ \mu\text{m}$ (total de 1681 espectros) e plotando a intensidade da banda em $1500\ \text{cm}^{-1}$. (b) Estruturas moleculares propostas para filmes *dipping*- e *spray*-LbL..... 63

Figura 31: arquitetura molecular para os filmes *dipping*- (a) e *spray*-LbL (b) de PAH/DPPG contendo o fosfolípido DPPG estruturado em vesículas multilamelares (MLV). Arquitetura molecular para (c) monocamadas LB de DPPG e multicamadas LB contendo (PAH+DPPG). 66

Figura 32: medidas de espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) coletadas para diferentes unidades sensoriais em água ultrapura antes e após a imersão em diferentes concentrações de solução de eosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L). 67

Figura 33: medidas de capacitância vs frequência para eletrodos interdigitados de Pt recobertos com filmes LB, *dipping* e *spray*-LbL imersos em água ultrapura. A inserção mostra um circuito elétrico equivalente que modela o sistema eletrodo/filme/dupla camada/eletrolito, onde C_g é a capacitância geométrica do eletrodo, C_d e G_d estão relacionados aos efeitos de dupla camada na interface eletrodo / eletrólito, G_t representa processos de transferência de carga, e C_b e G_b representa o filme que recobrem o eletrodo. 68

Figura 34: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de solução de eosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores destacadas. 69

Figura 35: (a) PCA plotado considerando os resultados de todas as unidades sensoriais. (b) *Loadings* para PC1 vs PC2..... 70

Figura 36: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) coletada para unidades sensoriais distintas imersas em água ultrapura e soluções de eritrosina em diferentes concentrações (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} mol/L)..... 71

Figura 37: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de solução de eritrosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores na inserção..... 72

Figura 38: PCA plotado para valores de capacidade coletados a 1kHz para (a) todas as unidades sensoriais e (b) excluindo a unidade sensorial formada pelo filme *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)₅. (c) *Loadings* de PC1 e PC2; (d) *zoom* da região circulada pela linha tracejada em (c)..... 74

Figura 39: (a) imagem óptica e (b) mapeamento Raman de área (sobreposta) coletado para a unidade sensorial composta pelo filme *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)₅ após a exposição a soluções de eritrosina. (c) Espectro Raman da eritrosina extraído da área mapeada mostrado em (b). Na parte inferior é dado um espectro Raman coletado para o pó da eritrosina. Todos os espectros foram obtidos usando a linha de laser em 633nm. 76

Figura 40: dados de QCM para (a) filme LbL contendo até 5 camadas de (PAH/PSS)₅/Tyr, lavado com água ultrapura após a imobilização de Tyr. Filmes LbL contendo 5 bicamadas de (b) (PAH/PSS)₅/Tyr e (c) (PAH/PSS)₅/PAH/Tyr, ambos lavados em solução tampão. 78

Figura 41: dados de QCM para filmes LbL contendo 5 bicamadas de (a) (PAH/DPPG) ₅ /PAH/Tyr e (b) (DODAB/DPPG) ₅ /DODAB/Tyr, ambos lavados em solução tampão após a imobilização de Tyr.	79
Figura 42: arquiteturas moleculares propostas para os filmes LbL contendo Tyr, sempre imobilizada sobre a última camada dos filmes.	80
Figura 43: curvas de capacitância (real) vs frequência obtidas para o eletrodo de Au e as unidades sensoriais formadas pelos filmes LbL de (PAH/PSS) ₅ /PAH/Tyr, (PAH/DPPG) ₅ /PAH/Tyr e (DODAB/DPPG) ₅ /DODAB/Tyr, imersos em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L) e em solução tampão. Os experimentos foram realizados partindo sempre da menor para a maior concentração.	81
Figura 44: projeção multidimensional IDMAP agrupando os resultados por diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L), considerando os dados medidos com todas as unidades sensoriais.	82
Figura 45: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores na inserção.	83
Figura 46: capacitância vs frequência para as unidades sensoriais (DODAB/DPPG) ₅ /DODAB/Tyr e (DODAB/DPPG) ₅ /DODAB imersas em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} mol/L), além da solução tampão.	84
Figura 47: projeção multidimensional IDMAP considerando as unidades de detecção (DODAB / DPPG) ₅ /DODAB/Tyr e (DODAB / DPPG) ₅ /DODAB.	84
Figura 48: projeção multidimensional IDMAP para as medidas obtidas nos conjuntos de dados 1 e 2.	85
Figura 49: isothermas π -A de (a) DPPG e (b) DPPC em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L. (c) Estruturas moleculares dos fosfolípidios insaturados (DOPC e DOPG), saturados (DPPC e DPPG) e derivado xantênico (eritrosina). 89	
Figura 50: isothermas π -A de (a) DOPG e (b) DOPC em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L.	91
Figura 51: (a) imagens de contraste de fase e (b) fluorescência de GUV de DOPC contendo 50 μ mol/L de eritrosina em seu meio externo, em função do tempo de irradiação.	94
Figura 52: evolução do perímetro relativo e do contraste entre os meios internos e externos da vesícula com relação ao tempo de irradiação. A inserção mostra o <i>zoom</i> de uma imagem de contraste de fase e um perfil salientando a diferença de contraste (Δ) entre o meio interno e externo da vesícula.	95
Figura 53: representação esquemática da hidroperoxidação e aumento relativo da área molecular (δA) de um fosfolípido insaturado.	97
Figura 54: (a-c) representação esquemática do substrato modificado com estreptavidina, GUV biotiniladas e as três etapas do método bio-adesivo. (d) Imagem confocal projetada em 3-dimensões de uma vesícula biotinilada de DOPC (verde) aderida a um substrato modificado com estreptavidina (vermelho).	99
Figura 55: expansão da área superficial relativa (S/S_0-1) em função do raio reduzido (r/R_0) da região aderida. As regiões destacadas representam o aumento da área superficial para diferentes estágios discutidos na Figura 54a-c.	101

Figura 56: GUV biotinilada de DOPC aderida sobre a superfície modificada com estreptavidina, contendo 25 µmol/L de eritrosina no meio externo. (a) Microscopia de fluorescência e RCM, antes e depois da irradiação. (b) Evolução com o tempo (segundos - escala logarítmica) do aumento de área superficial relativo ($S_2/S_1 - 1$), considerando diferentes potências de irradiação (10, 2,5 e 0,31 W/cm ²). A inserção mostra a dependência linear entre a potência de irradiação e a variação do aumento de área superficial com relação ao tempo (velocidade, s ⁻¹).....	102
Figura 57: aumento de área superficial relativa ($S_2/S_1 - 1$) em função do tempo, alternando diferentes períodos de irradiação (10 W/cm ²), considerando GUV biotiniladas de DOPC contendo 25 µmol/L de eritrosina no meio externo.....	103
Figura 58: (a) histograma construído com a distribuição do aumento da área superficial das vesículas de DOPC e POPC após a hidroperoxidação. (b) Representação da área ocupada pelas moléculas hidropoxidadas de DOPC POPC.....	104
Figura 59: fases observadas para diferentes composições da mistura ternária DOPC/DPPC/colesterol considerando o resfriamento do sistema a partir de uma região de alta temperatura. A inserção mostra a estrutura molecular do colesterol. <i>Adaptado de [177]</i>	105
Figura 60: (a) diagrama de fase contendo uma aproximação da região de coexistência líquido-líquido a uma temperatura de 25 °C para o sistema de DOPC/DPPC/colesterol. (b) Imagens confocais para GUV contendo diferentes frações de DOPC/DPPC/colesterol: 20/50/30 (1), 40/30/30 (2), 30/40/30 (3) e 50/20/30 (4).	107
Figura 61: imagens confocais de duas GUV distintas para a mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contidas na região 1 da Figura 60a coletadas (a) imediatamente após o resfriamento e (b) após 10 minutos com o sistema a 25 °C.....	108
Figura 62: imagem confocal de uma GUV composta (a) pela combinação da fluorescência de ambos NBD (verde) e Liss Rod PE (vermelho). Mesma imagem composta somente pela fluorescência do (b) NBD e (c) Liss Rod PE.	109
Figura 63: imagens de fluorescência em função do tempo de irradiação para uma GUV composta pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contendo 50 µM de eritrosina em seu meio externo.	110
Figura 64: imagens de (a) contraste de fase e (b) confocal para duas GUV distintas compostas pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contendo 50 µmol/L de eritrosina em seu meio externo, em função do tempo de irradiação.	111
Figura 65: (a) fluorescência em função do tempo de irradiação para uma GUV composta pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (40/30/30) contendo 50 µmol/L de eritrosina em seu meio externo. (b) Representação do diagrama de fases composto pela mistura DOPC(OOH)/DPPC/colesterol(OOH). A inserção mostra imagens confocais coletadas antes e após 2 minutos de irradiação.	113
Figura 66: imagens de fluorescência em função do tempo de irradiação para GUV compostas pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (a) 50/20/30 (3) e (b) 70/0/30 (4) contendo 50 µmol/L de eritrosina no meio externo.....	115

Lista de tabelas

Tabela 1. Atribuições das principais bandas FTIR dos filmes <i>casting</i> de PAH e DPPG ¹²¹⁻¹²⁴	43
Tabela 2. Atribuição das principais bandas FTIR para os filmes <i>casting</i> de DODAB e DPPG.	56
Tabela 3. Massa média depositada por camadas individuais e bicamadas <i>spray</i> -LbL.....	59

Lista de siglas

AM	Azul de Metileno
AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag	Prata
Au	Ouro
AgNP	Nanopartículas de Prata
DODAB	Diocetadecildimetilamônio
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-glicerol
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPG	1,2-dipalmitoil glicerofosfato-rac glicerol
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FTIR	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
GUV	Vesículas Unilamelares Gigantes
Ge	Germânio
ITO	Óxido de estanho dopado com índio (ITO).
LB	Filmes Langmuir – Blodgett
LbL	Filmes <i>Layer-By-Layer</i>
LSPR	Ressonâncias Localizadas de Plasma de Superfície
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MLV	Vesículas Multilamelares
PAH	Poli(Hidrocloroeto de Alilamina)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PDT	Terapia Fotodinâmica
PM-IRRAS	Polarização Modulada - Espectroscopia de Absorção e Reflexão no Infravermelho
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
Pt	Platina
PSS	Poli-Estireno Sulfonato de Sódio
QCM	Micro-Balança de Cristal de Quartzo
SERS	Espalhamento Raman Amplificado em Superfície
SERRS	Espalhamento Raman Ressonante Amplificado em Superfície
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
RICM	<i>Reflection Interference Contrast Microscopy</i>
RMS	<i>Root Mean Square</i>
RRS	Espalhamento Raman Ressonante
TR	Taxa de Transferência
Tyr	Tirosinase
ZnSe	Seleneto de Zinco

Sumário

Apresentação.....	1
1. Introdução.....	5
1.1. Membrana celular	5
1.2. Vesículas unilamelares gigantes (GUV).....	7
1.3. Filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL): <i>dipping</i> vs <i>spray</i>	8
1.4. Derivados xantênicos.....	9
Objetivos gerais.....	10
Objetivos específicos	12
2. Conceitos teóricos.....	13
2.1. Processos de absorção, emissão de luz e geração de oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$).....	13
2.2. Automontagem de estruturas fosfolipídicas.....	15
2.3. Métodos ópticos.....	18
2.3.1. RICH (Reflection Interference Contrast Microscopy)	18
2.3.2. Microscopia de fluorescência e confocal	19
3. Materiais e métodos.....	21
3.1. Materiais	21
3.2. Fabricação dos filmes <i>layer-by-layer</i> (LbL)	22
3.2.1. Filmes <i>dipping</i> -LbL	22
3.2.2. Filmes <i>spray</i> -LbL.....	23
3.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB).....	25
3.3.1. Filmes de Langmuir	25
3.3.2. Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)	25
3.4. Análises sensoriais.....	26
3.4.1. Aquisição dos dados experimentais	26
3.4.2. Análise de dados com projeções multidimensionais.....	27
3.5. Técnicas de caracterização.....	30
3.6. Vesículas unilamelares gigantes (GUV).....	31
3.6.1. Eletroformação de GUV	31
3.6.2. Observação e irradiação	32
3.6.3. Funcionalização de superfície com estreptavidina.....	34
4. Crescimento e caracterização de filmes <i>spray</i>-LbL de PAH/DPPG.....	35
4.1. Otimização dos filmes <i>spray</i> -LbL	36
4.1.1. Pressão de <i>spray</i>	36
4.1.2. Tempo de <i>spray</i>	37
4.1.3. Lavagem entre as camadas.....	38
4.2. Comparação entre filmes <i>dipping</i> e <i>spray</i> -LbL de PAH/DPPG	39
4.2.1. Crescimento LbL monitorado via absorção no UV-Vis e QCM.....	39

4.2.2.	PAH-DPPG – interações moleculares via FTIR	41
4.2.3.	Morfologia via AFM e mapeamento SERS	45
5.	<i>Arquitetura molecular em filmes dipping- e spray-LbL contendo vesículas de DODAB/DPPG</i>	52
5.1.	Crescimento dos filmes <i>dipping-</i> e <i>spray-LbL</i> de DODAB/DPPG	53
5.1.1.	Monitoramento via absorção no UV-Vis e QCM	53
5.1.2.	DODAB-DPPG – interações moleculares via FTIR e QCM	54
5.2.	Arquitetura dos filmes <i>dipping</i> e <i>spray-LbL</i>	60
6.	<i>Aplicação sensorial</i>	64
6.1.	Detecção de eosina	65
6.2.	Detecção de eritrosina.....	71
6.3.	Detecção de catecol	77
6.3.1.	Imobilização otimizada de tirosinase (Tyr)	77
6.3.2.	Efeito da matriz para imobilização de enzimas em biossensores	80
7.	<i>Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana biológica.....</i>	87
7.1.	Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana: filmes de Langmuir.....	88
7.2.	Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana: Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV).....	93
7.2.1.	Foto-oxidação de GUV	94
7.2.2.	Foto-oxidação de GUV biotiniladas aderidas à superfície modificada com estreptavidina: método bio-adesivo	98
7.3.	Sistema ternário de fosfolipídios e colesterol	105
7.3.1.	Mistura ternária de DOPC/DPPC/colesterol.....	105
7.3.2.	Foto-oxidação das misturas DOPC/DPPC/colesterol	109
8.	<i>Conclusões</i>	116
	<i>Considerações finais</i>	119
	<i>Referências</i>	121

Apresentação

Esta tese de doutorado teve origem na conclusão do meu mestrado, realizado junto a FCT/UNESP, onde fosfolipídios passaram a ser utilizados como elementos transdutores em unidades sensoriais caracterizadas por espectroscopia de impedância. A inserção dos fosfolipídios teve como motivação principal a possibilidade de que a interação fosfolipídio/analito leve a um melhor desempenho das unidades sensoriais. Os fosfolipídios são largamente utilizados como sistemas miméticos de membranas biológicas¹ e podem apresentar afinidade por moléculas bioativas, tanto naturais (peptídeos, proteínas, DNA, carboidratos, etc.) como sintéticas (fármacos, corantes-marcadores, etc). O estudo da interação entre fármacos e biomembranas tem por finalidade avançar na compreensão do mecanismo de ação dos fármacos para melhorar sua eficácia e minimizar seus efeitos colaterais através do desenho racional de novos fármacos com atividade específica ou através da sua veiculação controlada.

No quesito inovador do tema, vale destacar alguns aspectos em que avançamos nesta área como resultado direto dos projetos de IC e Ms por mim desenvolvidos e que foram publicados em uma sequência de artigos que retratam a evolução dos trabalhos. Inicialmente, foi constatado o melhor desempenho das unidades sensoriais de fosfolipídios na detecção do fenotiazínico azul de metileno (AM) quando comparadas a outros materiais como ftalocianinas, perilenos e ácido esteárico.² Nesse trabalho os filmes de fosfolipídios (DPPG e DPPC) foram depositados na forma de monocamadas pela técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Na busca por filmes contendo multicamadas, foram fabricados filmes nanoestruturados contendo multicamadas dos fosfolipídios DPPC e DPPG utilizando a técnica *layer-by-layer* (LbL). Neste caso, os fosfolipídios foram depositados em camadas alternadas do polieletrólito polialilamina hidrocloreada (PAH), produzindo estruturas do tipo $[\text{PAH/DPPG}]_n$ e $[\text{PAH/DPPC}]_n$.³ Posteriormente, nanopartículas de prata (AgNP) foram incorporadas aos filmes LbL,⁴ viabilizando a utilização da técnica de espalhamento Raman amplificado em

superfície (SERS) em análises sensoriais envolvendo sistemas diluídos ($< 10^{-9}$ mol/L).⁴ De maneira complementar, filmes LB contendo multicamadas de DPPG foram produzidos a partir da dissolução de baixas concentrações de PAH na subfase aquosa, estratégia baseada nos filmes LbL.⁵

A importância do desenvolvimento de filmes finos contendo multicamadas de fosfolipídios, tanto LbL como LB, se dá pois a grande maioria dos fosfolipídios possibilita a fabricação de filmes LB contendo apenas mono ou bicamadas. Esta baixa concentração de material limita as técnicas de caracterização destes sistemas, gerando a necessidade de metodologias que permitam a fabricação de filmes finos contendo multicamadas. Nesse contexto, esta tese apresentará novas estratégias para a deposição de multicamadas de fosfolipídios, principalmente através da técnica LbL em suas duas abordagens experimentais: *dipping*⁶⁻⁷ e *spray-LbL*.⁸ O fluxograma na Figura 1 ilustra o panorama geral englobado por esta tese.

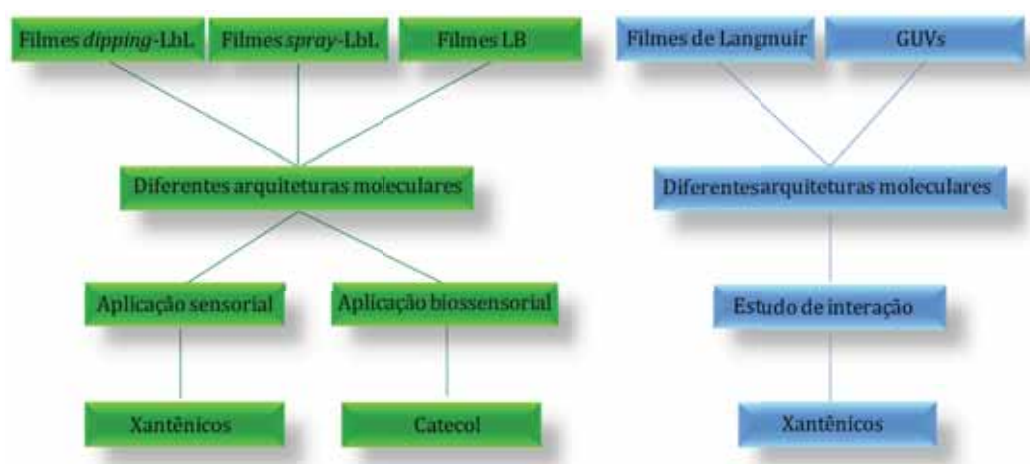


Figura 1: fluxograma apresentando a estruturação desta tese de doutorado.

As diferentes arquiteturas moleculares geradas pelas diferentes técnicas de fabricação dos filmes finos (filmes LB, *dipping*- e *spray-LbL*) foram testadas em dois sistemas de detecção: (i) aplicação sensorial visando à detecção dos xantênicos eosina e eritrosina em soluções aquosas diluídas ($\sim 10^{-9}$ mol/L); (ii) aplicação biossensorial visando à detecção do

composto fenólico catecol em soluções aquosas altamente diluídas ($\sim 10^{-12}$ mol/L). Em ambos os casos, mais que a capacidade de detecção dos diferentes analitos, foram investigados os efeitos das diferentes arquiteturas moleculares no desenvolvimento e otimização de sensores e biossensores.

Em uma segunda vertente do trabalho, filmes de Langmuir de fosfolipídios foram aplicados como modelos miméticos de membranas biológicas no estudo de interação com os derivados xantênicos. O estudo de interação foi complementado utilizando como sistema biomimético vesículas unilamelares gigantes (GUV), i.e., estruturas lipídicas com arquitetura molecular distinta dos filmes de Langmuir. A escolha dos corantes xantênicos como moléculas alvo de nosso estudo se deu porque, apesar de serem aplicadas como agentes farmacológicos e haver um número significativo de trabalhos nesta área, os estudos relacionados ao sensoriamento e interação membrana/xantênicos nestes sistemas ainda são pouco explorados.

Esta tese está estruturada em oito capítulos. O capítulo I apresenta uma introdução mostrando a motivação para o trabalho usando sistemas miméticos de membrana biológica. Os conceitos teóricos envolvidos na automontagem de estruturas lipídicas e técnicas microscópicas de caracterização são apresentados no capítulo II. O capítulo III apresenta os procedimentos experimentais. A discussão dos resultados é realizada nos capítulos IV, V, VI e VII. O capítulo IV aborda a imobilização de vesículas lipídicas de DPPG em camadas alternadas do polieletrólito PAH, através da técnica LbL via *dipping* e *spray*. Neste capítulo o enfoque maior é dado ao desenvolvimento e otimização de um sistema experimental para a deposição dos filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG. No capítulo V são avaliadas as diferentes arquiteturas moleculares obtidas por filmes *dipping*- e *spray*-LbL quando o polieletrólito PAH é substituído por vesículas lipídicas de DODAB em multicamadas de DODAB/DPPG. No capítulo VI os filmes obtidos em (IV e V) são aplicados em unidades sensoriais para a detecção dos derivados xantênicos através de medidas de espectroscopia de impedância.

Nesta seção ainda relatamos o efeito da imobilização da enzima tirosinase (Tyr) em filmes *dipping*-LbL com diferentes arquiteturas moleculares para a detecção de catecol. O capítulo VII apresenta o estudo da interação entre eritrosina e modelos de membranas biológica baseados em filmes de Langmuir e GUV. As conclusões são descritas no capítulo VIII, além de algumas considerações finais.

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Membrana celular

"Life in all its diversity became possible after nature had found the trick with the membrane".⁹
—Erich Sackmann

O que é membrana celular? *“A membrana celular, também denominada membrana plasmática, é uma camada muito fina que circunda a célula, envolve o citoplasma e separa a célula do seu ambiente circundante. Como componente básico de todas as células, membranas celulares são muito mais que simples fronteiras. São uma parte de funcionamento ativo das células vivas que regulam a passagem de moléculas para o meio intra e extracelular, mantêm gradientes de concentração relevantes e realizam uma série de atividades metabólicas e biossintéticas, tais como aderência e sinalização.”*

—Traduzido e adaptado de Becker *et al.*¹⁰

O primeiro modelo para a estrutura da membrana foi proposto por Singer e Nicholson (modelo S-N) em 1972,¹¹ chamado “mosaico-fluido”. Neste modelo, a membrana celular é constituída principalmente por uma bicamada lipídica (fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e esteróis, como o colesterol, por exemplo), nas quais as proteínas, responsáveis pela sua funcionalização, se inserem na bicamada covalentemente ou por interações intermoleculares. O avanço das pesquisas durante essas quatro décadas mostrou que o modelo S-N não pode ser aplicado para a interpretação das propriedades físico-químicas

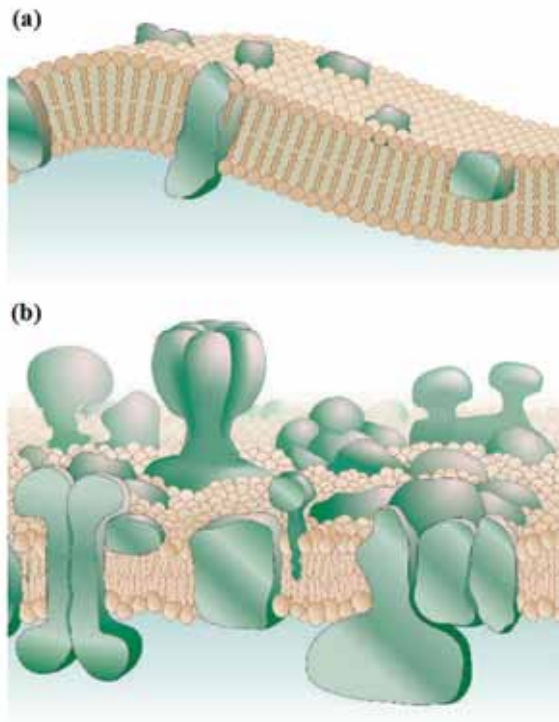


Figura 2: membrana celular representada pelos modelos (a) de "mosaico-fluido (S-N)" e b) versão atualizada baseada no conceito "*Membranes are More Mosaic than Fluid*" (Nature, 2005). Reproduzido de [12]

e biológicas numa membrana.¹³⁻²⁰ Há menor fluidez (difusão) e distribuição nos componentes de membrana, formando padrões específicos de proteínas no nível molecular e *clusters* em nível submicrométrico, dependendo do tipo de célula e de seu meio ambiente.²¹ A existência de domínios, mais tarde denominados "*rafts*",²⁰ também contradizem o modelo S-N. Portanto, a maioria das proteínas inseridas na membrana não se difundem irrestritamente por difusão lateral.

Em vez disso, as proteínas podem se difundir por mecanismos mais complexos, que levam em conta a heterogeneidade da

estrutura da membrana em escala nanométrica. Mediante essas evidências, Engelman *et al.*¹² apresentam uma versão atualizada do modelo S-N, sendo a membrana "*mais mosaico que fluido*". As Figuras 2a e 2b apresentam o modelo de mosaico-fluido (S-N) e a versão atualizada de Engelman.

De particular relevância é o estudo de fármacos e drogas cuja ação depende da interação com membranas celulares, seja destruindo-as ou por elas passando para agir no núcleo celular, ou interagindo com moléculas inseridas nas membranas que atuam na sinalização celular de fenômenos bioquímicos. Apesar da ação farmacológica de muitas drogas e fármacos ser conhecida, o mecanismo no nível molecular em geral não é entendido. Portanto, a dificuldade evidente em utilizar as membranas *in vivo* para investigações no nível

molecular tem despertado um grande interesse nos modelos biomiméticos de membranas, como é o caso das monocamadas de Langmuir,²²⁻²⁴ filmes LB,⁵ LbL³ e vesículas gigantes.²⁵

1.2. Vesículas unilamelares gigantes (GUV)

Vesículas gigantes são formadas basicamente por um entorno de apenas uma ou poucas bicamadas lipídicas, têm dimensões variando de 50 a 100 μm e têm se mostrado como um dos melhores modelos primários de células em termos de tamanho, composição de membrana e capacidade de encapsular moléculas biológicas.²⁶ Em 1986, Angelova e Dimitrov *et al.*²⁷ reportaram pela primeira vez a formação de vesículas unilamelares gigantes (GUV) pela aplicação de um campo elétrico contínuo (DC). Esse método, chamado de eletroformação, permitiu a produção de GUV de maneira controlada, sendo bastante aplicada em estudos de modelos de membranas.^{25, 28-29} Entretanto, experimentos posteriores³⁰⁻³² mostraram que são poucos os fosfolipídios que formam GUV pela aplicação de um campo elétrico DC, provavelmente porque o campo estático exerce apenas um efeito de ordenação sobre as moléculas de fosfolipídios. Essa limitação foi superada pela abordagem experimental reportada por Angelova *et al.*³³ em que um campo elétrico alternado (AC) é utilizado na formação de GUV. O campo AC, devido à mudança permanente de direção e magnitude da intensidade, além do efeito de ordenação também força as moléculas a se moverem, o que pode ajudar o empacotamento dos fosfolipídios em bicamadas e a formação de estruturas unilamelares. Esse método permite a formação de vesículas gigantes utilizando uma variedade de misturas de lipídios, possibilitando estudar diferentes propriedades de membranas.²⁸

A introdução de um campo elétrico AC como método de formação de GUV abriu caminho para a produção de vesículas gigantes a partir de misturas de fosfolipídios, que pode gerar uma formação de domínios com propensão natural para a separação de fases.³⁴ Essa última pode ser facilmente observada em misturas binárias de fosfolipídios, quando os componentes da mistura possuem diferentes temperaturas de transição de fase. Dessa forma,

quando a temperatura definida para o sistema está entre o intervalo da temperatura de transição de fase dos componentes, a separação de fases poderá ocorrer visto que um dos fosfolipídios estará em sua fase gel e o outro em sua fase líquido-cristalino.³⁵ Com base na termodinâmica da mistura lipídica, a capacidade de prever a formação de domínios lipídicos específicos é de particular interesse.³⁶ Porém, bicamadas formadas a partir de uma mistura binária de lipídios não são totalmente similares as membranas de células eucarióticas, que também apresentam em sua estrutura moléculas de colesterol e esfingomielina.³⁵

Recentemente, sistemas ternários lipídicos envolvendo fosfolipídios e colesterol foram estabelecidos como importantes sistemas miméticos simulando de maneira aproximada as propriedades interfaciais da biomembrana.³⁷ A origem dessa fenomenologia encontra-se em um complexo comportamento de fase observado pela adição de colesterol em uma mistura fosfolipídica. Devido à presença de fosfolipídios insaturados e da grande quantidade de colesterol, ao invés das fases gel ou líquido-cristalina, são observadas as fases líquido-ordenada e líquido-desordenada.²⁰ Esses domínios lipídicos têm sido amplamente estudados em modelos de membrana devido seu potencial para vários mecanismos celulares, incluindo transdução de sinal, transporte celular e fusão de membrana.^{34, 38-39} Além disso, o sistema ternário de lipídios e colesterol pode ser aplicado em estudos de interação com moléculas biologicamente ativas, uma vez que o equilíbrio desse sistema pode ser alterado em função dessas interações.⁴⁰⁻⁴²

1.3. Filmes *layer-by-layer* (LbL): *dipping* vs *spray*

O método de deposição de camadas alternadas foi inicialmente proposto por Iler⁴³ em 1966 para partículas coloidais de cargas opostas. Duas décadas mais tarde, Netzer e Sagiv⁴⁴ propuseram um método para a deposição de multicamadas baseado em auto-associação e auto-organização através de interações químicas, geralmente ligações covalentes, entre as camadas depositadas. No início de 1990, Decher *et al.*⁶⁻⁷ reportaram a deposição de

multicamadas através do processo de auto-montagem com adsorção alternada de polieletrólitos catiônicos e aniônicos em superfícies carregadas, o que mais tarde foi estendido por Ferreira *et al.*⁴⁵ para políons conjugados e por Cheung *et al.*⁴⁶ para polímeros condutores. Essa técnica foi denominada *layer-by-layer* (LbL) e vem sendo aplicada para diferentes tipos de sistemas e materiais.^{4, 47-49} No entanto, esta metodologia apresenta limitações práticas, principalmente relacionadas a longos períodos de tempo para a completa adsorção das camadas e a pequenas áreas de recobrimento. Estas limitações foram superadas em 2000 por Schlenoff *et al.*⁸, com uma abordagem não convencional em que as soluções são alternadamente depositadas via *spray* sobre um substrato, ao invés de imergir o substrato nas soluções, formando os chamados filmes *spray*-LbL. Em 2005 Izquierdo *et al.*⁵⁰ reportaram um estudo mais detalhado sobre a fabricação de filmes contendo multicamadas de polieletrólitos comparando ambas as abordagens, *dipping* e *spray*-LbL. Tornou-se claro que o método *spray* é tão geral como o *dipping*-LbL, porém muito mais rápido (um fator de até 500 vezes mais rápido foi relatado⁵⁰⁻⁵¹) e aplicável no recobrimento de superfícies maiores, ampliando a possibilidade de aplicações. Hoje em dia, o método *spray*-LbL começa a ser utilizado na fabricação de filmes finos de diferentes classes de materiais, tais como inorgânicos,⁵² coloides e polímeros condutores,⁵³⁻⁵⁵ nanotubos de carbono⁵⁶⁻⁵⁷ e grafeno,⁵⁸ considerando aplicações distintas. Durante este período, uma evolução do sistema experimental foi observada^{8, 50} e sistemas totalmente automatizados já são produzidos, permitindo um melhor controle do crescimento dos filmes.⁵⁹⁻⁶⁰

1.4. Derivados xantênicos

Os derivados xantênicos são uma das mais utilizadas classes de fluoróforos orgânicos aplicadas como marcadores⁶¹⁻⁶² e no sensoriamento de biomoléculas.⁶³⁻⁶⁴ Apresentam elevada seção de choque para absorção de radiação (visível), alto rendimento quântico de fluorescência,⁶⁵ elevado efeito SERS⁶⁶ e possibilidade de se ligar a biomoléculas.⁶⁷ Também

devido a sua elevada luminescência, alguns desses corantes são usados como padrões luminescentes e outros aplicados como indicadores fluorescentes em ambientes microscópicos, principalmente em estudos envolvendo enzimas,⁶⁸ hemoglobina⁶⁹ e membranas.⁷⁰ Alguns derivados xantênicos também são utilizados como fármacos no tratamento quimioterápico do câncer,⁷¹ terapia fotodinâmica⁷² e inibidores da tripanotona redutase.⁷³

Por outro lado, as indústrias alimentícia, cosmética e têxtil também utilizam os derivados xantênicos como pigmentos,⁷⁴ tendo como finalidade aumentar a atratividade e a aceitabilidade dos produtos frente ao consumidor. O uso de corantes tem o objetivo de compensar a perda de cor durante o processamento industrial e estocagem, uniformizar e dar cor a produtos originalmente incolores. Entretanto, do ponto de vista ambiental, a utilização de corantes gera resíduos com elevada carga de compostos orgânicos e com intensa coloração. Esses compostos não são biodegradados pelos sistemas de tratamento, sendo então lançados em efluentes receptores. Devido aos seus efeitos de acumulação, podem atingir concentrações superiores a dose letal de alguns organismos.⁷⁵⁻⁷⁶ Além disso, efluentes com coloração podem interferir fortemente nos processos fotossintéticos por causar a diminuição da transparência da água, impedindo a plena penetração da radiação solar, o que provoca graves alterações no ecossistema aquático.⁷⁷ Dessa forma, a detecção desses compostos para o controle de qualidade dos efluentes industriais mostra a importância do seu monitoramento para a garantia de não contaminação dos recursos hídricos.

Objetivos gerais

Esta tese de doutorado tem como objetivo geral a fabricação de filmes LbL (*dipping e spray*) e LB contendo fosfolipídios para aplicação no sensoriamento de corantes do tipo xantênicos. No caso do sensoriamento, o objetivo foi explorar a influência das diferentes arquiteturas moleculares dos filmes LbL e LB no desempenho de unidades sensoriais, as quais

foram caracterizadas via espectroscopia de impedância, sendo tais filmes os elementos transdutores de sinal. De modo geral, nos filmes LB os fosfolipídios organizam-se na forma de camadas estendidas enquanto nos filmes LbL eles são transferidos aos substrato na forma de vesículas.^{2-5, 78} Tais arquiteturas podem também propiciar (ou privilegiar) determinadas interações entre os xantênicos e os fosfolipídios quando estes são aplicados como sistemas miméticos de biomembranas.

Paralelamente, um estudo de caso foi realizado visando investigar a influência de diferentes arquiteturas moleculares de filmes LbL contendo fosfolipídios, como matrizes para a imobilização de enzimas na construção de biossensores. Sabe-se que biomoléculas (enzimas, por exemplo) devem ser imobilizadas sobre plataformas adequadas para que mantenham suas respectivas funções. Filmes de fosfolipídios poderiam desempenhar esta função de substrato, pois representam ambientes biologicamente compatíveis para a adsorção de biomoléculas. Daí o interesse em identificar e entender os mecanismos de sua interação com as biomoléculas imobilizadas. De fato, trabalhos recentes têm demonstrado um melhor desempenho de unidades sensoriais contendo fosfolipídios em experimentos de detecção de biomoléculas ativas.⁷⁹ A adequação dos fosfolipídios como matrizes para a imobilização de biomoléculas na construção de biossensores também tem proporcionado um melhor desempenho destes dispositivos, uma vez que as biomoléculas mantêm suas atividades biológicas.⁸⁰⁻⁸⁴

As interações membrana/xantênicos também foram objeto de estudo, durante o período sanduíche realizado no período de junho/2012 a junho/2013 sob orientação do professor Dr. Carlos M. Marques, especialista em sistemas miméticos de biomembranas no Instituto Charles Sadron, Universidade de Strasbourg, França. Nessa ocasião, o objetivo foi aplicar técnicas microscópicas para análise da interação entre fosfolipídios estruturados na forma de GUV e xantênicos. Filmes de Langmuir de fosfolipídios foram usados como sistema complementar para as análises de interações.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese contemplam as seguintes atividades:

- i) Fabricação de filmes contendo multicamadas LbL e LB de fosfolipídios, controlando o crescimento via espectroscopia de absorção no UV-Vis e micro-balança de cristal de quartzo (QCM).
- ii) Desenvolvimento e otimização de um sistema para a deposição dos mesmos materiais, porém via *spray*-LbL, que é uma técnica alternativa ao método *dipping*-LbL (convencional).
- iii) Investigar a morfologia dos filmes fabricados em escala micrométrica via microscopia óptica e espalhamento micro-Raman e em escala de nanômetros via microscopia de força atômica (AFM).
- iv) Verificar como as arquiteturas moleculares induzidas nos filmes LB, *dipping*- e *spray*-LbL de fosfolipídios influenciam no desempenho das unidades sensoriais via medidas de espectroscopia de impedância para soluções de derivados xantênicos com concentrações variando de 10^{-6} mol/L a 10^{-9} mol/L.
- v) Investigar a influência de diferentes arquiteturas moleculares de filmes *dipping*-LbL contendo fosfolipídios como matrizes para a imobilização de enzimas na construção de biossensores. A enzima escolhida foi a tirosinase (Tyr), conhecida por ser eficaz na detecção de compostos fenólicos, tais como catecol, clorofenol e fenol.
- vi) Investigar as interações entre eritrosina e filmes de Langmuir de fosfolipídios aniônicos e zwitteriônicos, pela adição de diferentes concentrações do analito a subfase aquosa
- vii) Investigar as interações entre eritrosina e GUV pela adição de diferentes concentrações do analito ao meio exterior que envolve as GUV. De particular interesse, será investigar os efeitos causados pela foto-ativação do xantênico, utilizando para as análises microscopias de contraste de fase, fluorescência e confocal.

Capítulo 2

2. Conceitos teóricos

2.1. Processos de absorção, emissão de luz e geração de oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$)

A Figura 3 apresenta o diagrama de Jablonski onde são visualizados os processos de absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema e fosforescência

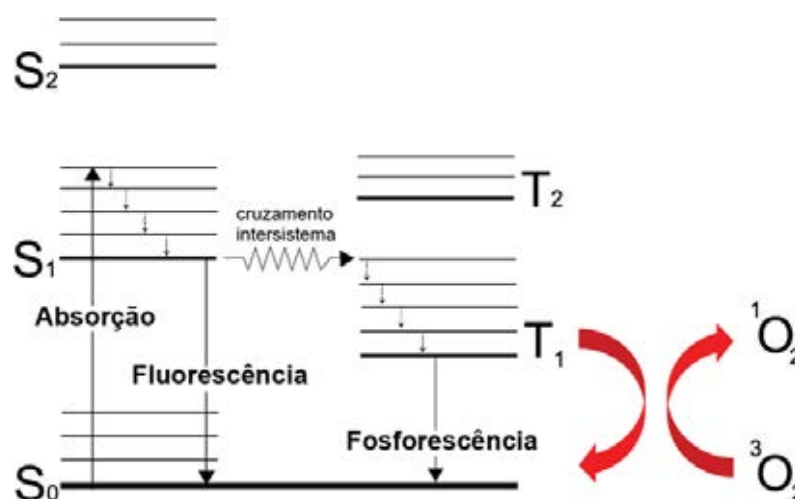


Figura 3: diagrama de Jablonski ilustrando os processos de absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência e geração de oxigênios singletos ($^1\text{O}_2$). Adaptado de [85].

A absorção eletrônica ocorre pela excitação da molécula com uma quantidade de energia equivalente a diferença entre seu estado excitado e fundamental. Uma vez que uma molécula está em um estado excitado, várias são as possibilidades para retornar ao seu estado fundamental, sendo elas:

- **Fluorescência:** em estados singletos excitados (S₁), o elétron no orbital excitado está desemparelhado (spin oposto) com relação ao segundo elétron no orbital do estado fundamental. Consequentemente, o retorno para o estado fundamental (S₀) é

permitido e ocorre por emissão de um fóton. As moléculas excitadas podem ficar em S_1 de algumas dezenas de picossegundos a algumas centenas de nanossegundos, dependendo da molécula e do meio.⁸⁵⁻⁸⁶

- **Conversão interna:** é uma transição não radiativa entre dois estados eletrônicos. Após a absorção de luz, há muitas vezes relaxamento vibracional para o mais baixo nível vibracional do estado eletrônico.⁸⁵⁻⁸⁶

- **Cruzamento intersistema:** é uma segunda possibilidade de relaxação não radiativa do estado excitado S_1 para o estado tripleto (T_1). Em princípio, o cruzamento entre os estados de multiplicidade diferentes é proibido, mas o acoplamento spin-órbita pode ser grande o suficiente para torná-lo possível.⁸⁵⁻⁸⁶

- **Fosforescência:** é a emissão de luz a partir do estado excitado T_1 para o estado fundamental S_0 e é deslocada para maiores comprimentos de onda (menor energia) em relação à fluorescência. A transição de T_1 para S_0 é proibida devido à paridade dos spins, e como resultado, as taxas de emissão são mais lentas. O tempo de vida de um estado tripleto varia de microssegundos a segundos, sendo mais longo do que em um estado singleto.⁸⁵⁻⁸⁶

- **Geração de oxigênio singleto (1O_2):** devido ao longo tempo de vida do estado T_1 , a molécula no estado excitado pode interagir com outras moléculas presentes no meio. Por exemplo, uma transferência de energia pode ocorrer entre T_1 e o oxigênio molecular. A molécula volta ao seu estado fundamental excitando o oxigênio tripleto (3O_2) para oxigênio singleto (1O_2), que é uma espécie muito reativa.⁸⁵⁻⁸⁶

2.2. Automontagem de estruturas fosfolipídicas

Interações hidrofóbicas induzem a atração entre as caudas alifáticas, de modo a diminuir a interface água/cadeias carbônicas. Por outro lado, devido à repulsão estérica e/ou eletrostática, as cabeças hidrofílicas tendem a se separar umas das outras, de modo a aumentar a sua área de contato com a água. Dessa forma, a micelização é o resultado dessas duas forças competitivas. A energia atrativa é proporcional a área a ocupada pelo grupo hidrofílico. A energia repulsiva é inversamente proporcional a área a . Israelachvili *et al.*⁸⁷ apresentam a energia total do sistema e demonstram a presença de um mínimo para uma área de superfície ótima a_0 , conforme exibido na Figura 4.

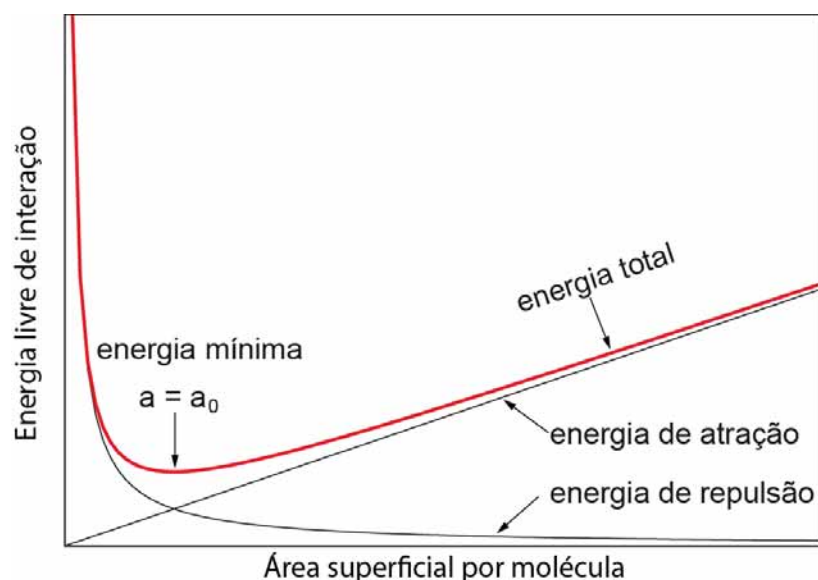


Figura 4: área de superfície ótima a_0 encontrada para o ponto de mínima energia total, resultado do balanço entre a energia atrativa (interação hidrofóbica entre as caudas) e repulsiva (repulsão entre as cabeças polares). Adaptado de [87].

Considerando um lipídio com uma área ótima a_0 e cadeias carbônicas de comprimento

l que ocupam um volume V , o valor de empacotamento (ou fator de estruturação) $\frac{V}{a_0 l}$ indicará

o tipo de estrutura automontada.⁸⁷ A Figura 5 apresenta as diferentes possibilidades para o fator de estruturação e as diferentes estruturas automontadas.

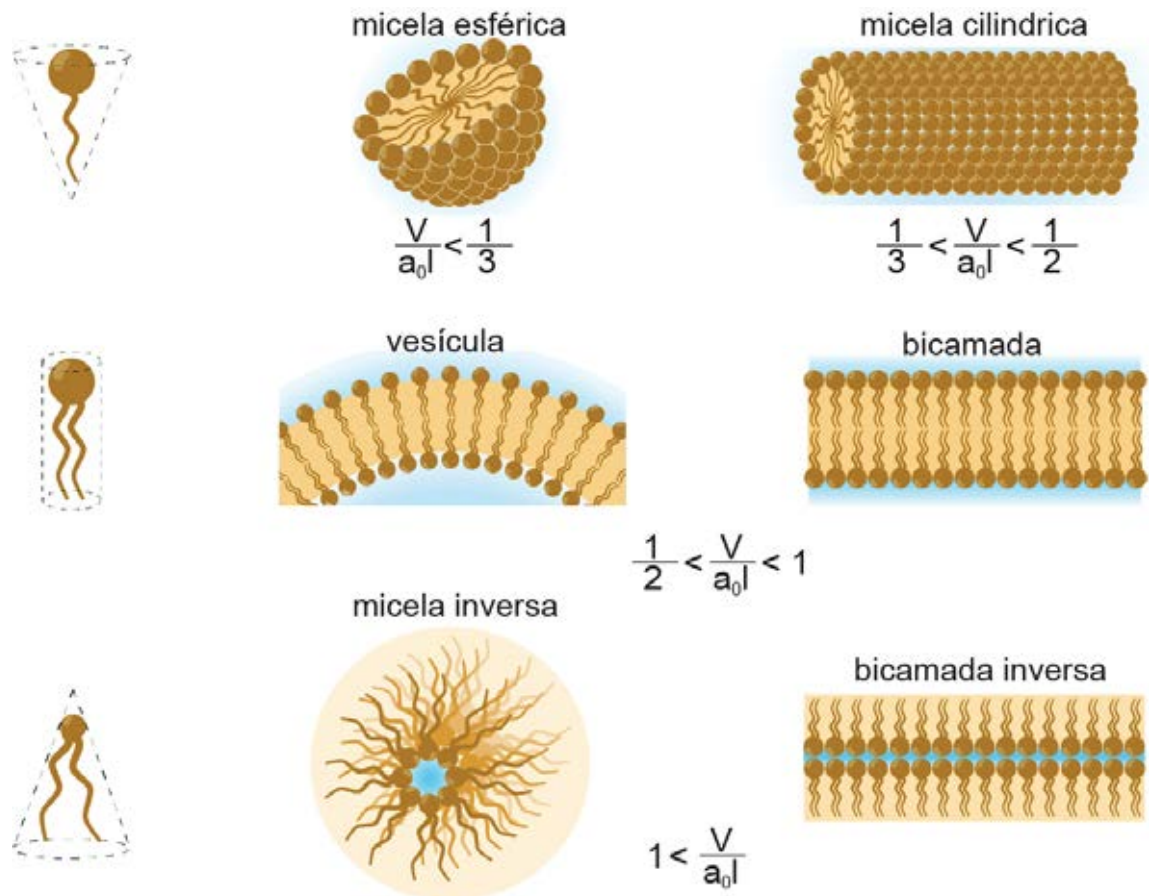


Figura 5: diferentes possibilidades para o fator de estruturação $\frac{V}{a_0l}$ e suas respectivas estruturas automontadas. *Adaptado de [87].*

Dependendo principalmente dos parâmetros geométricos, os fosfolípidios podem se automontar na forma de vesículas. As vesículas podem ser multilamelares ou unilamelares. Estas últimas ainda são divididas em três classes, de acordo com o tamanho:

- Vesículas Unilamelares Pequenas (*Small Unilamellar Vesicles - SUV*) ou lipossomos de 20 nm a 100 nm.
- Vesículas Unilamelares Grandes (*Large Unilamellar Vesicles - LUV*) de 100 nm a 500 nm.
- Vesículas Unilamelares Gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles - GUV*) de 500 nm a 100 μm .

Embora o mecanismo de formação de vesículas ainda não esteja completamente elucidado, tem sido observado que vesículas multilamelares (MLV) formam-se espontaneamente a partir da hidratação de filmes fosfolipídicos, ou pela simples solubilização dos fosfolipídios em água. Por outro lado, vesículas unilamelares são predominantemente formadas sob a ação de uma energia externa.⁸⁸ O mecanismo é representado na Figura 6. Geralmente, sonicação e extrusão são usadas para a formação de SUV enquanto GUV são obtidas por eletroformação. Este último método tem se mostrado eficaz no crescimento de GUV em soluções de baixa força iônica, e foi o método adotado neste trabalho.

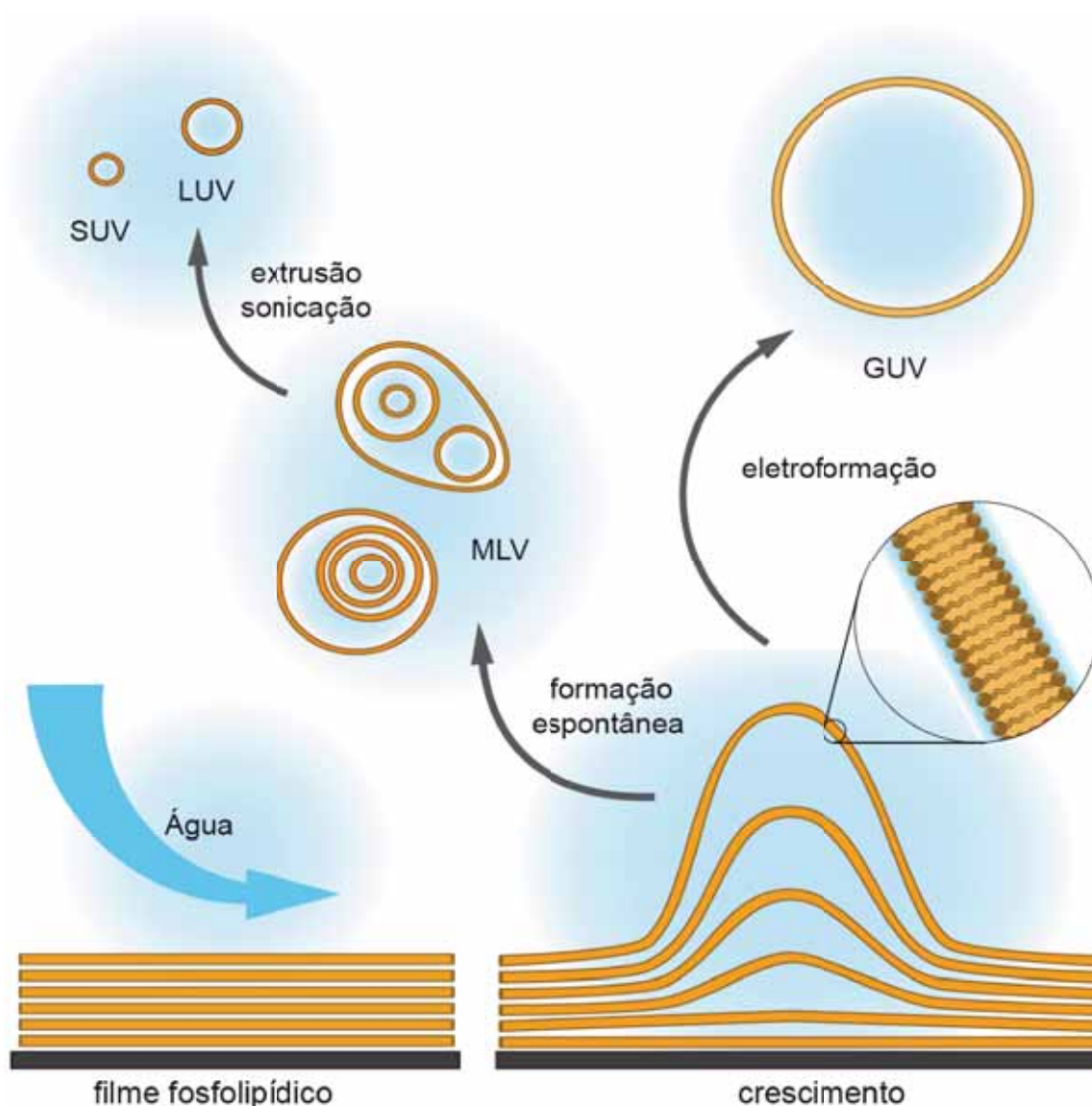


Figura 6: diferentes mecanismos para a formação de vesículas. *Adaptado de [88].*

As dimensões das SUV são pequenas para serem observadas por meios ópticos. As técnicas usuais utilizadas para a sua caracterização são: raios-X, dispersão de nêutrons, microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Kunding *et al.*⁸⁹ relataram uma nova metodologia baseada em fluorescência para determinar quantitativamente as dimensões de uma única SUV. Já as GUV apresentam dimensões maiores e podem ser observadas diretamente por meios ópticos, como por exemplo: microscopia de contraste de fase, fluorescência, RICM (*Reflection Interference Contrast Microscopy*) e confocal.

2.3. Métodos ópticos

2.3.1. RICM (*Reflection Interference Contrast Microscopy*)

A técnica RICM permite acompanhar as flutuações da membrana na proximidade do substrato,⁹⁰ revelando o nível de tensão das GUV e o seu grau de adesão à superfície. A técnica ainda permite a análise de fenômenos dinâmicos e pode fornecer medidas quantitativas, em escala nanométrica, da distância entre o substrato e a amostra.⁹⁰⁻⁹¹ Os fundamentos ópticos da técnica RICM são exibidos na Figura 7.

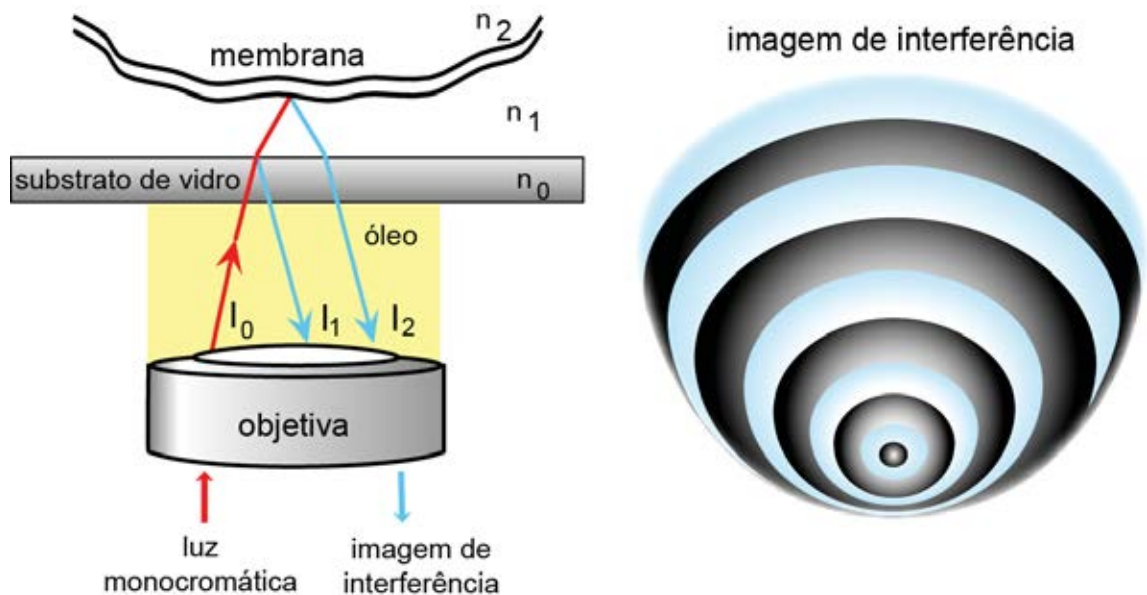


Figura 7: princípio de funcionamento da técnica RICM e imagem de interferência gerada pela observação de uma GUV nas proximidades do substrato. *Adaptado de [92].*

A luz monocromática incidente de intensidade I_0 é parcialmente refletida na interface vidro/líquido (I_1) e parcialmente transmitida para dentro da célula. A segunda reflexão parcial na interface líquido/amostra (I_2) também é coletada pela objetiva. Os raios I_1 e I_2 interferem uns com os outros e formam uma imagem de interferência na fronteira da amostra. A intensidade total da luz após a interferência pode ser expressa como:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[2kh(x) + \phi]$$

O número de onda k é dado por $k = \frac{2\pi n_1}{\lambda}$ sendo λ o comprimento de onda. ϕ é um deslocamento de fase que geralmente é igual a π . O termo $h(x)$ indica a distância vertical entre o objeto e o substrato em uma dada posição lateral x . Considerando a observação de uma vesícula gigante nas proximidades de um substrato de vidro, as intensidades I_1 e I_2 dependem do índice de refração do vidro ($n_0 = 1,49$), solução aquosa ($n_1 = 1,33$) e membrana fosfolipídica ($n_2 = 1,5$). Assim, para uma amostra homogênea, as variações dos tons de cinza com o tempo de observação, ou ao longo da posição lateral, correspondem a variações na distância entre o substrato e a amostra.

2.3.2. Microscopia de fluorescência e confocal

Atualmente, a iluminação e observação por fluorescência é uma das técnicas microscópicas mais aplicadas em análises de sistemas biológicos.⁹³⁻⁹⁴ O princípio de funcionamento baseia-se na marcação do material de interesse com uma molécula fluorescente. A amostra é iluminada com luz de um comprimento de onda específico para excitação do marcador. A fluorescência emitida pelo processo de relaxação do fluoróforo é a origem das imagens geradas. Na prática, a frequência da luz emitida pela fonte luminosa é selecionada por um filtro de "excitação" que corresponde à excitação espectral do fluoróforo. Essa luz é refletida por um espelho dicróico até a amostra. A luz emitida por fluorescência é coletada pela objetiva do microscópio. Em seguida, passa pelo mesmo espelho dicróico e

finalmente é separada da luz de excitação através do filtro de emissão. O princípio de funcionamento da microscopia de fluorescência é exibido na Figura 8a. A microscopia confocal também é baseada na observação por fluorescência. Comparada à microscopia de fluorescência convencional, a microscopia confocal combina iluminação pontual com a captação da luz emitida pela amostra através de um orifício de abertura (*pinhole*). Essa combinação permite eliminar a luz proveniente de regiões fora do plano focal, deixando a imagem com melhor definição, conforme exibido na Figura 8b. Outra vantagem sobre a microscopia de fluorescência é a capacidade que o confocal tem de realizar imagens em secções ópticas para amostras com maior espessura, possibilitando a posterior sobreposição destas imagens para a formação de uma imagem em 3D. Porém, como apenas um ponto na amostra é iluminado por vez, as imagens 2D ou 3D exigem a digitalização através de uma varredura pontual, o que faz com que a aquisição de imagens seja mais longa. Dessa forma, a microscopia confocal é limitada ao estudo de amostras imóveis ou que evoluem lentamente.

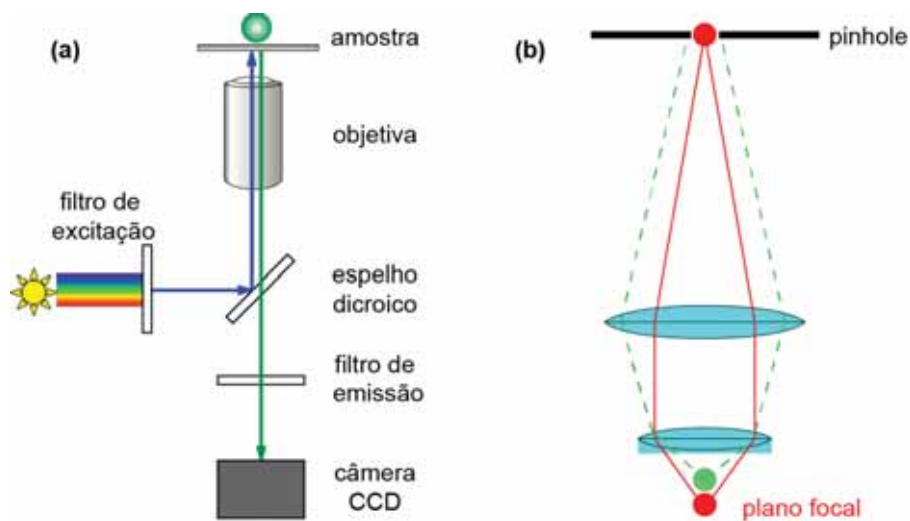


Figura 8: (a) princípio de funcionamento de um microscópio de fluorescência. (b) sistema de *pinhole* utilizado na microscopia confocal. A definição de uma imagem no plano focal (vermelho) é aumentada pela eliminação da luz proveniente de regiões fora do plano focal (verde). Adaptado de [92].

Capítulo 3

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

O fosfolípido aniônico dipalmitoil glicerofosfato-rac glicerol (DPPG) foi comprado da *Genzyme Pharmaceuticals*. Os demais fosfolípidos foram comprados da Avanti Polar Lipids Inc e usados sem purificação adicional.

- Fosfolípidos zwitteriônicos: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).
- Fosfolípido aniônico: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-glicerol (DOPG).
- Fosfolípido biotinilado: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N - [biotinil(polietileno glicol)-2000] (DSPE-PEG(2000) Biotina).
- Fosfolípidos fluorescentes: 1,2-dioleoil-sn-glycero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Liss Rod PE - λ_{ex} 560 nm; λ_{em} 583 nm) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3- fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD - λ_{ex} 460 nm; λ_{em} 535 nm).

O lípidio catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), o polieletrólito catiônico poli alilamina hidrocloreada (PAH), o polieletrólito aniônico poli estireno sulfonato de sódio (PSS), a enzima tirosinase (Tyr), os xantênicos eosina Y e eritrosina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O catecol foi adquirido da Panreac. Todos os produtos foram usados sem purificação adicional. As estruturas moleculares são apresentadas na Figura 9.

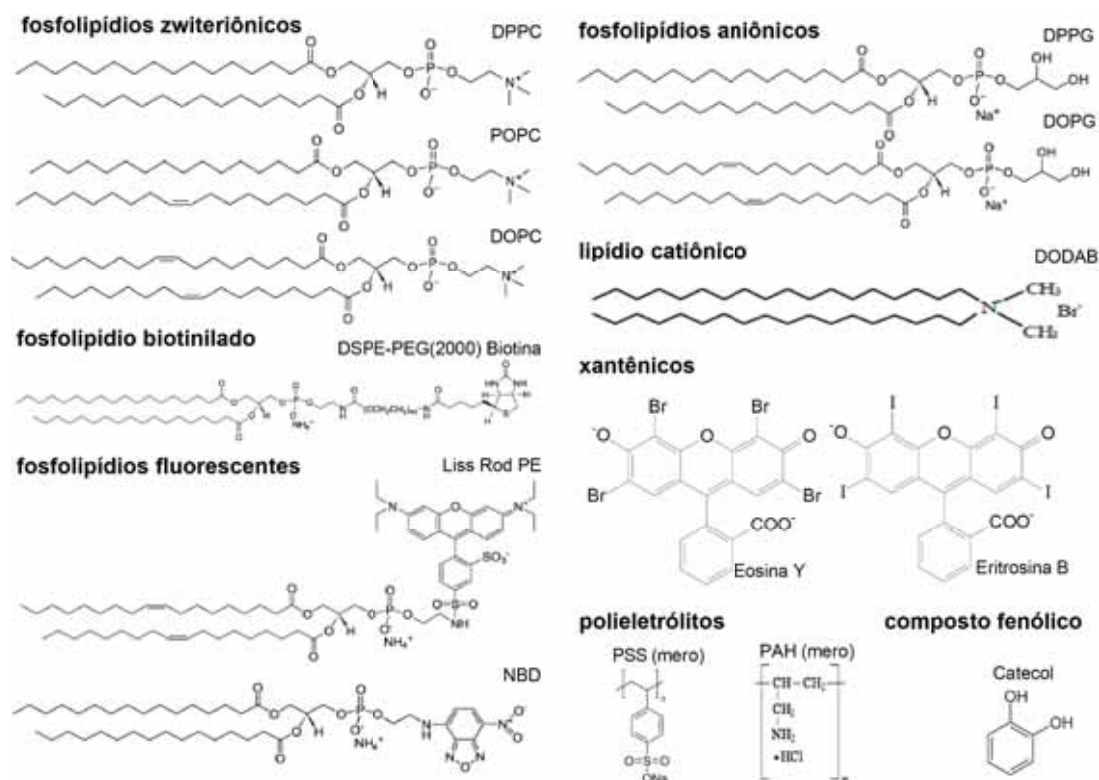


Figura 9: estruturas moleculares dos materiais utilizados

3.2. Fabricação dos filmes *layer-by-layer* (LbL)

3.2.1. Filmes *dipping*-LbL

Os filmes LbL foram crescidos utilizando soluções e dispersões preparadas com água ultrapura (18,2 MΩ.cm e pH 6,2), obtida a partir de um sistema Milli-Q, modelo *Simplicity*. A concentração de 0,74 mg/mL ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) das dispersões de DPPG e DPPC foram preparadas sem nenhum procedimento especial: o pó foi simplesmente adicionado à água ultrapura e a solução foi cuidadosamente agitada à temperatura ambiente (22°C). A mesma metodologia foi aplicada para preparar as soluções de PAH e PSS, ambas a 1,0 mg/mL. A concentração de 0,63 mg/mL ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) da dispersão de DODAB foi preparada seguindo a metodologia apresentada por Feitosa *et al.*⁹⁵: o pó de DODAB foi adicionado a água ultrapura e a mistura foi aquecida, sob agitação moderada, a 60 °C (acima da T_m do DODAB ≈ 45 °C) durante alguns minutos. Em seguida, a dispersão de DODAB foi resfriada à temperatura ambiente (22 °C). Em pH 6,2 as soluções dos fosfolípidios aniônicos estão

altamente ionizadas⁹⁶⁻⁹⁷ e, segundo o trabalho de Sainz *et al.*⁹⁸, o caráter zwitteriônico do fosfolípido DPPC é de aproximadamente 97,6% em pH 10, 99,9% em pH 7 e 86,3% em pH 4,5. Estas características são importantes porque as interações eletrostáticas podem desempenhar um papel relevante no crescimento dos filmes.

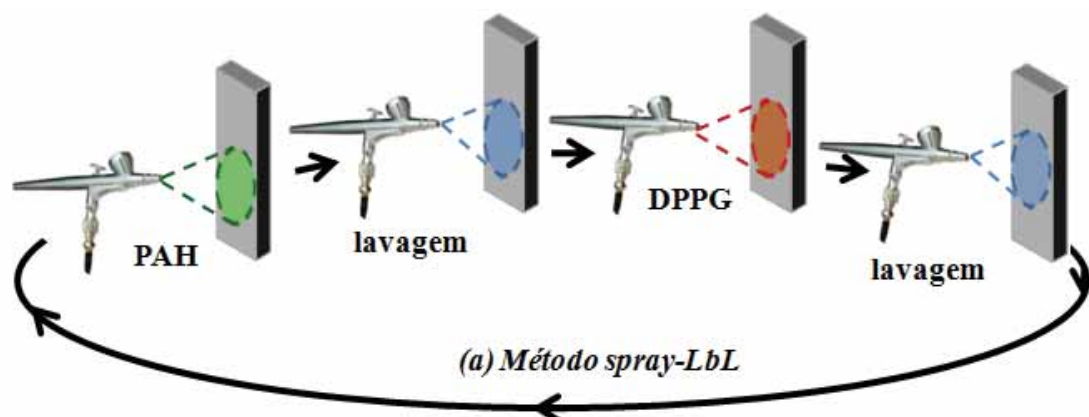
Os filmes *dipping*-LbL de PAH/DPPG foram fabricados imergindo o substrato de interesse em diferentes soluções de acordo com a seguinte sequência:³ solução de PAH por 3 minutos → água ultrapura para remover o excesso de PAH adsorvido por 1 minuto → dispersão de DPPG por 3 minutos → água ultrapura para remover o excesso de DPPG adsorvido por 1 minuto. Após isso, a primeira bicamada de PAH/DPPG é formada e com a repetição dessa sequência, multicamadas do filme *dipping*-LbL são obtidas. Os filmes LbL de DODAB/DPPG foram produzidos pelo mesmo procedimento, substituindo a solução de PAH pela dispersão de DODAB. A mesma metodologia foi aplicada para crescer filmes *dipping*-LbL de PAH/PSS, sendo o DODAB substituído por PAH e DPPG por PSS.

Considerando a aplicação em biossensores descrita na seção 6.3, a enzima Tyr foi sempre imobilizada sobre a última camada dos filmes *dipping*-LbL. A Tyr foi dissolvida em tampão fosfato (0,01 mol/L e pH = 7,1) numa concentração de 0,0175 mg/mL ($1,36 \times 10^{-7}$ mol/L), onde os filmes LbL foram deixados imersos durante 15 minutos para adsorção da Tyr.

3.2.2. Filmes *spray*-LbL

A fabricação de filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG⁹⁹ foi feita borrifando alternadamente a dispersão de DPPG e a solução de PAH utilizando a configuração experimental exibida na Figura 10a e 10b. Os filmes foram fabricados usando um sistema constituído por aerógrafos modelo BD-123A fabricados pela *LEEpro tools*, com agulha de 0,3 mm de diâmetro e copo para fluido de 7 mL. Um regulador da marca ARPREX foi utilizado para controlar a pressão de *spray* proveniente de um compressor de ar fabricado pela DRIMEL, modelo TD 2025 com reservatório de 24 L e pressão máxima de 120 psi. Para a deposição por *spray*, uma orientação

perpendicular entre o eixo do *spray* e o substrato foi montada a 30 cm de distância entre os mesmos. Os aerógrafos foram completados com soluções de PAH e dispersões de DPPG e borrifados com uma pressão constante de 10 psi por 2 s. Todos os parâmetros mencionados foram definidos após testes com diferentes combinações de pressão (10, 20 e 30 psi) e tempo de *spray* (2, 4 e 6 s). A configuração final usada permitiu a formação de uma fina camada na superfície, a qual adsorve em poucos segundos. O mesmo procedimento foi utilizado para o crescimento dos filmes *spray*-LbL de PAH/PSS e DODAB/DPPG.



(b) Sistema experimental

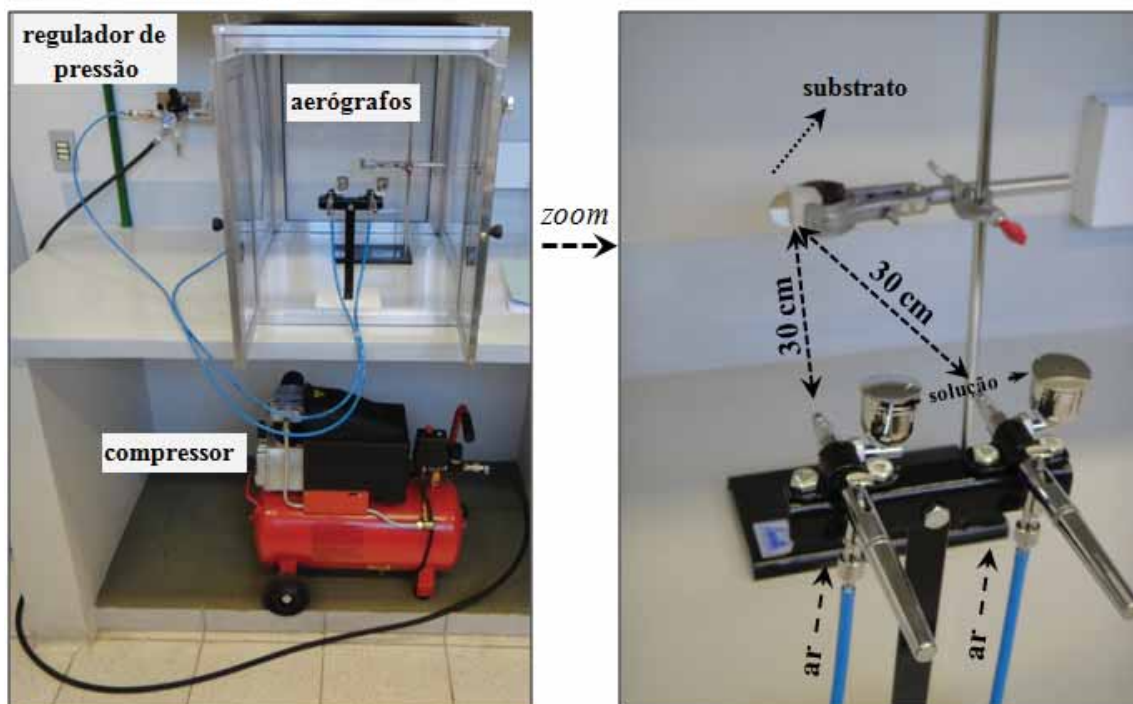


Figura 10: (a) metodologia experimental aplicada na fabricação dos filmes *spray*-LbL; (b) fotografia do sistema experimental utilizado na fabricação dos filmes *spray*-LbL. O *zoom* mostra em detalhes o posicionamento dos aerógrafos em relação ao substrato.

3.3. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

3.3.1. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram fabricados utilizando uma cuba de Langmuir KSV 2000 (50 x 315 mm / 40 mL), em subfase de água ultrapura, espalhando 15 μL da solução de DPPG, DOPG, DPPC e DOPC todas à mesma concentração de 10^{-3} mol/L dissolvidas em clorofórmio, com exceção do DPPG que foi dissolvido em metanol/clorofórmio (1/9 em volume). As monocamadas de Langmuir foram caracterizadas por isothermas π -A a 23°C usando o método Wilhelmy. A monocamada foi comprimida simetricamente a uma velocidade constante de 10 mm/min. Para os estudos de interação, diferentes concentrações (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L) de eritrosina foram adicionadas a subfase aquosa, sobre a qual foram espalhadas as soluções de fosfolípidios.

3.3.2. Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)

Os filmes LB foram fabricados utilizando uma cuba de Langmuir KSV 2000 (530 x 150 mm / 1300 mL). Filmes de Langmuir foram produzidos em uma subfase aquosa contendo 0,01 mg/mL de PAH, espalhando 150 μL da solução de DPPG a uma concentração de 0,74 mg/mL. As monocamadas de Langmuir foram caracterizadas por isothermas π -A a 23°C usando o método de Wilhelmy. A monocamada foi comprimida simetricamente a uma velocidade constante de 10 mm/min. Os filmes LB contendo multicamadas foram obtidos transferindo as monocamadas de Langmuir de DPPG da interface ar/água diretamente sobre o substrato. Estes filmes serão designados como filmes LB de (DPPG+PAH).⁵ A pressão de superfície foi mantida constante em 25 mN/m, a velocidade da barreira a 10 mm/min (compressão simétrica) e as velocidades de emersão do substrato foram de 0,5 a 3,0 mm/min. Durante a deposição, tal velocidade foi variada dentro destes intervalos para manter a taxa de transferência (TR) próxima de 1,0. Sob estas condições filmes LB do tipo Z (deposição da monocamada durante a retirada do substrato da subfase aquosa) foram obtidos.

3.4. Análises sensoriais

3.4.1. Aquisição dos dados experimentais

Medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas com um analisador de impedância Solartron 1260A. Espectros de impedância foram adquiridos na faixa de frequência de 1 Hz a 1 MHz, usando 50 mV de amplitude, com os dados analisados em termos da capacitância real. Os eletrodos interdigitados utilizados (Au ou Pt) são formados por 100 dígitos (50 pares) separados entre si por 10 μm , adquiridos comercialmente do Centro de Pesquisas Renato Archer (Cenpra). As dimensões de cada dígito são de 0,5 mm de comprimento, 10 μm de largura e 100 nm de altura. Antes da deposição dos filmes, vários eletrodos foram imersos em água ultrapura e submetidos a medidas de impedância a fim de verificar a reprodutibilidade do sinal, de modo a assegurar que as principais alterações observadas nas respostas elétricas sejam atribuídas à presença dos filmes depositados e não a diferenças de um eletrodo para outro. As unidades sensoriais foram deixadas imersas nas soluções por 20 minutos antes da aquisição dos dados, para a estabilização do sinal elétrico.¹⁰⁰ Três medidas consecutivas foram realizadas com as unidades sensoriais imersas nas soluções de interesse. A sequência das medidas começa com a amostra de referência (água ultrapura ou solução tampão) seguida pela amostra de mais baixa para a de mais alta concentração do analito de interesse. A cada conjunto de medidas envolvendo uma solução específica, as unidades sensoriais foram cuidadosamente lavadas para remoção de possíveis moléculas do analito adsorvidas nos filmes. Conjuntos distintos de unidades sensoriais foram fabricados para cada analito detectado conforme descrito a seguir.

(i) Detecção de eosina. Conjunto de sensores composto por 4 unidades sensoriais: um eletrodo interdigitado de Pt sem recobrimento e eletrodos interdigitados de Pt recobertos com 5 bicamadas *dipping*-LbL de (PAH/DPPG)₅, 5 bicamadas *spray*-LbL de (PAH/DPPG)₅ e 5 camadas LB de (PAH+DPPG)₅. O eletrodo de Pt sem recobrimento foi usado para monitorar qualquer alteração na resposta elétrica causada pela presença dos filmes finos. As

medidas foram realizadas em água ultrapura e em soluções aquosas de eosina a 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L.

(ii) Detecção de eritrosina. Conjunto de sensores composto por 6 unidades sensoriais: um eletrodo interdigitado de Pt sem recobrimento e eletrodos interdigitados de Pt recobertos com 5 bicamadas *dipping*-LbL de (PAH/PSS)₅, 5 bicamadas *dipping*- e *spray*-LbL de (PAH/DPPG)₅ e 5 bicamadas *dipping*- e *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)₅. As medidas foram realizadas em água ultrapura, e em soluções aquosas de eritrosina a 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} mol/L.

(iii) Detecção de Tirosinase (Tyr). Conjunto de biossensores composto por 4 unidades sensoriais: um eletrodo interdigitado de Au sem recobrimento e eletrodos interdigitados de Au recobertos com 5 bicamadas *dipping*-LbL de (PAH/PSS)₅/PAH/Tyr, (PAH/DPPG)₅/PAH/Tyr e (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr. Este conjunto de unidades sensoriais permite explorar o desempenho de biossensores considerando a imobilização da enzima Tyr sobre uma matriz de polieletrólitos ou lipídios. Num segundo conjunto de experimentos, foi comparado o desempenho de um sensor composto pelo filme LbL de (DODAB/DPPG)₅/DODAB e um biossensor composto pelo filme LbL de (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr, a fim de verificar a importância da enzima Tyr. As medidas foram realizadas em solução tampão, utilizada como referência, e em soluções de catecol a 10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} e 10^{-9} mol/L. Não foram realizados testes sistemáticos de estabilidade para as unidades sensoriais. Porém, em trabalhos semelhantes na literatura tem sido demonstrado que biossensores feitos com enzimas imobilizadas em filmes LbL são estáveis por 4-6 semanas.¹⁰¹⁻¹⁰²

3.4.2. Análise de dados com projeções multidimensionais

A grande quantidade de dados gerados em experimentos com sensores e biossensores trouxe a necessidade de utilizar métodos estatísticos e computacionais para o tratamento dos

dados. De fato, muitas questões relacionadas ao desenvolvimento de sensores e classificação de amostras semelhantes são agora tratadas utilizando o conceito de quimiometria,¹⁰³ ciência dedicada a extrair informação (e conhecimento) a partir de um amplo conjunto de dados. Dentro das áreas de quimiometria, talvez o método mais relevante para a detecção é a análise multivariada, que inclui Análise de Componentes Principais (PCA).¹⁰⁴ Essa é uma técnica de projeção, em que uma nova base ortogonal de dimensão inferior é obtida por meio de combinações lineares da variância dos dados. Em um PCA os eixos são nomeados como primeira (PC1), segunda (PC2) ou terceira (PC3) componentes principais, que representam a maior parte da variância nos dados. Neste trabalho, os dados de espectroscopia de impedância para as diversas unidades sensoriais foram tratados com PCA e com as técnicas de projeção multidimensional descritas a seguir.

Técnicas de projeção multidimensional mapeiam instâncias de dados de um espaço multidimensional em elementos gráficos em um espaço visual de forma que a proximidade entre esses elementos reflita em algum tipo de relacionamento entre as instâncias de dados, normalmente relacionamentos de similaridade.¹⁰⁵ Algumas técnicas de projeção multidimensionais são baseadas na definição da semelhança/dessemelhança por alguma função de distância no espaço dos dados de elevada dimensionalidade. Nestes métodos, dados do espaço original - no nosso caso, curvas de capacitância vs frequência - são mapeados em um diagrama 2D, numa tentativa de posicionar os dados de amostras similares próximos entre si. Formalmente, o conjunto de dados pode ser representado por $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ com $\delta(x_i, x_j)$ sendo a dissimilaridade (distância) entre duas instâncias de dados i e j . Os valores correspondentes de X para projeção dos pontos no plano são representados por $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$, determinado por meio de uma função injetora $f: X \rightarrow Y$ que minimiza $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(y_j))| \approx 0, \forall x_i, x_j \in X$,¹⁰⁶ onde $d(y_i, y_j)$ é a função de distância entre os pontos no plano

projetado. Em outras palavras, tenta-se preservar no espaço projetado a semelhança das instâncias de dados no espaço multidimensional original.

Estas técnicas de projeção podem ser classificadas em métodos lineares e não lineares, dependendo da função de mapeamento f .¹⁰⁷ Diferentes formulações da função de erro e as diferentes abordagens para sua minimização resultam em várias escolhas possíveis para a função de mapeamento f . A função de erro é uma medida da perda de informação no processo de projeção. Particularmente úteis para aplicações sensoriais são os métodos não lineares *Interactive Document Map (IDMAP)*¹⁰⁸ e o mapeamento Sammon.¹⁰⁹ Para o mapeamento Sammon, a função de erro usada na minimização é dada por:

$$S_{Sam} = \frac{1}{\sum_{i < j} \delta(x_i, x_j)} \sum \frac{(d(y_i, y_j) - \delta(x_i, x_j))^2}{\delta(x_i, x_j)}$$

Onde δ e d são as funções de distância definidas acima

Para o IDMAP, a função de erro usada na minimização é dada por:

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} - d(y_i, y_j)$$

onde $\delta_{\min}$ and $\delta_{\max}$ são as distâncias mínima e máxima entre as amostras.

Na tentativa de melhorar o desempenho de sensores e biossensores, Paulovich *et al.*¹¹⁰⁻¹¹¹ demonstraram que as técnicas lineares podem não conseguir capturar características dos dados que dependem de relações não lineares com as concentrações dos analitos. Dessa forma, os melhores resultados foram obtidos com técnicas não lineares, embora as razões precisas para esse achado ainda não foram determinadas. Para mais detalhes sobre discussões e aplicações de diferentes técnicas de projeções, veja Oliveira *et al.*¹¹²

3.5. Técnicas de caracterização

Para todas as técnicas de fabricação de filmes finos (LB, *dipping* e *spray*-LbL), o número de camadas ou bicamadas depositadas e o tipo de substrato foram escolhidos de acordo com a técnica de caracterização. Os filmes foram crescidos em substratos de quartzo para espectroscopia de absorção no UV-Vis, em cristais de quartzo (corte-AT) recobertos com placas de Au para medidas de QCM, em ZnSe para medidas de FTIR e em vidro termicamente tratado (600°C por 2 horas) para medidas de AFM. Todos os substratos foram limpos previamente com detergente neutro, sendo extensivamente lavados com água ultrapura seguida de acetona (5 minutos de sonicação) e clorofórmio (5 minutos de sonicação). Este procedimento é suficiente para ativar a superfície do substrato evitando o uso de qualquer outro tratamento mais drástico como a solução piranha (uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio).

O crescimento dos filmes LbL (*dipping* e *spray*) foi monitorado via absorção no UV-Vis utilizando um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, 190-1100 nm, e adsorção de massa utilizando uma QCM *Stanford Research Systems Inc.*, modelo QCM 200. Nas medidas de QCM, variações na frequência do cristal de quartzo foram monitoradas continuamente, sendo a variação em massa obtida a partir da equação de Sauerbrey:¹¹³ $\Delta F = (-2,3 \times 10^6 F_0^2 \Delta m)/A$, onde ΔF é a variação da frequência (em Hz), F_0 é a frequência do eletrodo sem recobrimento e A é a área do eletrodo (0,4 cm²). Os espectros Raman e as imagens ópticas foram obtidos utilizando um espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via equipado com microscópio ótico Leica, detector CCD, lasers em 514,5; 633 e 785 nm, redes de difração com 1200 e 1800 linhas/mm, polarizadores e base automática de suporte de amostra com movimentação em X, Y e Z para a obtenção de mapeamentos Raman (obtenção de espectros ponto a ponto com resolução espacial de cerca de 1 µm²). Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente utilizando uma lente objetiva de 50x (NA de 0,75), que gera áreas de

espalhamentos de $1 \mu\text{m}^2$. A aquisição e tratamento dos dados foram feitos no programa *WIRE*. Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker, modelo Vector 22.

As imagens de AFM exibidas pelas Figuras 15 e 20 foram obtidas através de um microscópio Digital Instrument modelo Nanoscope IV. Todas as demais foram adquiridas em um microscópio Nanosurf, modelo easyScan 2. As medidas foram realizadas com uma ponta de nitreto de silício no modo *tapping*.

3.6. Vesículas unilamelares gigantes (GUV)

3.6.1. Eletroformação de GUV

As GUV foram crescidas através do método de eletroformação, cuja metodologia básica é ilustrada na Figura 11. Soluções estoques foram preparadas dissolvendo os fosfolipídios em clorofórmio com concentrações de 10^{-3} mol/L. Em seguida essas soluções foram espalhadas em um substrato de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio (ITO) e secadas a vácuo por 20 min. Uma segunda placa de vidro idêntica foi usada para cobrir uma câmara de incubação delimitada por um anel de Sigillum wax (Vitrex, Copenhagen, Dinamarca), ou espaçador de teflon, e preenchido com uma solução de sacarose a 0,2 mol/L preparada em água ultrapura (Milli-Q). Finalmente uma tensão AC de 1,0 V a uma frequência fixa de 10 Hz foi aplicada através da câmara por no mínimo 2h. Vale ressaltar que a técnica de eletroformação deve ser aplicada aos fosfolipídios em sua fase líquida. No caso do DPPC, a fase líquida é obtida para temperaturas superiores a 41°C de modo que as GUV foram crescidas em uma estufa a 50°C . O mesmo procedimento é aplicado para formação de GUV a partir das misturas ternárias de fosfolipídios e colesterol. Para o crescimento de GUV biotiniladas, diferentes razões molares de DSPE-PEG(2000) biotina foram adicionadas às soluções dos fosfolipídios zwitteriônicos (DPPC, POPC e DOPC). As imagens de fluorescência foram obtidas pela adição de 0,5 mol% dos fosfolipídios fluorescentes.

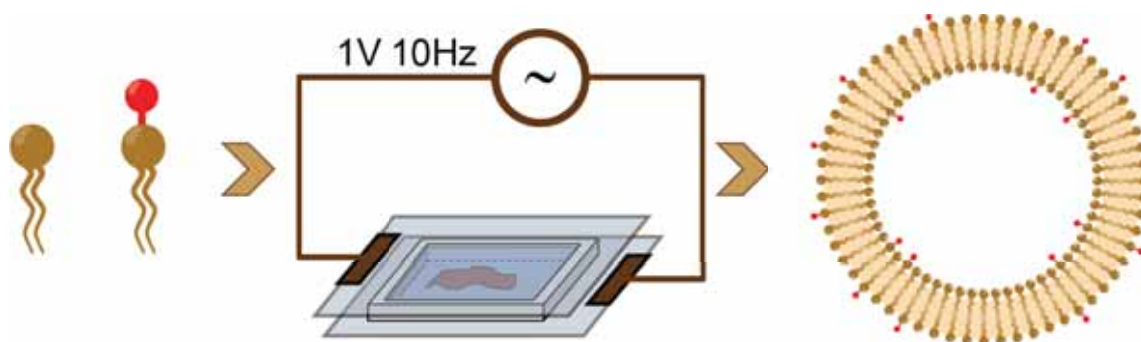


Figura 11: método utilizado para a eletroformação onde os fosfolipídios de interesse são espalhados em uma célula para a eletroformação (1V, 10Hz) de GUV.

As vesículas foram diluídas (6 vezes) em solução de glicose a 0,2 mol/L. As osmolaridades das soluções de sacarose e glicose foram cuidadosamente medidas com um osmômetro (*cryoscopic osmometer Osmomat 030*) a fim de evitar os efeitos de pressão osmótica. A pequena diferença entre os valores de densidade e índice de refração entre a sacarose e a glicose é suficiente para dirigir as vesículas para a superfície inferior da célula de observação e permitir um melhor contraste por microscopia de contraste de fase. Para as vesículas biotinizadas, o mesmo procedimento foi adotado, substituindo a solução de glicose por solução tampão fosfato-salino (PBS) a 0,2 mol/L.

3.6.2. Observação e irradiação

Inicialmente as vesículas foram transferidas para uma célula de observação formada por um espaçador de borracha (2,0 mm de espessura) previamente selado sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, diferentes concentrações de eritrosina (15 – 50 $\mu\text{mol/L}$) foram adicionadas às vesículas, a partir de uma solução estoque a 10^{-3} mol/L. A câmara de observação foi então selada com uma segunda lâmina de vidro para reduzir a um nível mínimo os efeitos de convecção. Para análise de adesão das vesículas biotinizadas, a lâmina inferior da câmara foi substituída pela lâmina modificada com estreptavidina, descrita no item 3.6.3. A Figura 12 mostra a fotografia de uma célula de observação contendo três compartimentos para a adição de diferentes amostras.



Figura 12: célula de observação contendo três compartimentos para a observação das GUV.

A irradiação e a observação das GUV foram realizadas sob um microscópio invertido, TE200 (Nikon, Japão), equipado com objetivas de 40×, 60× e 100× (imersão em óleo). Imagens confocais foram adquiridas utilizando um microscópio invertido, modelo TE2000, (Nikon, Japão), equipado com linhas de laser em 488, 514 e 542 nm. Imagens 3-dimensionais foram projetadas a partir de imagens confocais coletadas em diferentes planos focais, com resolução de até 0,1 μm entre um plano e outro. Todas as imagens foram coletadas com uma câmera digital *Diagnostic Instruments NDIAG 1800* e analisadas utilizando um programa desenvolvido pelo próprio grupo. Foram utilizados os modos de RICM,⁹⁰ contraste de fase e fluorescência.

O modo de observação RICM funciona com luz monocromática, selecionada por um filtro (*narrow-band*) a partir de uma lâmpada de mercúrio de 100 W. Dois filtros foram utilizados: um azul e um verde (Melles Griot - largura de banda de 10 nm) com máximos de emissão em 436 e 543 nm, respectivamente. O filtro azul possibilita a observação RICM sem perturbação da vesícula, uma vez que a absorção eletrônica da eritrosina em 436 nm é muito baixa.¹¹⁴ A radiação em 543 nm está em ressonância com a absorção eletrônica da eritrosina. Dessa forma, o filtro verde foi utilizado para a observação RICM da membrana, durante a foto-ativação da eritrosina. A densidade total de energia para o comprimento de onda 543 nm está em torno de 10 W/cm². A mesma radiação em 543 nm foi utilizada para a observação da membrana durante a foto-ativação da eritrosina nos modos de contraste de fase e fluorescência.

3.6.3. Funcionalização de superfície com estreptavidina

É conhecido que a estreptavidina apresenta uma forte afinidade de ligação para a biotina.¹¹⁵ Nesta seção descrevemos como preparar superfícies funcionalizadas com estreptavidina para futura adesão de GUV biotiniladas. A superfície funcionalizada é composta de três camadas: silano, glutaraldeído e estreptavidina. Os detalhes envolvidos no preparo de cada etapa são descritos a seguir:

- Limpeza das lâminas de vidro: os substratos foram previamente imersos em solução piranha (50% de H_2SO_4 e 50 % de H_2O_2) por 30 min. Em seguida as lâminas foram lavadas com água ultrapura em abundância. As lâminas foram então imersas, sucessivamente, em etanol para remover os vestígios de água remanescentes.

- Silanização: um volume 2 mL de 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES, 98%, Fluka) destilado foi adicionado a 100 mL de etanol absoluto (99,8%, Sigma-Aldrich) sob agitação. As lâminas foram imersas na solução de APTES por 5 minutos, e então lavadas em etanol para a remoção do excesso de APTES. A camada de silano depositada é estabilizada a 110 °C durante 15 minutos. A estrutura das monocamadas depende fortemente das condições de reação, tais como a natureza e qualidade do solvente, temperatura e tempo de reação.¹¹⁶⁻¹¹⁷

- Glutaraldeído: a solução de glutaraldeído (4%, Polysciences) foi depositada sobre as lâminas silanizadas e incubada durante 1h para a ativação das superfícies com grupos aldeídos. As amostras foram então imersas em água ultrapura para a remoção do excesso de glutaraldeído depositado e secas com nitrogênio.

- Estreptavidina: soluções de estreptavidina (Sigma-Aldrich) a 0,05 mg/mL preparadas em solução tampão fosfato-salino (PBS) foram depositadas sobre as lâminas e incubadas durante 1h. As amostras foram então lavadas com PBS, evitando sempre secar a amostra durante o procedimento. Para as imagens de fluorescência da camada de estreptavidina, 10 mol% de neutravidina modificada com rodamina (Neutravidina ®-tetrametilrodamina conjugada - λ_{ex} 543 nm; λ_{em} 578 nm - Sigma-Aldrich) foram adicionados às soluções de estreptavidina.

Capítulo 4

4. *Crescimento e caracterização de filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG*

Apesar do relativo avanço no desenvolvimento da técnica de deposição de filmes LbL via *spray*, estudos envolvendo a imobilização de moléculas biológicas, ainda são pouco explorados. Por exemplo, a imobilização de vesículas lipídicas é uma tarefa difícil, pois as vesículas podem colapsar devido à pressão de *spray*. Michel *et al.*¹¹⁸ demonstraram que vesículas dos fosfolipídios palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC) e palmitoil oleoil fosfatidilglicerol (POPG), quando enrijecidas com colesterol e estabilizadas com poli-(D-lisina) (PDL), matem sua forma após a deposição via *spray*-LbL. As vesículas foram depositadas por *spray* formando duas camadas distintas separadas por várias bicamadas de polieletrólitos, para melhorar a estabilidade das vesículas. Nesse capítulo, um passo a frente é dado pela possibilidade de crescimento de filmes *spray*-LbL contendo camadas alternadas do polieletrólito PAH e vesículas do fosfolipídio DPPG. Os principais objetivos foram: (i) a otimização das condições de crescimento dos filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG, o que inclui o desenvolvimento do próprio aparato experimental já que o mesmo ainda não é disponível comercialmente e (ii) a comparação entre os filmes *dipping*- e *spray*-LbL em termos das arquiteturas moleculares (morfologia da superfície, rugosidade, espessura e estruturação das vesículas de DPPG).

4.1. Otimização dos filmes *spray*-LbL

4.1.1. Pressão de *spray*

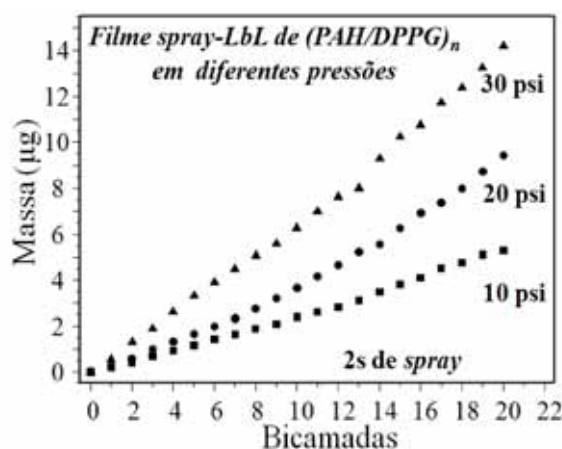


Figura 13: variação da massa (QCM) depositada por bicamada para filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG crescidos sob diferentes pressões (10, 20 e 30 psi).

A pressão e o tempo de *spray* foram primeiramente otimizados para possibilitar um crescimento controlado dos filmes finos. A influência da pressão foi analisada aplicando 30, 20 e 10 psi na deposição dos filmes *spray*-LbL de (PAH/DPPG)_n, mantendo constante o tempo de *spray* por 2 s. O crescimento dos filmes *spray*-LbL de (PAH/DPPG)_n foi monitorado pela

técnica de QCM e a massa depositada por bicamada é exibida na Figura 13. Os filmes foram crescidos em triplicatas e os resultados mostraram-se reprodutíveis. Um crescimento aproximadamente linear de massa foi medido em função das bicamadas depositadas, sugerindo que quantidades semelhantes de material são depositadas a cada etapa, independentemente da pressão aplicada. Além disso, aumentando a pressão, a massa média depositada por bicamada também aumenta, o que está de acordo com os resultados reportados por Nogueira *et al.*⁵⁹ e por Fukao *et al.*⁶⁰ trabalhando com filmes *spray*-LbL de TiO₂/SiO₂ e PAH/PAA, respectivamente. Sabe-se que o fosfolipídio DPPG se estrutura na forma de vesículas multilamelares quando disperso em meio aquoso, sendo estruturas bastante frágeis.^{3, 119} Dessa forma, a pressão de 10 psi foi escolhida para o crescimento dos filmes *spray*-LbL, evitando assim uma possível destruição das vesículas de DPPG durante o processo de deposição.

4.1.2. Tempo de *spray*

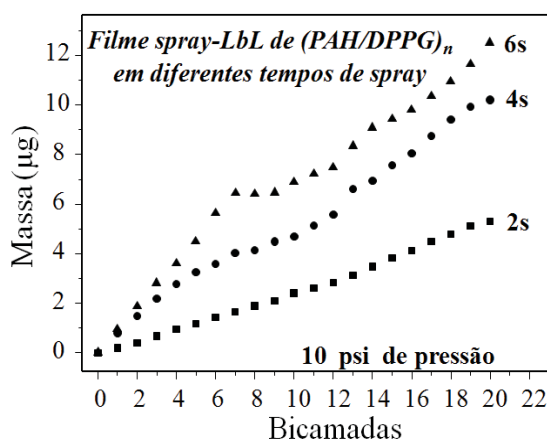


Figura 14: variação da massa (QCM) depositada por bicamada para filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG crescidos sob diferentes tempos de *spray* (2, 4 e 6 s).

A influência do tempo de *spray* sobre a deposição *spray*-LbL de $(\text{PAH/DPPG})_n$ foi analisada borrifando a solução de PAH e a dispersão de DPPG por 2, 4 e 6 s, mantendo a pressão constante a 10 psi. Os resultados de QCM obtidos são exibidos na Figura 14.

Foi observado que a massa média depositada por bicamada aumenta com o tempo de *spray*. No entanto, a linearidade

no crescimento é perdida para os filmes crescidos com 4 e 6 s, revelando um crescimento não controlado.

De maneira complementar, a morfologia dos filmes *spray*-LbL contendo 10 bicamadas de PAH/DPPG depositadas em 2, 4 e 6 s foi analisada via AFM e os resultados são exibidos nas Figuras 15a, 15b e 15c, respectivamente. Nesse caso o objetivo foi analisar a uniformidade morfológica dos filmes, sendo os detalhes relacionados às estruturas das vesículas de DPPG (tamanho e forma), assim como sua distribuição espacial, discutidos na seção 4.2.3. A uniformidade dos filmes *spray*-LbL diminui à medida que o tempo de *spray* aumenta, possivelmente pelo crescimento não linear observado para tempos de *spray* superiores a 2 s, conforme discutido (Figura 14). Isso fica evidente analisando os valores de rugosidade RMS (*root mean square*), que aumentam de 3, 15 e 40 nm para os filmes fabricados com 2, 4 e 6 s, respectivamente. Assim, considerando a configuração experimental aplicada, 10 psi de pressão e 2 s de tempo de *spray* foram escolhidos para crescer os filmes *spray*-LbL de $(\text{PAH/DPPG})_n$.

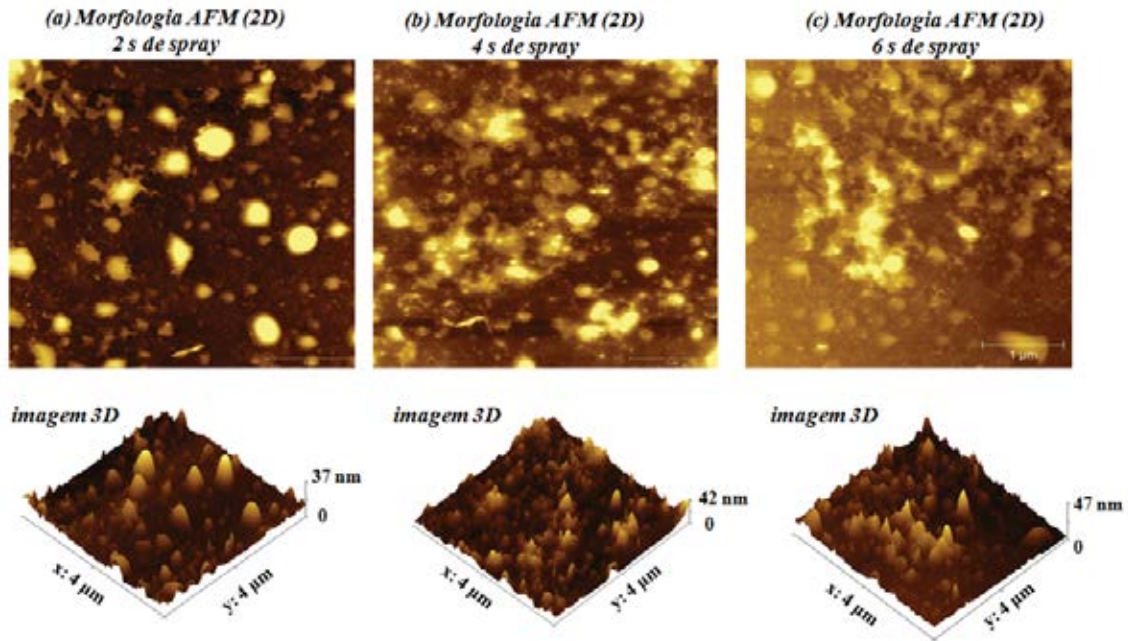


Figura 15: imagens de topografia AFM obtidas para filmes *spray*-LbL contendo 10 bicamadas de PAH/DPPG fabricados com (a) 2 s, (b) 4 s e (c) 6 s de tempo de *spray*.

4.1.3. Lavagem entre as camadas

O efeito da etapa de lavagem na deposição *spray*-LbL de $(\text{PAH/DPPG})_n$ também foi investigado. Para isso, 10 psi de pressão e 2 s de *spray* foram utilizados na deposição de cada camada, com e sem a etapa de lavagem, sendo os resultados de QCM exibidos na Figura 16a. Foi observado que a etapa de lavagem não causa mudanças significativas na massa média depositada por bicamada de PAH/DPPG. Isto indica que essa etapa pode ser omitida, acelerando o processo de deposição *spray*-LbL, o que está de acordo com o reportado por Izquierdo *et al.*⁵⁰ para filmes *spray*-LbL de PAH/PSS crescidos sem o processo de lavagem entre as camadas. A Figura 16b mostra que a frequência relativa QCM diminui linearmente para cada etapa de deposição. Essa diminuição está relacionada ao crescimento linear da massa em função do número de bicamadas depositadas. Ao final de 20 ciclos, a diminuição total da frequência foi de 750 Hz, o que equivale a aproximadamente 5,3 μg de material depositado (total).

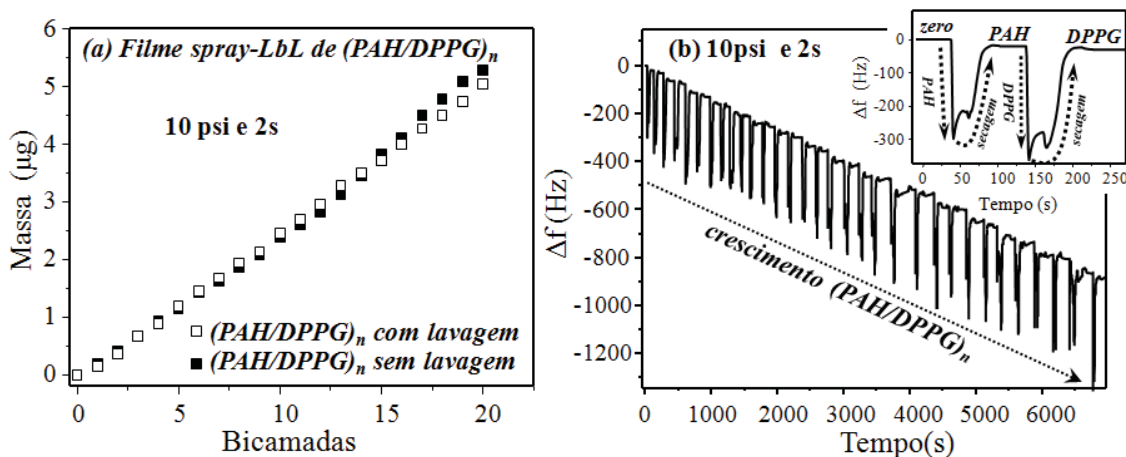


Figura 16: (a) variação de massa (QCM) para o crescimento de 20 bicamadas *spray*-LbL depositadas com e sem a etapa de lavagem entre as camadas de PAH e DPPG; (b) frequência relativa QCM em função do tempo para a deposição de 16 bicamadas *spray*-LbL de PAH/DPPG. A inserção mostra o *zoom* da frequência relativa para a primeira bicamada depositada.

A variação da frequência relativa QCM permite o monitoramento em tempo real de cada etapa envolvida no processo *spray*-LbL. O *zoom* para a primeira bicamada depositada é dado na inserção da Figura 16b, onde é possível observar uma drástica diminuição da frequência relativa QCM quando a solução de PAH é borrifada. Em seguida, a frequência aumenta até atingir um platô, o que indica a evaporação da água (*secagem*) e a formação da camada de PAH. O mesmo comportamento é observado quando a dispersão de DPPG é borrifada. Fukao *et al.*⁶⁰ foram os primeiros a relatar a técnica de QCM aplicada ao monitoramento em tempo real do crescimento de filmes *spray*-LbL, o que permite um elevado controle da deposição via *spray* produzindo filmes de elevada qualidade.

4.2. Comparação entre filmes *dipping* e *spray*-LbL de PAH/DPPG

4.2.1. Crescimento LbL monitorado via absorção no UV-Vis e QCM

A Figura 17a exibe os espectros de absorção no UV-Vis para o filme *spray*-LbL de (PAH/DPPG)_n, cujo perfil é bastante similar aos espectros obtidos para os filmes *dipping*-LbL.³ Segundo Duarte *et al.*,¹²⁰ o espectro de absorção do DPPG apresenta uma banda principal com máximo em 138 nm atribuída a transição $\pi_{CO} \rightarrow \pi^*_{CO}$. Uma segunda banda menos intensa também é observada em 147 nm atribuída a absorção do grupo fosfato.¹²⁰

Considerando o espectro do PAH, uma forte banda é observada em 172 nm atribuída a absorção dos grupos nitrogenados.¹²⁰ Dessa forma, para ambos DPPG e PAH aqui estudados não se observam as bandas de absorção por estarem abaixo da resolução apresentada pelo espectrofotômetro utilizado. O aumento nos valores de absorbância observado para os espectros da Figura 17a está relacionado com o aumento do espalhamento de luz.

Os valores de absorbância para os filmes *dipping*-LbL são ligeiramente maiores que os dos filmes *spray*-LbL, conforme exibido na Figura 17b. A mesma tendência é observada na Figura 17c, em que a massa depositada por bicamada para os filmes *dipping* e *spray*-LbL é comparada. No entanto, deve-se considerar que no método *spray*-LbL as bicamadas de PAH/DPPG são depositadas apenas em um lado do substrato, enquanto no método *dipping*-LbL as bicamadas são depositadas em ambos os lados do substrato. Portanto, considerando os procedimentos experimentais adotados em ambos os casos, a massa média depositada por bicamada no método *spray*-LbL é maior que no *dipping*-LbL. A massa média depositada por bicamada nos filmes *dipping* e *spray*-LbL é de 0,14 e 0,28 μg , respectivamente.

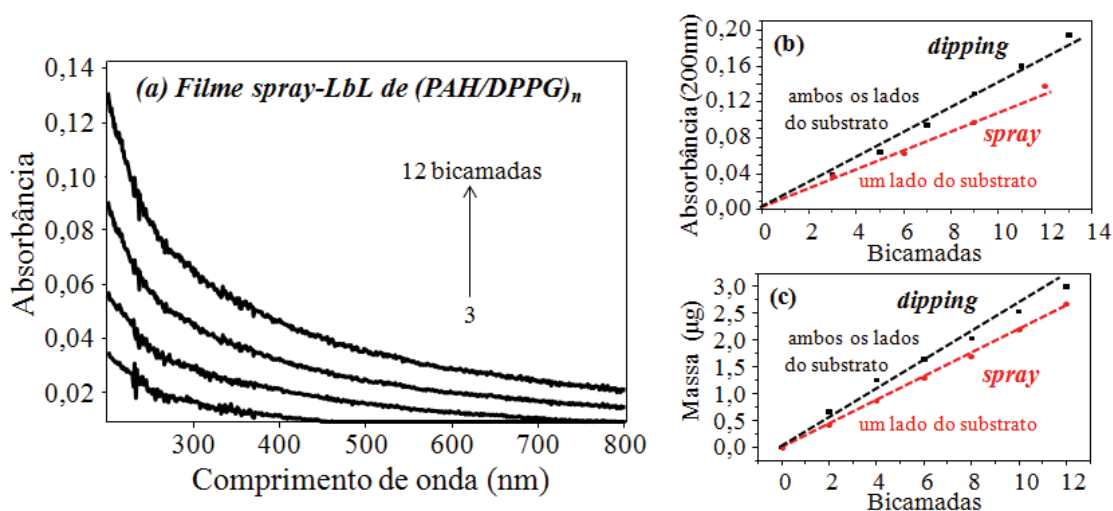


Figura 17: (a) espectros de UV-Vis para 12 bicamadas *spray*-LbL de PAH/DPPG. Dependência linear da (b) absorbância em 200 nm e (c) massa (medidas de QCM) em função do número de bicamadas depositadas para os filmes *dipping* e *spray*-LbL de PAH/DPPG.

4.2.2. PAH-DPPG – interações moleculares via FTIR

A técnica FTIR foi aplicada para investigar possíveis interações entre as camadas de DPPG e PAH que permitam o crescimento dos filmes *spray-LbL*. Os espectros FTIR para a região entre 600 e 4000 cm^{-1} e para a região abaixo de 1900 cm^{-1} são mostrados na Figura 18a e 18b, respectivamente. As atribuições¹²¹⁻¹²⁴ para as principais bandas vibracionais do DPPG e PAH são dadas na Tabela 1. O objetivo é comparar o espectro FTIR do filme *spray-LbL* com os espectros dos filmes *casting* de PAH e DPPG. Como tendência geral, observa-se que as bandas encontradas para os filmes *spray-LbL* são praticamente uma simples superposição dos espectros dos filmes *casting* de PAH e DPPG, conforme exibido na Figura 18a para 12 bicamadas *spray-LbL* de PAH/DPPG. Isso indica uma fraca interação entre as camadas de PAH e DPPG. Por exemplo, nenhuma mudança espectral foi observada para bandas a elevados números de onda, tais como 2850, 2910 e 2953 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento C-H da cadeia alifática, quando comparados aos filmes *casting* de DPPG e *spray-LbL* (Figura 18a). Além disso, considerando as interações eletrostáticas entre os grupos carregados, as bandas em 1509 e 1609 cm^{-1} atribuídas ao grupo catiônico NH_3^+ são encontradas nos mesmos números de onda para os filmes *casting* de PAH e *spray-LbL*, conforme exibido na Figura 18b. O mesmo comportamento é observado para as bandas em 1054 e 1096 cm^{-1} atribuídas ao estiramento do grupo aniônico PO_4^- do DPPG. Apenas poucas mudanças espectrais foram observadas, tais como a diminuição da intensidade relativa das bandas em 1220 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} (estiramento antissimétrico e simétrico do P=O, respectivamente), analisando o filme *spray-LbL* em relação ao filme *casting* de DPPG.

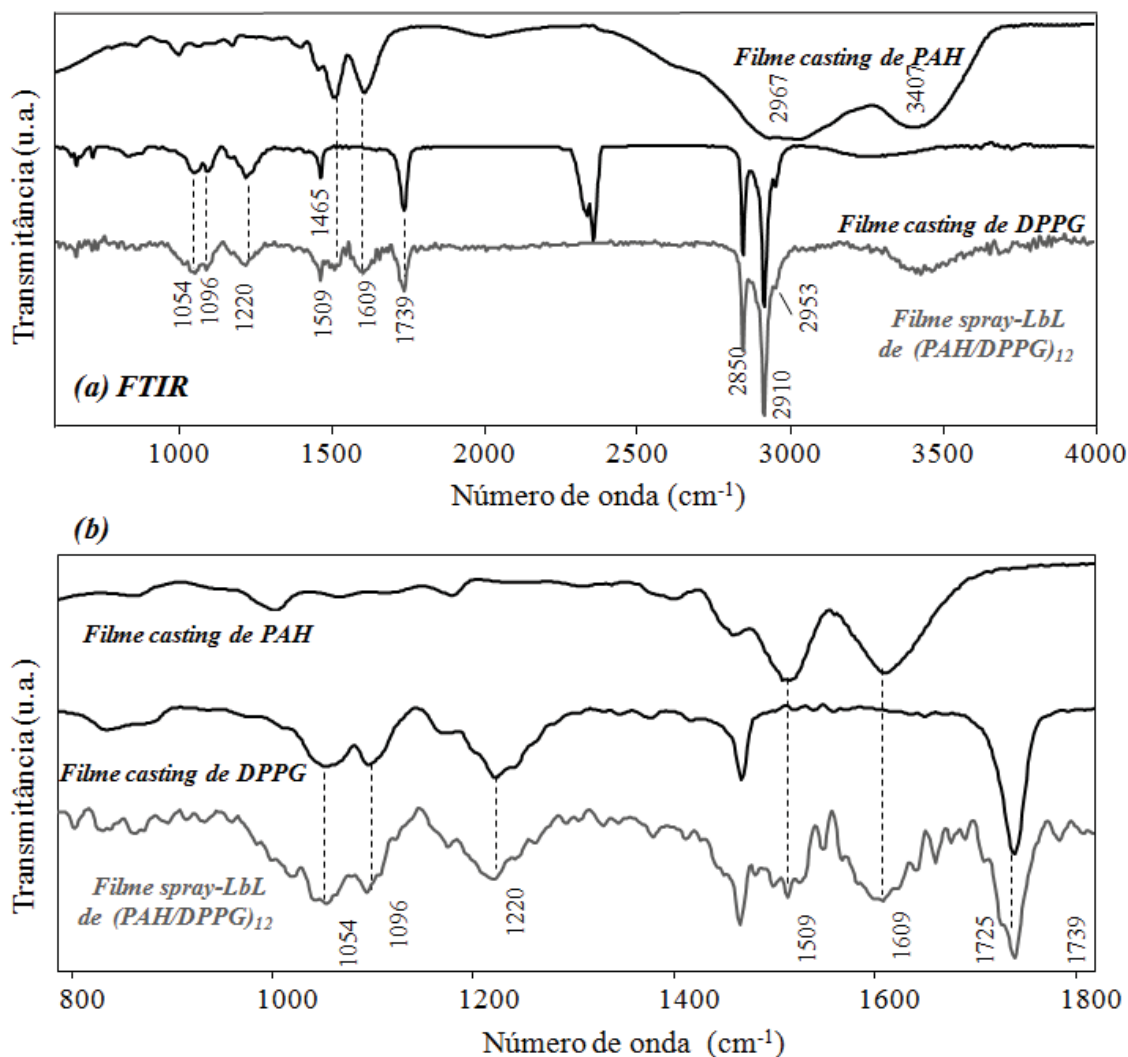


Figura 18: espectro de FTIR para 12 bicamadas *spray*-LbL de PAH/DPPG depositadas sobre ZnSe nas regiões de (a) 600-4000 cm^{-1} e (b) abaixo de 1900 cm^{-1} . Os espectros FTIR dos filmes *casting* de PAH e DPPG são dados como referências.

Considerando os filmes *dipping*-LbL de PAH/DPPG³ e os filmes LB de (PAH+DPPG)⁵, as variações espectrais (FTIR) observadas foram mais significativas do que as encontradas para os filmes *spray*-LbL. Isso sugere interações mais fortes entre DPPG e PAH na formação dos filmes LB e *dipping*-LbL. Para uma melhor comparação, a Figura 19 mostra os espectros FTIR para os três filmes em questão: filme LB com 17 camadas de (PAH+DPPG), filme *dipping*-LbL com 21 bicamadas de PAH/DPPG e filme *spray*-LbL com 12 bicamadas de PAH/DPPG.

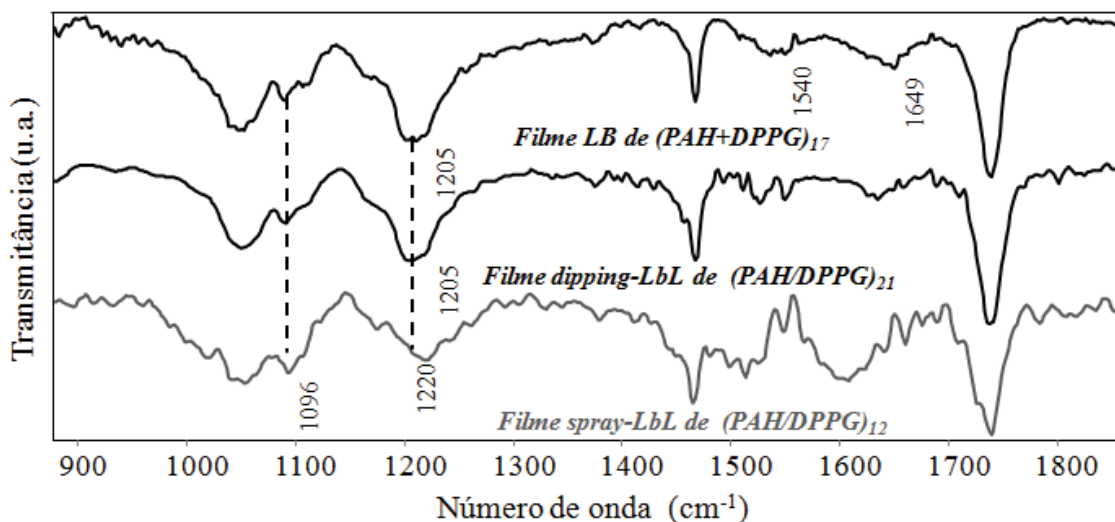


Figura 19: espectros FTIR para 17-camadas LB de (PAH+DPPG), 21 bicamadas *dipping*-LbL e 12 bicamadas *spray*-LbL.

Tabela 1. Atribuições das principais bandas FTIR dos filmes *casting* de PAH e DPPG¹²¹⁻¹²⁴

DPPG (cm ⁻¹)	PAH (cm ⁻¹)	Atribuição
2953 (ombro)		CH ₃ estiramento antissimétrico
2910		CH ₂ estiramento antissimétrico
2850		CH ₂ estiramento simétrico
1739		Estiramento do grupo carbonila
	1609	NH ₃ ⁺ deformação angular antissimétrica
	1509	NH ₃ ⁺ deformação angular simétrica
1465		CH ₂ <i>scissoring</i>
1220		P=O estiramento antissimétrico (grupo PO ₄ ⁻)
1096		P=O estiramento simétrico (grupo PO ₄ ⁻)
1054		Estiramento C-O-C

No caso dos filmes LB, as bandas do grupo NH₃⁺ são deslocadas para 1540 e 1649 cm⁻¹ (contra 1509 e 1609 cm⁻¹ para o filme *casting* de PAH). O estiramento antissimétrico P=O foi deslocado para 1205 cm⁻¹ para ambos os filmes *dipping*-LbL e LB (contra 1220 cm⁻¹ para o filme *casting* de DPPG). A similaridade encontrada para todos os filmes (LB, *dipping* e *spray*-LbL) foi a diminuição da intensidade relativa da banda em 1096 cm⁻¹ (estiramento

simétrico P=O) em relação ao filme *casting* de DPPG. Dessa forma, interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ e PO_4^- não são as principais forças envolvidas no crescimento dos filmes *spray-LbL* de PAH/DPPG, ao contrário do observado para os filmes *dipping-LbL*³ e LB⁵. Assim, no crescimento de filmes LbL contendo fosfolipídios não se deve assumir que a deposição via *dipping* e *spray* é regida pelas mesmas forças. Um estudo complementar envolvendo as interações envolvidas no crescimento dos filmes *spray-LbL* será apresentado na seção 5.1.2.

4.2.3. Morfologia via AFM e mapeamento SERS

Em termos de morfologia, as Figuras 20a e 20b mostram imagens AFM (2 e 3 dimensões, respectivamente) para um filme *spray*-LbL contendo 10 bicamadas de PAH/DPPG.

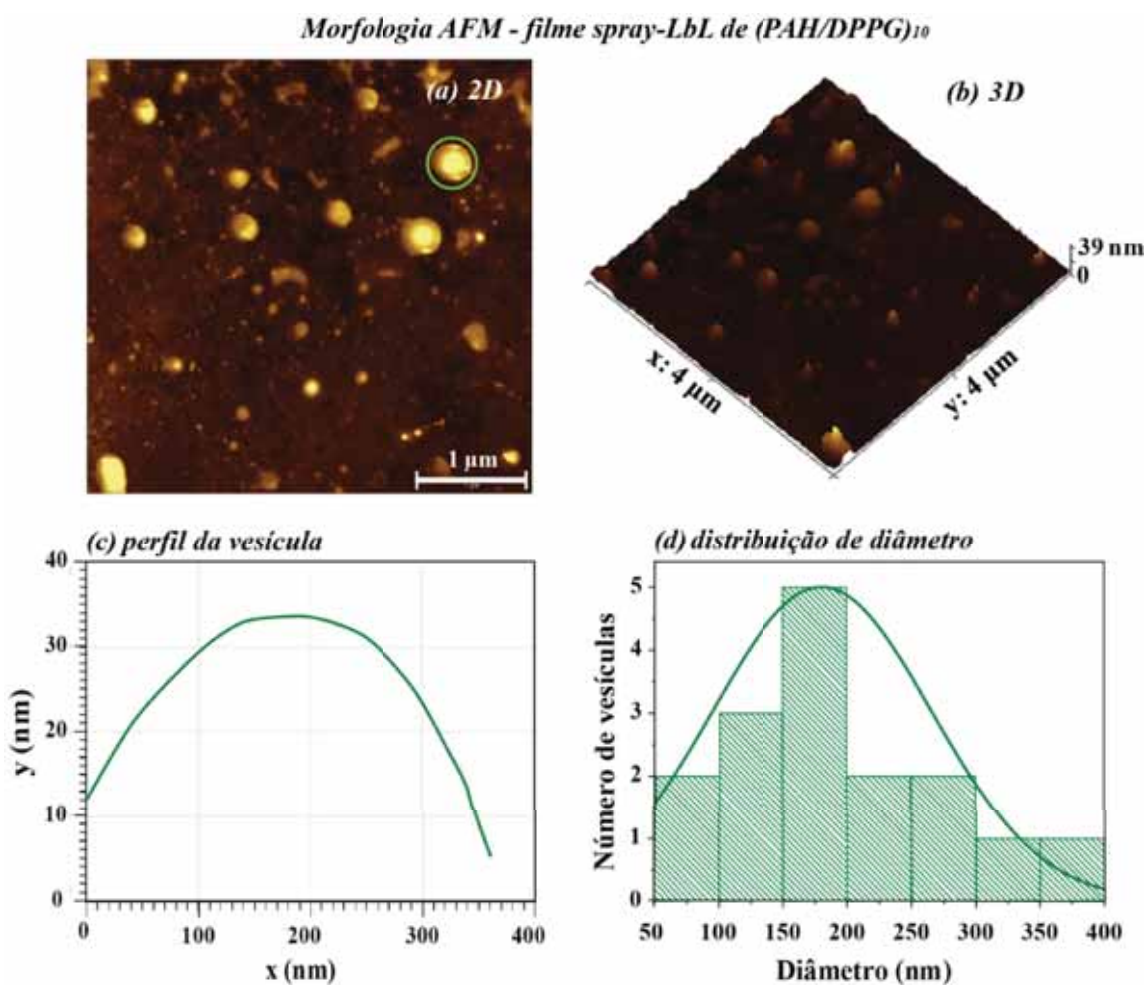


Figura 20: imagens de topografia AFM para 10 bicamadas *spray*-LbL de PAH/DPPG exibidas em (a) 2 e (b) 3 dimensões. (c) Perfil de uma vesícula de DPPG e (d) histograma com a distribuição de diâmetro (nm) de vesículas encontradas no filme *spray*-LbL.

A presença de vesículas de DPPG é evidenciada pelas estruturas esféricas presentes no filme, revelando que apesar da pressão aplicada durante a deposição por *spray*, as vesículas DPPG não são destruídas. A Figura 20c mostra o perfil de uma vesícula com um diâmetro de 350 nm, destacada na Figura 20a. Conforme o histograma da Figura 20d, as vesículas de DPPG depositadas em camadas de PAH apresentam uma distribuição de tamanho em torno de

175 nm, semelhante ao observado para os filmes *dipping-LbL*.³ Complementarmente, as imagens de AFM foram caracterizadas via rugosidade (RMS, do inglês *root mean square*) e altura média (diferença de altura entre picos e vales). A rugosidade RMS é dada pelo desvio

padrão de acordo com a equação $R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (Z_n - \bar{Z})^2}{N - 1}}$ onde $\bar{Z}$ é a média dos valores de Z

dentro da área determinada, Z_n é a altura do n -ésimo pixel e N é o número de pixels considerado, enquanto a altura média é simplesmente a média aritmética das alturas medidas. Observou-se que a altura média dos filmes *dipping-LbL* está em torno de 21,5 nm diminuindo para 6,3 nm nos filmes *spray-LbL*. O mesmo comportamento é observado para os valores de rugosidade RMS diminuindo de 10 nm (*dipping-LbL*) para 3 nm (*spray-LbL*) comparando áreas de mesmo tamanho. Essas alterações podem estar relacionadas à pressão que o PAH e as vesículas de DPPG são submetidos durante a deposição por *spray*, o que pode estruturar o filme de maneira diferente. Por exemplo, a pressão de *spray* pode afetar a forma das vesículas. A altura máxima das vesículas indicadas no perfil da Figura 20c não coincide com os valores de diâmetro, o que pode indicar a formação de estruturas esferoidais, discutidas em detalhes na seção 5.2. Além disso, as imagens de AFM sugerem que as vesículas de DPPG não recobrem completamente as camadas de PAH nos filmes *spray-LbL* (distribuição espacial das vesículas).

As espessuras dos filmes *dipping* e *spray-LbL* também foram medidas. As Figuras 21a e 21b apresentam imagens de AFM mostrando os perfis ao longo de um degrau feito pela remoção de material com uma agulha nos filmes *dipping* e *spray-LbL* contendo 10 bicamadas de PAH/DPPG, respectivamente.

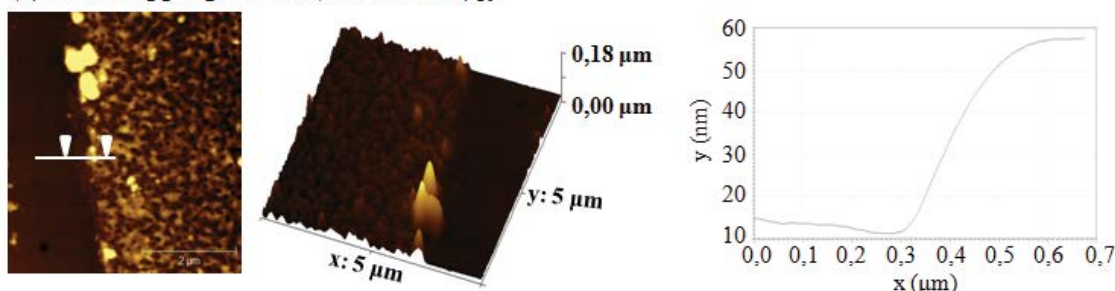
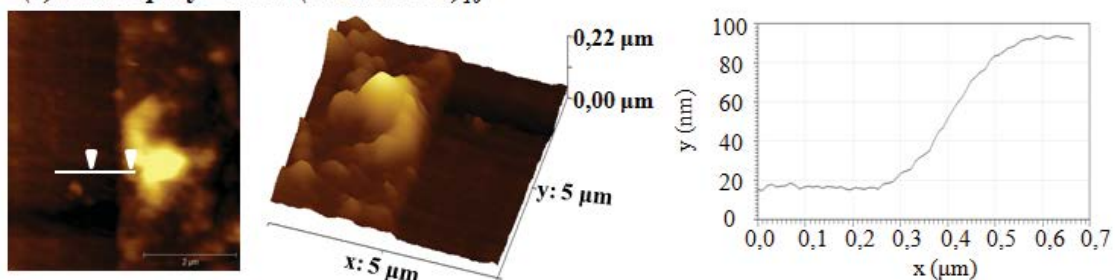
(a) Filme *dipping*-LbL de (PAH/DPPG)₁₀(b) Filme *spray*-LbL de (PAH/DPPG)₁₀

Figura 21: imagens topográficas de AFM mostrando o perfil ao longo de um degrau feito pela remoção de material com uma agulha nos filmes (a) *dipping* e (b) *spray*-LbL contendo 10 bicamadas cada.

Os filmes *dipping*-LbL mostraram uma espessura variando entre 35 e 60 nm e os *spray*-LbL entre 50 e 85 nm. Esses foram os menores e maiores valores de altura encontrados analisando o perfil de todo degrau para ambos os filmes *dipping* e *spray*-LbL. A maior espessura dos filmes *spray*-LbL está de acordo com dados de UV-Vis e QCM, que também demonstraram uma maior adsorção de material por bicamada. De acordo com a literatura,^{8, 50} a morfologia dos filmes *spray*-LbL pode ser diferente, principalmente em termos da rugosidade superficial, altura média e espessura em relação aos filmes *dipping*-LbL. Entretanto, não há um padrão que relaciona altura média, rugosidade e espessura. Izquierdo *et al.*⁵⁰ demonstraram que a espessura e a rugosidade superficial dos filmes *spray*-LbL de PAH/PSS estão diretamente relacionadas a parâmetros experimentais, tais como a concentração da solução, tempo de *spray* e a distância entre o substrato e o *spray*. Neste caso,⁵⁰ as condições experimentais permitiram a obtenção de filmes *spray*-LbL menos

esessos e com menor rugosidade superficial do que os filmes *dipping-LbL*, considerando soluções com a mesma concentração. Felix *et al.*⁵¹ também determinou que os filmes *spray-LbL* dos polieletrólitos PAH/PSS são menos rugosos e 30% menos espessos do que os filmes *dipping-LbL*. Por outro lado, Schlenoff *et al.*⁸ demonstraram que os filmes *dipping* e *spray-LbL* de PDAD/PSS apresentam rugosidade e espessura similares.

Em trabalhos anteriores,¹¹⁹ o fenômeno de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)¹²⁵ foi aplicado para investigar a estruturação dos filmes *dipping-LbL* de PAH/DPPG. O objetivo foi combinar o fármaco azul de metileno (AM) e nanopartículas de prata (AgNP) para crescer tetracamadas estruturadas como PAH/DPPG/AM/AgNP e PAH/AgNP/DPPG/AM, variando assim a distância entre a molécula alvo (AM) e as AgNP. As Figuras 22a e 22b ilustram as arquiteturas moleculares utilizadas. As AgNP apresentam os *plasmons* de ressonância localizados em superfície (*localized surface plasmon resonances* – LSPR),¹²⁶ que é uma condição necessária para ativar o efeito SERS. Entretanto, o efeito SERS é altamente dependente da distância entre a superfície das nanopartículas metálicas e a molécula alvo,¹²⁶ sendo suprimido para distâncias superiores a 15 nm. Dessa forma, a presença das vesículas de DPPG entre as AgNP e o AM é suficiente para não ativar o efeito SERS do fármaco (Figura 22a). Portanto, a ausência de sinal SERS ao longo do filme significa que as vesículas DPPG recobrem completamente a camada de PAH nos filmes *dipping-LbL* de PAH/DPPG.

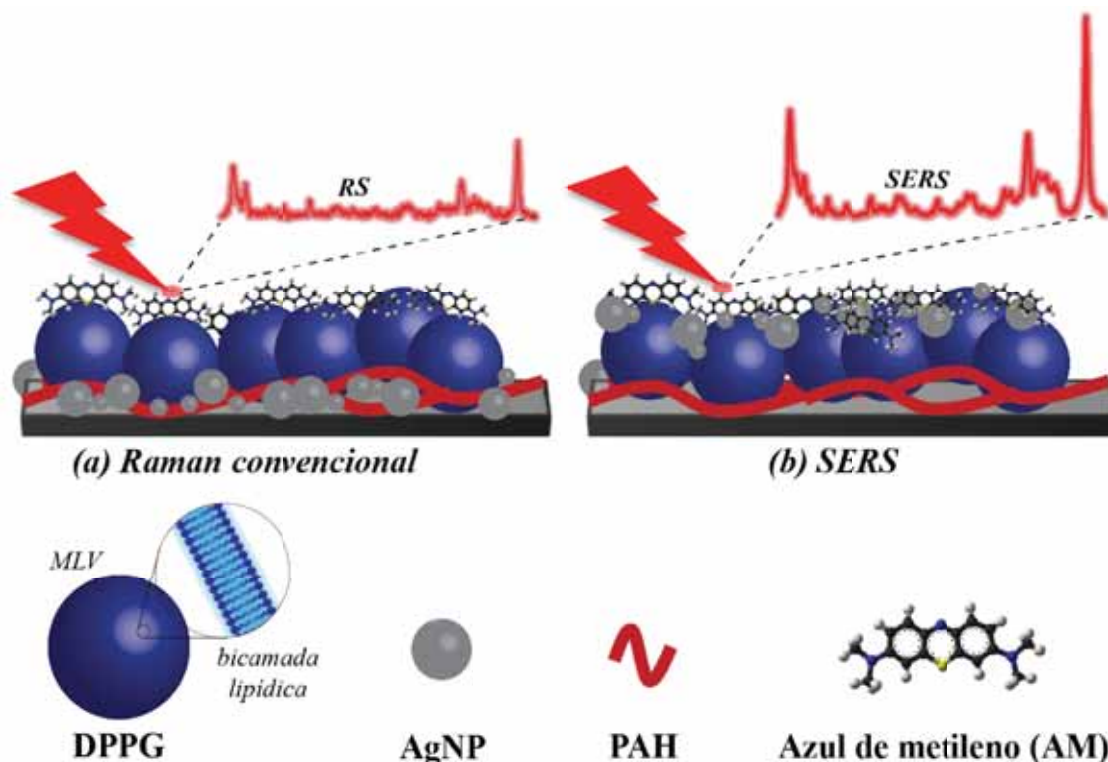


Figura 22: arquitetura molecular para tetracamadas *dipping*-LbL estruturadas como (a) PAH/AgNP/DPPG/AM e (b) PAH/DPPG/AM/AgNP.

Essa mesma estratégia foi aplicada para investigar a estrutura dos filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG. O xantênico eosina e AgNP (coloides) foram combinados com PAH e DPPG formando tetracamadas depositadas por *spray* em diferentes sequências: PAH/DPPG/AgNP/eosina e PAH/AgNP/DPPG/eosina. A eosina apresenta elevada seção de choque para o efeito SERS,^{67, 127} e foi escolhida pois também será utilizada em experimentos de detecção, apresentados na seção 6.1. De acordo com a discussão anterior, espera-se que o efeito SERS da eosina seja ativado quando as AgNP estiverem próximas o suficiente (distâncias < 15 nm). Por outro lado, a presença das vesículas de DPPG entre a eosina e as AgNP deve ser suficiente para suprimir o sinal SERS da eosina. Os resultados mostraram que espectros SERS da eosina foram coletados para ambas as estruturas de tetracamadas: PAH/DPPG/AgNP/eosina e PAH/AgNP/DPPG/eosina. Para ambas as estruturas existem eosina e AgNP próximas o suficiente, sugerindo que as vesículas de DPPG não recobrem

totalmente a camada de PAH ao formar os filmes *spray*-LbL. Este resultado é consistente com a distribuição espacial das vesículas de DPPG observada via AFM.

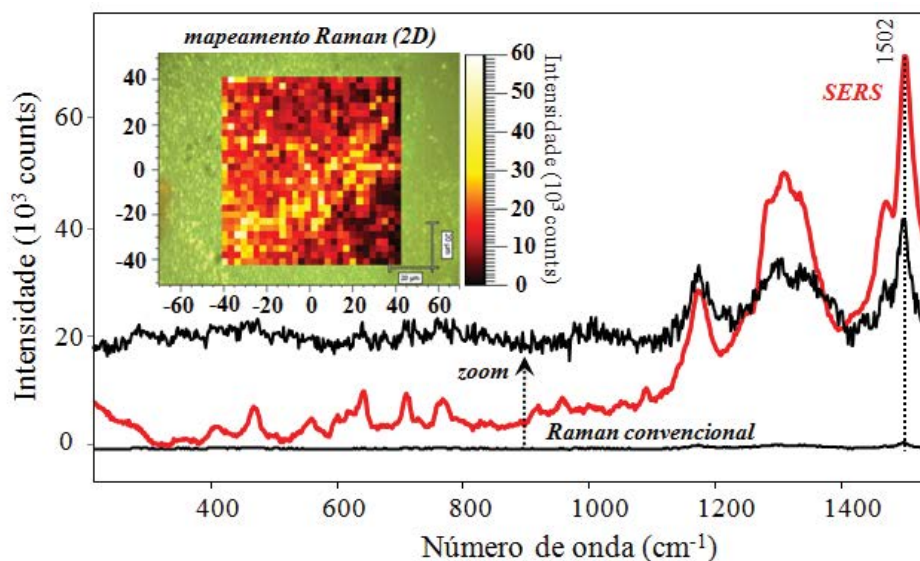


Figura 23: espectros Raman e SERS para o filme *spray*-LbL contendo 1 tetracamada de PAH/AgNP/DPPG/eosina. A inserção mostra o mapeamento Raman para uma área de $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ coletando espectros com passo de $2\ \mu\text{m}$ (total de 1681 espectros) e plotando a intensidade da banda em $1502\ \text{cm}^{-1}$. O espectro Raman foi selecionado de um ponto escuro e o espectro SERS de um ponto claro do mapeamento.

A Figura 23 mostra espectros Raman e SERS coletados para a estrutura PAH/AgNP/DPPG/eosina. A inserção na Figura 23 mostra um mapeamento em área construído coletando espectros Raman ponto a ponto ao longo de uma área de $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ com passo de $2\ \mu\text{m}$ levando a um total de 1681 espectros. Em seguida, a intensidade da banda em $1502\ \text{cm}^{-1}$ foi plotada ao longo da área mapeada, onde pontos mais claros referem-se a maiores intensidades. A banda em $1502\ \text{cm}^{-1}$ é atribuída ao estiramento do grupo C=C da molécula de eosina.^{67, 127} Observa-se que a intensidade desta banda varia significativamente de um ponto para outro, o que é uma consequência direta da distribuição espacial das AgNP (quanto mais próxima a eosina da AgNP, maior o sinal SERS). Existem alguns pontos escuros, onde as vesículas de DPPG podem estar posicionadas entre as moléculas de eosina e as AgNP, suprimindo assim o sinal SERS.

Uma estimativa do fator de amplificação pode ser feita considerando a relação de intensidade entre um ponto claro e um ponto escuro,¹¹⁹ o que levou a um fator de cerca de 10^4 . Isto está em bom acordo com os fatores de amplificação previstos para SERS considerando o mecanismo eletromagnético, ou seja, a amplificação é basicamente produzida pelo campo eletromagnético amplificado em torno da superfície das nanopartículas metálicas, ao invés de mudanças na polarizabilidade da eosina.¹²⁵ A similaridade (números de onda e perfil de intensidade relativa) entre os espectros Raman (ampliado na Figura 23 para melhor visualização) e SERS corroboram com o mecanismo eletromagnético de amplificação, ou seja, a adsorção da eosina na superfície da AgNP é física.

Capítulo 5

5. Arquitetura molecular em filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo vesículas de DODAB/DPPG

Uma característica dos filmes *spray*-LbL é que a arquitetura molecular pode ser diferente dos filmes *dipping*-LbL correspondentes,⁹⁹ o que requer mais pesquisas tanto em termos da caracterização dos filmes, como na identificação de novas aplicações. Neste capítulo, construído com base no capítulo anterior, filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo vesículas de DODAB/DPPG foram crescidos e suas arquiteturas moleculares comparadas. Usando uma combinação de métodos experimentais, será demonstrado que a arquitetura molecular dos filmes *spray*-LbL difere consideravelmente dos filmes *dipping*-LbL.

5.1. Crescimento dos filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG

5.1.1. Monitoramento via absorção no UV-Vis e QCM

Um crescimento aproximadamente linear foi observado para os filmes *dipping*- e *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)_n, segundo os espectros de absorção no UV-Vis e os dados de QCM exibidos na Figura 24. A massa média depositada por bicamada é maior para os filmes *spray*-LbL (0,26 µg) em relação aos filmes *dipping*-LbL (0,17 µg). Vale ressaltar que os valores de absorção e massa exibidos na Figura 24 são ligeiramente maiores para os filmes *dipping*-LbL, uma vez que a adsorção dos materiais ocorre em ambos os lados do substrato, o que está de acordo com o discutido na seção 4.2.1.

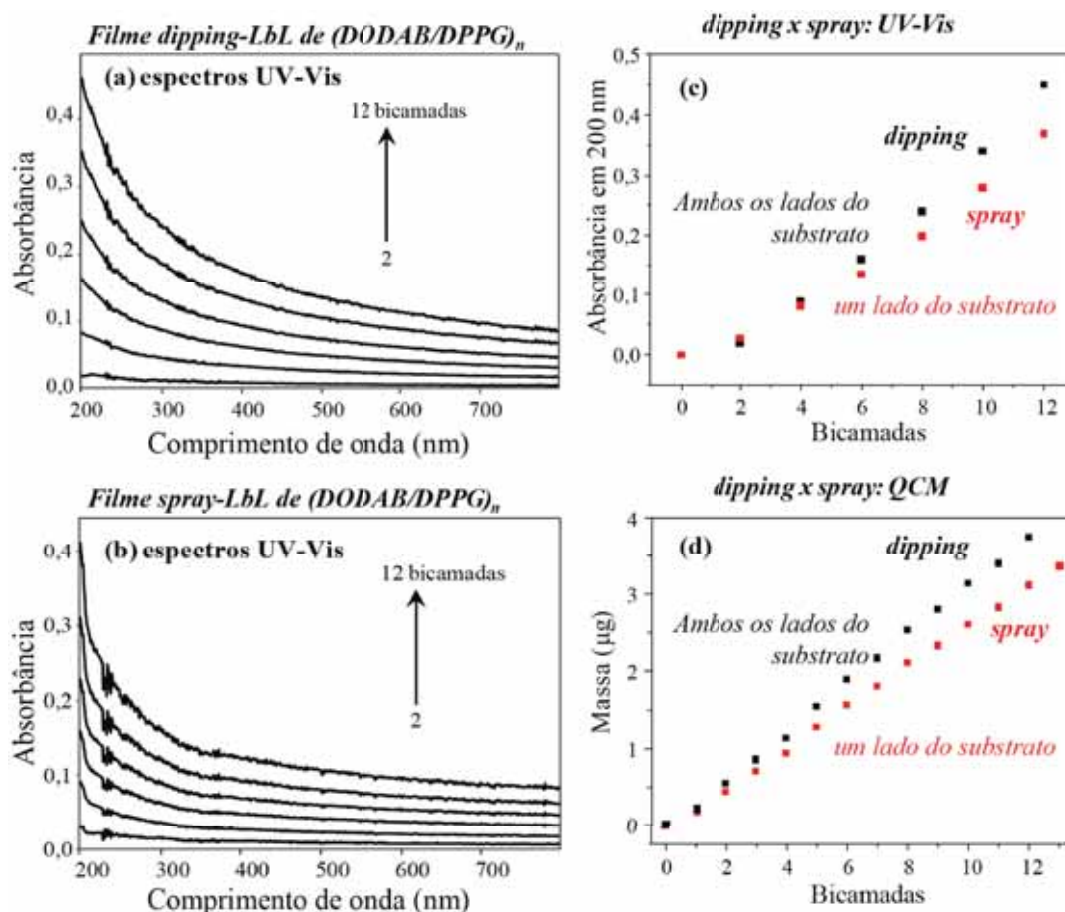


Figura 24: espectros UV-Vis para os filmes (a) *dipping*- e (b) *spray*-LbL de DODAB/DPPG depositados até 12 bicamadas. Dependência aproximadamente linear da (c) absorbância em 200 nm e (d) massa (medidas de QCM) em função do número de bicamadas depositadas para os filmes *dipping* e *spray*-LbL de DODAB/DPPG. A absorbância em (c) e massa em (d) referem-se ao material adsorvido em ambos os lados dos substratos para os filmes de *dipping*-LbL.

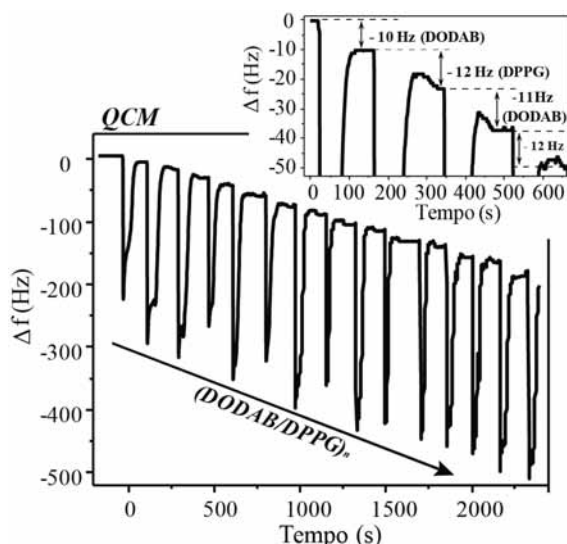


Figura 25: frequência relativa QCM em função do tempo para a deposição de 7 bicamadas *spray*-LbL de DODAB/DPPG. A inserção mostra o zoom da frequência relativa para as primeiras 2 bicamadas.

A presença de DODAB nos filmes *spray*-LbL foi confirmada pelas variações de frequência relativa QCM. A Figura 25 mostra que a frequência relativa QCM diminui linearmente para cada deposição por *spray*, o que está diretamente relacionado com o crescimento linear do filme, como discutido na Figura 24. A inserção na Figura 25 mostra claramente a diminuição da frequência relativa para as duas primeiras bicamadas depositadas. Uma diminuição média de frequência de 17 Hz foi encontrada

a cada camada depositada de DODAB, o que corresponde a cerca de 0,12 μg de DODAB sendo depositado por bicamada. Com relação às camadas de DPPG, cerca de 0,16 μg é depositado a cada bicamada. Esta quantidade de massa depositada tanto para o DODAB quanto para o DPPG é equivalente em termos de número de moléculas, ou seja, em média $1,14 \times 10^{20}$ moléculas de DODAB e $1,29 \times 10^{20}$ moléculas de DPPG são depositadas por bicamada.

5.1.2. DODAB-DPPG – interações moleculares via FTIR e QCM

Em analogia ao apresentado na seção 4.2.2 para os filmes LbL de PAH/DPPG, a espectroscopia de absorção FTIR foi utilizada para investigar possíveis interações entre as camadas de DODAB e DPPG, que possam determinar o crescimento dos filmes. Os espectros FTIR são mostrados na Figura 26, com as principais atribuições¹²¹⁻¹²⁴ apresentadas na Tabela 2. De modo geral, as bandas vibracionais observadas para os filmes *dipping*- e *spray*-LbL são

praticamente uma simples superposição dos espectros obtidos para os filmes *casting* de DODAB e DPPG.

Não foram observadas alterações espectrais (deslocamento de bandas e/ou variações de intensidade relativa) para bandas em números de onda mais elevados (2850, 2910 e 2953 cm^{-1}), atribuídas ao estiramento C-H das cadeias alifáticas, comparando os filmes *casting* de DODAB e DPPG com o filme *spray*-LbL (Figura 26a). Além disso, considerando as interações eletrostáticas entre os grupos carregados, a banda em 1490 cm^{-1} atribuída a deformação angular $\text{CH}_3\text{-N}^+$ é encontrada nos mesmos números de onda, tanto para o filme *casting* de DODAB quanto para o filme *spray*-LbL, como mostrado na Figura 26b. O mesmo comportamento é encontrado para as bandas em 1054 e 1096 cm^{-1} atribuídas ao estiramento PO_4^- , isto é, elas se encontram nos mesmos números de onda para o filme *casting* de DPPG e *spray*-LbL. Foram observadas apenas algumas alterações espectrais, tais como uma diminuição na intensidade relativa das bandas em 1054 e 1096 cm^{-1} para o filme *spray*-LbL em relação ao filme *casting* de DPPG, como mostrado na Figura 26b. A Figura 26c mostra uma comparação entre os espectros FTIR de ambos os filmes *dipping*- e *spray*-LbL. Considerando os filmes *dipping*-LbL, o espectro FTIR é muito semelhante ao do filme *spray*-LbL, apresentando apenas algumas alterações espectrais em relação ao filme *casting* de DPPG. A pequena diferença entre os filmes *casting* e LbL podem indicar fraca interação entre DODAB e DPPG. Portanto, as interações eletrostáticas entre os grupos $\text{CH}_3\text{-N}^+$ (DODAB) e PO_4^- (DPPG) parecem não ser a principal força envolvida no crescimento de filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG. Isto está em contraste com os resultados obtidos para os filmes LbL de PAH/DPPG,³ em que interações eletrostáticas mais intensas entre DPPG e PAH levaram a mudanças espectrais maiores para os filmes *dipping*-LbL, em comparação com os filmes *spray*-LbL.

Um ombro em 1717 cm^{-1} foi observado apenas para os filmes *spray*-LbL e pode ser atribuído a ligações de hidrogênio entre os grupos éster COO e glicerol OH das moléculas adjacentes de DPPG. No trabalho de Dicko *et al.*¹²² um ombro na região de 1720 cm^{-1} foi observado por espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) para monocamadas de Langmuir formadas por DPPG. Os autores propõem que a ligação de hidrogênio é favorecida a baixas pressões de superfície devido à maior desordem no filme de Langmuir de DPPG, e, por conseguinte, pode-se supor que os agregados de vesículas no filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG poderiam levar a uma maior desordem. Este último foi observado por AFM e SERS e serão discutidos na seção 5.2.

Tabela 2. Atribuição das principais bandas FTIR para os filmes *casting* de DODAB e DPPG.

DPPG (cm^{-1})	DODAB (cm^{-1})	Atribuições
2953 ombro	2953	CH ₃ estiramento antissimétrico
2910	2910	CH ₂ estiramento antissimétrico
2850	2850	CH ₂ estiramento simétrico
	1490	CH ₃ -N ⁺ deformação angular
1470	1470	CH ₂ <i>scissoring</i>
	909	estiramento C-N
	718	deformação angular CH ₂

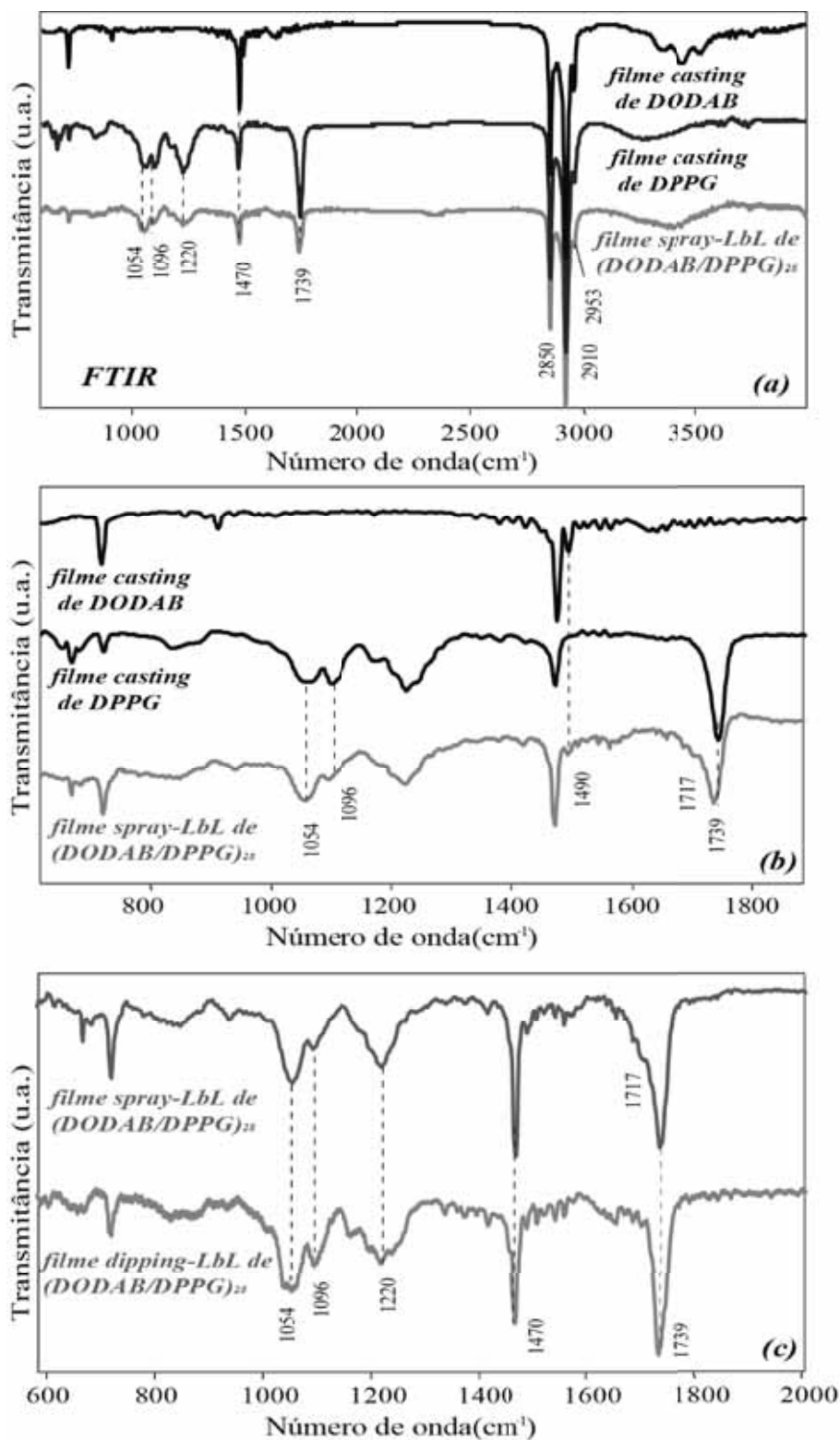


Figura 26: (a) espectro FTIR para 28 bicamadas *spray*-LbL de DODAB/DPPG depositadas em Ge. Os espectros FTIR para os filmes *casting* de DODAB e DPPG são dados como referências; (b) zoom da região abaixo de 1900 cm⁻¹ exibida em (a); (c) espectros FTIR para 28 bicamadas dos filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG.

Para complementar a discussão sobre as interações moleculares que determinam o crescimento dos filmes LbL, experimentos auxiliares envolvendo distintos lipídios e polieletrólitos mostraram que filmes *spray*-LbL podem crescer não apenas com materiais de cargas opostas, mas também com materiais de mesma carga. Em contrapartida, filmes *dipping*-LbL não puderam ser crescidos por materiais de mesma carga ou com apenas um único componente. No caso dos fosfolipídios zwitteriônicos, o crescimento de filmes *dipping*-LbL de PAH/DPPC foi limitado a 13 bicamadas.³ Filmes *spray*-LbL contendo multicamadas de PAH(+)/DPPG(-), DODAB(+)/DPPG(-), PAH(+)/DPPC(zwitteriônico) e PAH(+)/DODAB(+) foram crescidos com sucesso, conforme exibido na Figura 27a.

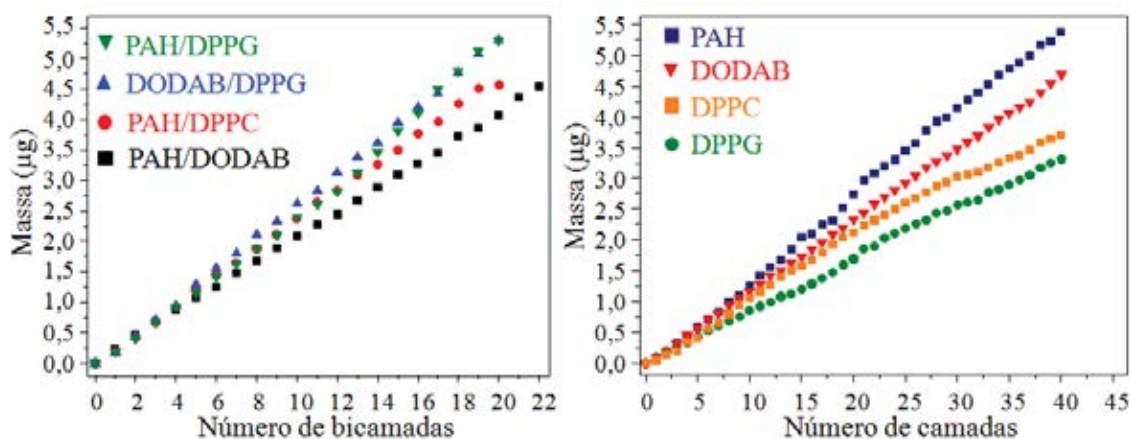


Figura 27: dados de QCM para o crescimento de filmes *spray*-LbL contendo bicamadas de (a) PAH(+)/DPPG(-), DODAB(+)/DPPG(-), PAH(+)/DPPC (zwitteriônico) e PAH(+)/DODAB(+). (b) Camadas de PAH, DODAB, DPPC e DPPG depositadas individualmente.

Para os materiais de cargas opostas, a quantidade de massa depositada por bicamada é maior do que a soma das massas depositadas para as camadas individuais, conforme exibido na Figura 27b para filmes crescidos utilizando apenas um componente. Fica claro na Tabela 3, que a massa depositada por bicamada de PAH/DPPG e DODAB/DPPG é cerca de 20% e 30% maior do que a soma das massas dos materiais depositados individualmente (PAH+DPPG e DODAB+DPPG), respectivamente. No caso do fosfolipídio zwitteriônico DPPC a massa depositada por bicamada foi praticamente a mesma que a soma das camadas individuais

(PAH+DPPC). Quanto ao filme *spray*-LbL obtido com materiais igualmente carregados, o que é em si demonstração de que as interações eletrostáticas não regem o crescimento do filme, a massa depositada por bicamada é cerca de 20% menor do que a soma das camadas individuais depositadas (DODAB+PAH). Note que a Tabela 3 traz apenas os dados para filmes *spray*-LbL, uma vez que filmes *dipping*-LbL não puderam ser crescidos com um único componente.

Tabela 3. Massa média depositada por camadas individuais e bicamadas *spray*-LbL

Filme <i>spray</i> -LbL	Massa média (µg)	Filme <i>spray</i> -LbL	Massa média (µg)
DODAB(+)	0,11	PAH/DPPG	0,26
PAH(+)	0,14	DODAB/DPPG	0,26
DPPG(-)	0,08	PAH/DPPC	0,23
DPPC(zwiteriônico)	0,09	PAH/DODAB	0,20

Em resumo, estes resultados indicam que interações eletrostáticas desempenham um papel, mas não são a única interação relevante para a construção de filmes *spray*-LbL aqui estudados. A natureza exata das forças envolvidas no crescimento dos filmes *spray*-LbL ainda não é conhecida. Porém, verificou-se que as forças envolvidas no crescimento de filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo os mesmos materiais podem ser diferentes. A importância da arquitetura molecular também fica evidente analisando os dados disponíveis na literatura. Por exemplo, Porcel *et al.*¹²⁸ relata que filmes *spray*-LbL contendo ácido poli-glutâmico (PGA) e PAH não foram crescidos quando apenas uma solução (poliânion ou polication) foi pulverizada sobre o substrato. Este experimento foi realizado em condições experimentais diferentes do que aqui relatados, gerando uma arquitetura molecular onde a interação eletrostática é crucial para o crescimento dos filmes.

5.2. Arquitetura dos filmes *dipping* e *spray*-LbL

Medidas de AFM foram usadas para investigar a morfologia dos filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG. As imagens AFM nas Figuras 28a e 28b coletadas para 10 bicamadas *dipping*- e *spray*-LbL indicam que a maior parte das vesículas não foram destruídas sob as condições experimentais utilizadas. A presença de vesículas de DODAB e DPPG é evidenciada pelas estruturas esféricas, com diâmetro que varia de 50 a 250 nm para os filmes *dipping*-LbL e de 50 a 150 nm para filmes *spray*-LbL. De acordo com os perfis das Figuras 28c e 28d e os histogramas com a distribuição dos diâmetros na Figura 28e e 28f, o diâmetro médio das vesículas é de aproximadamente 200 nm e 100 nm para os filmes *dipping*- e *spray*-LbL, respectivamente.

Concluiu-se que a maioria das vesículas foram preservadas com base não só nas imagens de AFM, mas também em evidências anteriores em que as vesículas mantêm sua fase aquosa interna nos filmes LbL.^{3, 5} Algumas das vesículas podem, contudo, terem sido destruídas pela pressão de *spray*, uma vez que menos vesículas são encontradas no filme *spray*-LbL, o que é consistente com o observado para os filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG. A forma das vesículas foi afetada consideravelmente para o filme *spray*-LbL, com um decréscimo de cerca de uma ordem de grandeza na altura máxima, Figuras 28c e 28d, variando entre 3 e 6 nm para os filmes *spray*-LbL. A altura medida aqui não coincide com o raio da vesícula, provavelmente porque as vesículas podem estar embebidas no filme e os perfis sendo medidos acima do equador da vesícula. No entanto, devido à pressão aplicada durante a deposição, as vesículas podem ser estruturadas como esferóides, como representado na Figura 29. Pelo mesmo motivo, a rugosidade RMS diminuiu de 8,3 nm para 0,6 nm considerando áreas de mesmo tamanho para os filmes *dipping*-LbL e *spray*-LbL, respectivamente, o que está de acordo com o observado na seção 4.2.3. Tais diferenças na morfologia entre filmes *dipping*- e *spray*-LbL tem sido observada na literatura, considerando diferentes sistemas.^{8, 50}

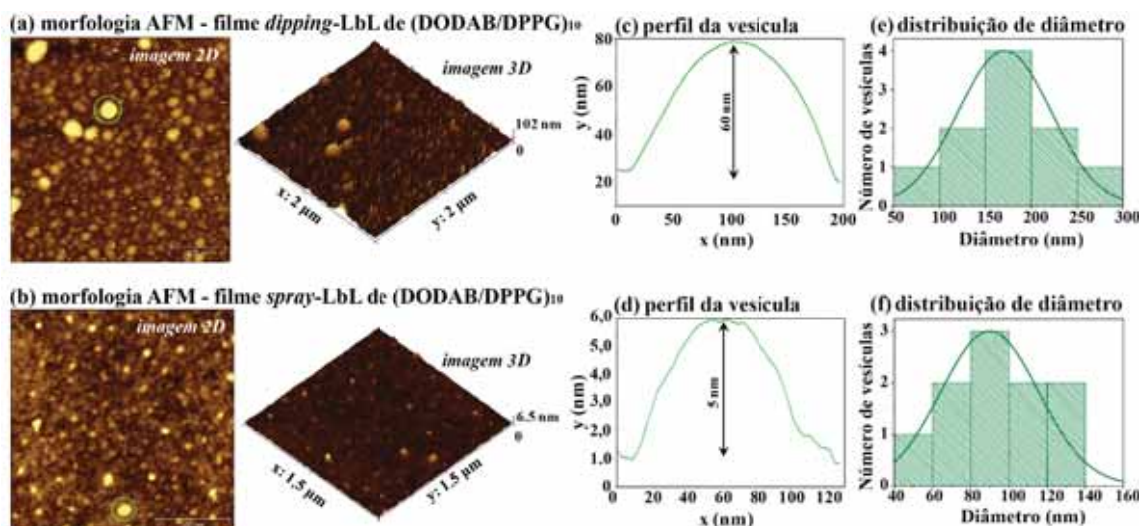


Figura 28: imagens topográficas de AFM em 2 e 3 dimensões para 10 bicamadas de DODAB/DPPG depositadas via (a) *dipping*- e (b) *spray*-LbL. Perfis de vesículas traçados para os filmes (c) *dipping*- e (d) *spray*-LbL. Histogramas de distribuição de diâmetro (nm) de vesículas encontradas nos filmes (e) *dipping*- e (f) *spray*-LbL.

As imagens AFM sugerem que as vesículas de DODAB e DPPG não são depositadas em camadas estratificadas nos filmes *spray*-LbL, em contraste com os filmes *dipping*-LbL, também ilustrado na Figura 28.

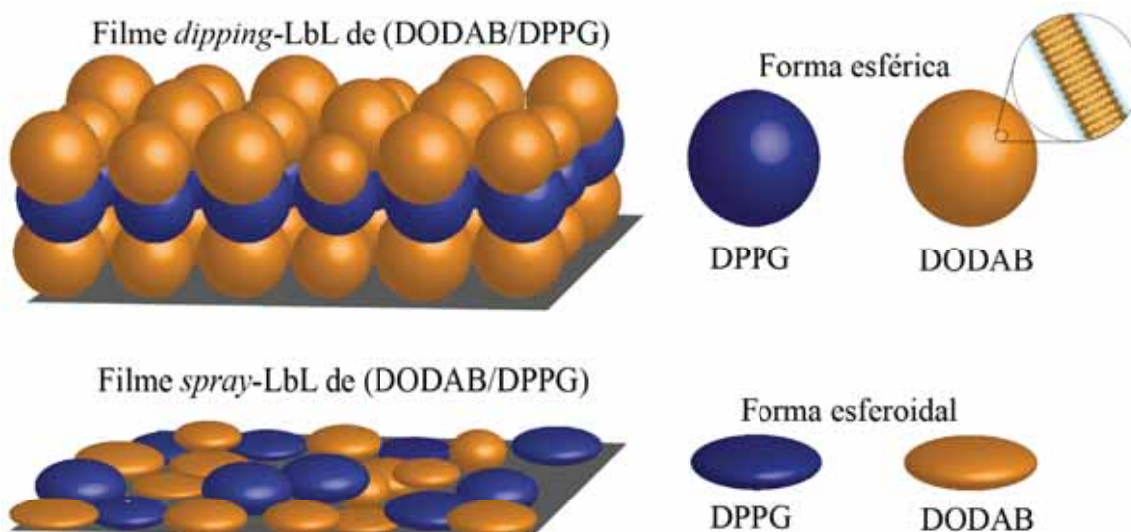


Figura 29: possíveis arquiteturas moleculares em filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG. Filmes *dipping*-LbL: camadas estratificadas com DODAB e DPPG formando estruturas esféricas semelhantes. Filmes *spray*-LbL: camadas não-estratificadas com DODAB e DPPG formando esferóides.

Mais evidências para a estratificação (ou não) das multicamadas nos filmes LbL são obtidas por análises SERS, em analogia ao que foi demonstrado na seção 4.2.3, para filmes LbL de PAH/DPPG. Tetracamadas com diferentes arquiteturas moleculares foram fabricadas, com uma camada contendo uma molécula alvo cujo sinal SERS pode ser diferenciado de contribuições das outras camadas. A molécula alvo utilizada foi o xantênico eritrosina, que apresenta elevada seção choque para SERS,^{67, 127} e foi escolhida pois também será utilizada em experimentos de detecção. Filmes *dipping*- e *spray*-LbL foram construídos contendo tetracamadas em duas sequências: DODAB/DPPG/AgNP/eritrosina e DODAB/AgNP/DPPG/eritrosina. Se os filmes forem estratificados, o efeito SERS será observável apenas na primeira sequência, uma vez que nesta última sequência a distância entre as AgNP e eritrosina prejudicaria o efeito SERS. Por outro lado, se o efeito SERS é obtido para a segunda sequência, então a tetracamada não é estratificada.

Em experimentos de controle, o efeito SERS foi observado para a tetracamada DODAB/DPPG/AgNP/eritrosina em ambos os filmes *dipping*- e *spray*-LbL, uma vez que a camada de eritrosina é adjacente às AgNP (resultados não mostrados). Para a tetracamada DODAB/AgNP/DPPG/eritrosina, no entanto, a Figura 30a mostra que o efeito SERS só foi obtido para o filme *spray*-LbL. Para o filme *dipping*-LbL, o sinal foi muito fraco, o que corresponde ao espalhamento Raman convencional. O sinal pôde, contudo, ser atribuído à eritrosina pela semelhança das bandas com o espectro SERS, conforme indicado pelo espectro ampliado na Figura 30a, marcado com uma seta.

Portanto, para o filme *dipping*-LbL, as vesículas de DODAB e DPPG são de fato depositadas em camadas estratificadas, como indicado no desenho da Figura 29. Em contrapartida, a ilustração dos filmes *spray*-LbL descreve camadas não estratificadas, o que está de acordo com as imagens de AFM (Figura 28) e os resultados obtidos para os filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG (seção 4.2.3).

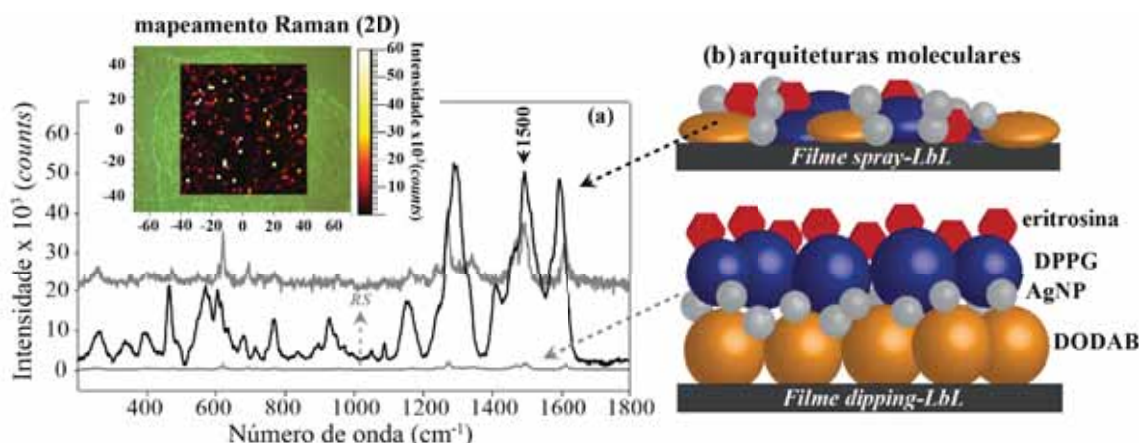


Figura 30: (a) espectros Raman convencional e SERS coletados para filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo ambos a tetracamada DODAB/AgNP/DPPG/eritrosina. A inserção mostra o mapeamento Raman para uma área de 80 $\mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ coletando espectros com passo de 2 μm (total de 1681 espectros) e plotando a intensidade da banda em 1500 cm^{-1} . (b) Estruturas moleculares propostas para filmes *dipping*- e *spray*-LbL

A inserção na Figura 30a mostra um mapeamento Raman construído através de espectros coletados ponto-a-ponto ao longo de uma área de 80 $\mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$, com passo de 2 μm , que leva a um total de 1681 espectros obtidos para a tetracamada depositada por *spray*-LbL. A intensidade da banda em 1500 cm^{-1} (estiramento C = C) foi plotada ao longo da área mapeada, onde regiões mais claras referem-se a intensidades mais elevadas. A intensidade da banda varia significativamente de local para local devido à distribuição espacial da AgNP (maior a proximidade eritrosina-AgNP, mais intenso o sinal SERS). Existem algumas regiões escuras onde as vesículas de DPPG podem estar posicionadas entre eritrosina e AgNP, suprimindo o sinal SERS, levando a espectros Raman convencionais. Uma estimativa do fator de amplificação pode ser feita considerando a relação de intensidade entre um ponto claro e um ponto escuro,¹¹⁹ o que levou a um fator de cerca de 10^4 , de acordo com o observado na seção 4.2.3. Mais uma vez, a amplificação é produzida basicamente pelo aumento do campo eletromagnético local ao invés de alterações na polarizabilidade da eritrosina.¹²⁵

Capítulo 6

6. Aplicação sensorial

A concepção de novas estruturas supramoleculares tem estado na linha de frente da ciência dos materiais, especialmente no desenvolvimento de nanotecnologias. Muitos são os métodos para produzir tais estruturas, mas uma ênfase tem sido dada a técnicas de fabricação que permitem o controle de arquiteturas moleculares, como as técnicas de Langmuir-Blodgett (LB)¹²⁹⁻¹³⁰ e *Layer-by-Layer* (LbL).⁶⁻⁷ Tais técnicas permitem a combinação de materiais distintos em uma única arquitetura molecular, buscando sinergia entre os componentes do filme. A importância do controle de arquiteturas levou a cunhagem do termo nanoarquitetônica (*nanoarchitectonics*),¹³¹⁻¹³² que é definida por Ariga *et al.*¹³³ como:

“a technology system to be used for arranging nanoscale structural units, i.e. the nanostructure unit as a group of atoms or molecules in a pre-designated configuration”.

Inúmeros materiais podem ser explorados dentro do paradigma da nanoarquitetônica, de materiais orgânicos a componentes inorgânicos.¹³⁴ Igualmente amplo é o espectro de aplicações possíveis,¹³⁵⁻¹³⁷ incluindo sensores e biossensores. Com tal variedade de materiais e finalidades, a otimização das propriedades de materiais nanoestruturados em diferentes arquiteturas moleculares torna-se crucial. Isto exige, não só métodos experimentais para caracterizar as propriedades do sistema, mas também técnicas para analisar grandes quantidades de dados, normalmente gerados no processo de caracterização. Neste capítulo, mais que a capacidade de detecção de diferentes analitos (xantênicos e fenóis), será avaliado o efeito de materiais distintos estruturados em diferentes arquiteturas moleculares na resposta das unidades sensoriais.

6.1. Detecção de eosina

O desempenho dos filmes *spray*-LbL de PAH/DPPG como transdutores em um sistema de língua eletrônica (*e-tongue*) foi verificado para soluções aquosas contendo eosina em diferentes concentrações. O conjunto de sensores foi formado por 1 eletrodo interdigitado de Pt sem recobrimento e 3 eletrodos interdigitados de Pt recobertos com 5 camadas LB de (PAH+DPPG), 5 bicamadas *dipping*-LbL de PAH/DPPG e 5 bicamadas *spray*-LbL de PAH/DPPG. Este conjunto permite uma comparação direta entre as unidades sensoriais em relação ao efeito das arquiteturas moleculares de cada filme sobre a resposta de impedância. No caso dos filmes LB, o DPPG é estruturado em monocamadas depositadas alternadamente com algumas moléculas de PAH.⁵ Nos filmes *dipping* e *spray*-LbL o DPPG é estruturado em vesículas formando camadas alternadas com PAH. Porém, nos filmes *dipping*-LbL as vesículas de DPPG recobrem completamente a camada de PAH.³ A Figura 31a e 31b apresentam uma ilustração da arquitetura molecular para os filmes *dipping* e *spray*-LbL de PAH/DPPG, respectivamente. A Figura 31c mostra a arquitetura molecular de uma monocamada LB de DPPG enquanto a Figura 31d a arquitetura dos filmes LB de (PAH+DPPG).

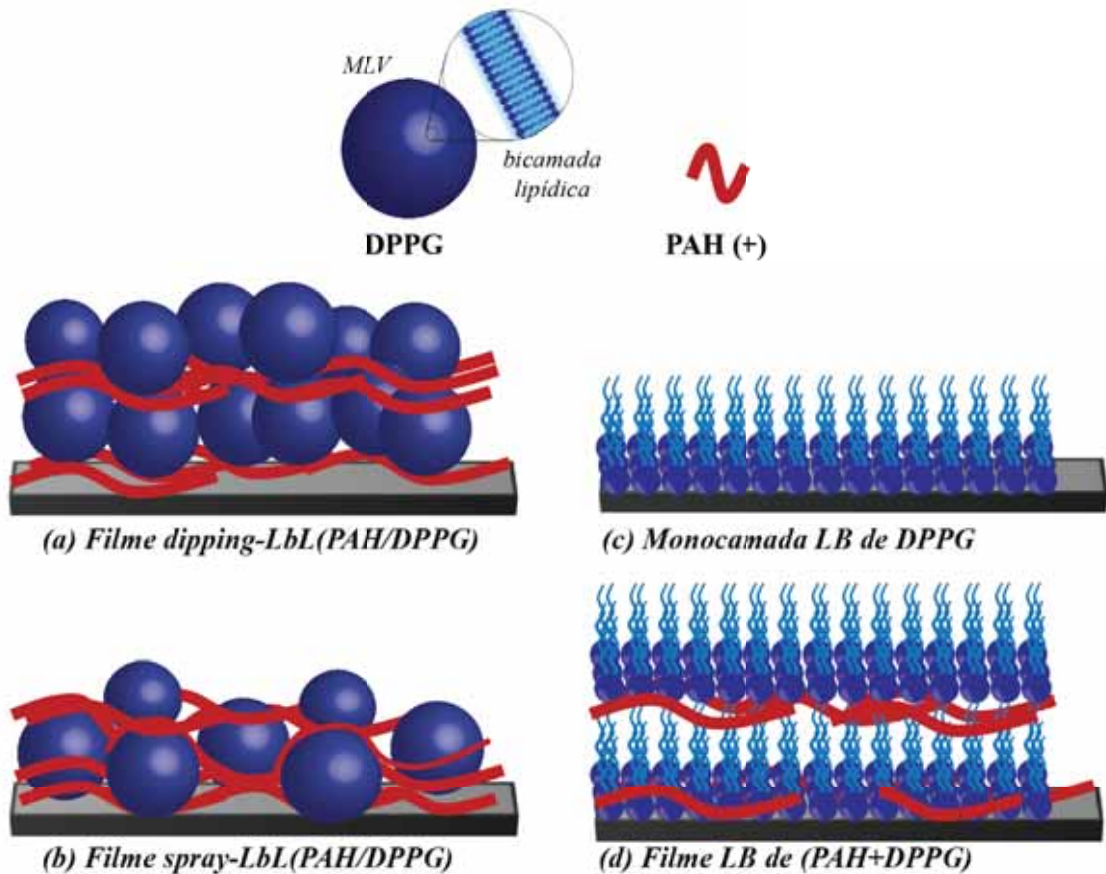


Figura 31: arquitetura molecular para os filmes *dipping*- (a) e *spray*-LbL (b) de PAH/DPPG contendo o fosfolípido DPPG estruturado em vesículas multilamelares (MLV). Arquitetura molecular para (c) monocamadas LB de DPPG e multicamadas LB contendo (PAH+DPPG).

A Figura 32 exibe as curvas de capacitância em função da frequência da tensão alternada coletadas para cada unidade sensorial em soluções de eosina com concentrações de 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L, além das medidas em água ultrapura.

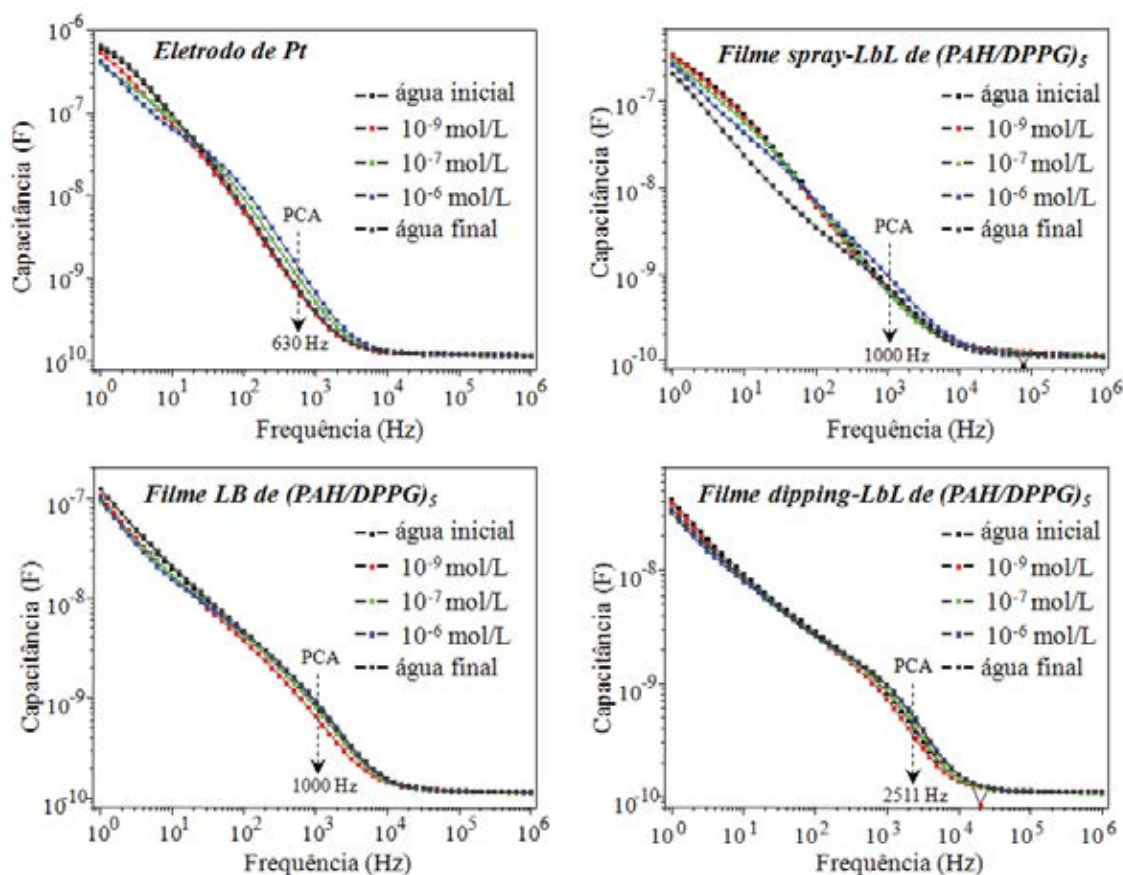


Figura 32: medidas de espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) coletadas para diferentes unidades sensoriais em água ultrapura antes e após a imersão em diferentes concentrações de solução de eosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L).

Algumas características podem ser extraídas: i) em contraste com o eletrodo de Pt sem recobrimento, diferenças são observadas nas curvas de capacitância, revelando o efeito do filme sobre a resposta elétrica dos eletrodos interdigitados. Isto fica ainda mais claro na Figura 33, onde são mostradas as curvas de capacitância vs frequência obtidas para todas as unidades sensoriais imersas em água ultrapura. A inserção da Figura 33 apresenta um circuito elétrico equivalente adaptado de Taylor *et al.*¹⁰⁰, que descreve as características elétricas de um eletrodo metálico recoberto com um material fracamente condutor imerso em um eletrólito. De acordo com o modelo,¹⁰⁰ de 50 a 100 Hz a resposta é basicamente governada pela dupla camada formada na interface eletrodo/eletrólito. De 10^2 a 10^5 Hz a resposta depende fortemente das propriedades dos filmes.

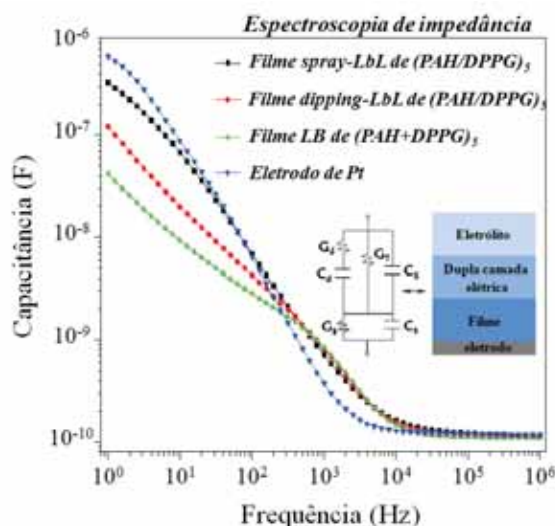


Figura 33: medidas de capacitância vs frequência para eletrodos interdigitados de Pt recobertos com filmes LB, *dipping* e *spray*-LbL imersos em água ultrapura. A inserção mostra um circuito elétrico equivalente que modela o sistema eletrodo/filme/dupla camada/eletrolito, onde C_g é a capacitância geométrica do eletrodo, C_d e G_d estão relacionados aos efeitos de dupla camada na interface eletrodo / eletrólito, G_t representa processos de transferência de carga, e C_b e G_b representa o filme que recobrem o eletrodo.

Para frequências superiores a 10^5 Hz a resposta é basicamente dominada pela geometria do eletrodo¹⁰⁰ e a constante dielétrica do meio.¹³⁸ ii) Diferenças também são observadas entre as unidades sensoriais quando imersas em água ultrapura ou mesmo em concentrações muito baixas de eosina ($\sim 10^{-9}$ mol/L). O perfil das curvas de capacitância é o principal parâmetro afetado,

o que aponta para as diferentes arquiteturas moleculares obtidas pelas diferentes técnicas de fabricação de filmes finos (LB, *dipping* e *spray*-LbL). iii) Foi observado, a partir das medidas em água ultrapura, que as curvas de capacitância são muito próximas antes e depois de expor as unidades sensoriais a

soluções de eosina, sugerindo uma interação fraca entre a eosina e as unidades sensoriais.

Os dados obtidos foram ainda avaliados de modo a identificar a contribuição de cada uma das unidades sensoriais na capacidade de distinção. A Figura 34 mostra o gráfico onde os dados de capacitância da Figura 32 foram tratados utilizando a projeção multidimensional Sammon.¹⁰⁹ A resposta elétrica de cada unidade sensorial para cada solução analisada é plotada individualmente, demonstrando a capacidade de distinção das soluções de eosina para cada sensor. As cores dos círculos identificam a unidade sensorial. Considerando que quanto maior a proximidade dos círculos maior a similaridade das respostas elétricas, observa-se que as unidades sensoriais compostas por filmes LbL (*dipping* e *spray*) são mais semelhantes

entre si do que o filme LB e o eletrodo de Pt sem recobrimento, complementar ao observado em (ii).

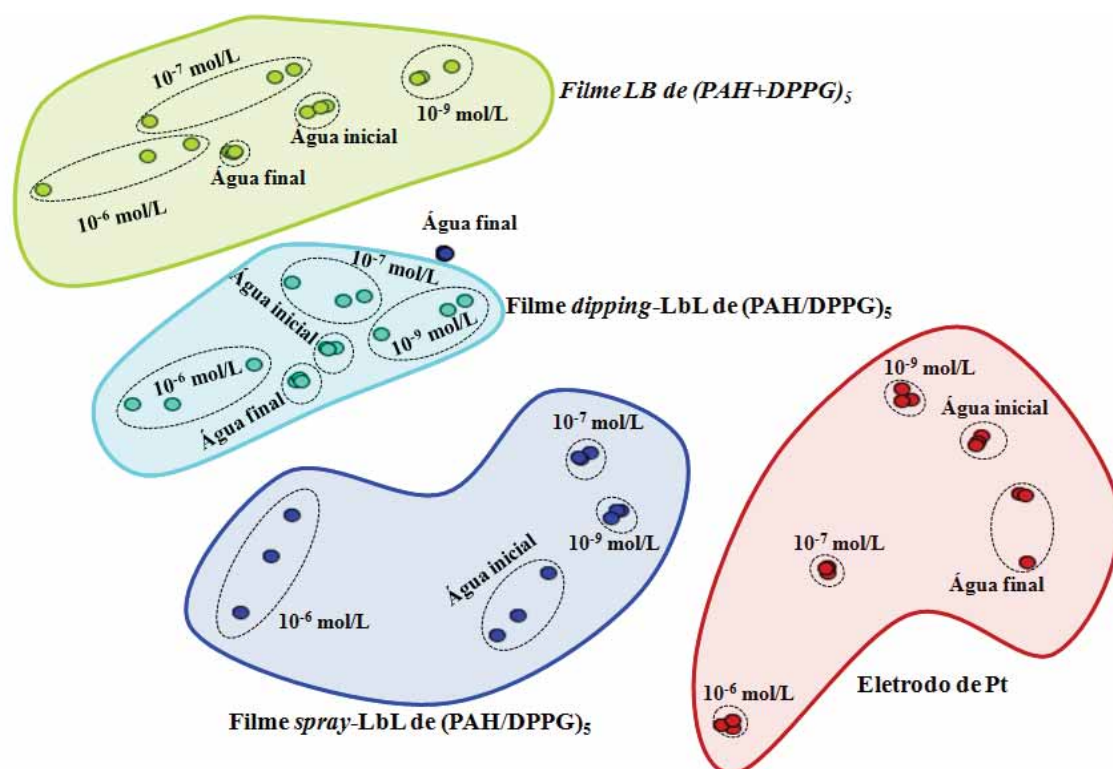


Figura 34: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de solução de eosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores destacadas.

A alta sensibilidade esperada a partir das curvas de capacitância na Figura 32 também foi confirmada pela análise de componentes principais (PCA).¹³⁹ Os PCAs foram plotados tomando valores de capacitância em uma frequência fixa para cada uma das unidades sensoriais.³⁻⁵ A frequência escolhida para as curvas de capacitância está geralmente na região governada pelas propriedades dos filmes finos (10^2 - 10^5 Hz), onde a capacitância tem maior variação com as concentrações das soluções. A Figura 35a mostra o PCA plotado levando em consideração os valores de capacitância para todas as unidades sensoriais. As frequências nas quais foram coletados os valores de capacitância para cada uma das unidades sensoriais são exibidas pelas linhas tracejadas na Figura 32. Uma distinção das soluções de eosina e água ultrapura foi encontrada, assim como uma correlação entre PC1 e as concentrações das

soluções de eosina. Os *clusters* de eosina mais concentrados foram deslocados para a direita do eixo de PC1, enquanto as águas iniciais e finais ficaram próximas umas das outras. Além disso, a Figura 35b mostra um gráfico de *loading*, que exibe as unidades sensoriais em um gráfico 2D de acordo com suas semelhanças. Quanto mais próximas as unidades sensoriais em um gráfico de *loading*, maior a similaridade em termos de suas respostas elétricas. Observa-se que as unidades sensoriais compostas por filmes LbL (*dipping* e *spray*) são mais semelhantes entre si do que o filme LB e o eletrodo de Pt sem recobrimento. Este resultado destaca o efeito da arquitetura molecular neste tipo de sensor, o que é consistente com o que foi discutido para as Figuras 33 e 34.

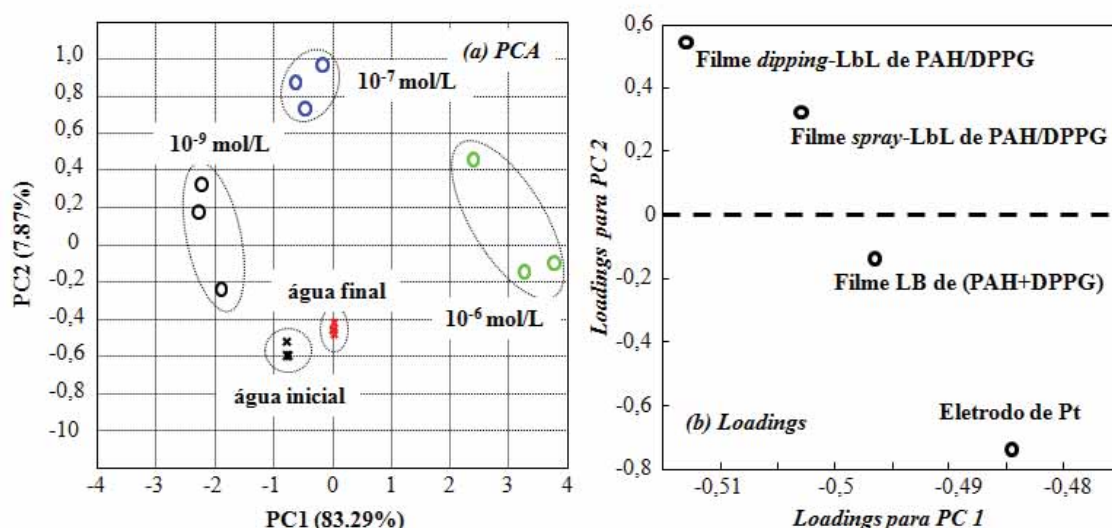


Figura 35: (a) PCA plotado considerando os resultados de todas as unidades sensoriais. (b) Loadings para PC1 vs PC2.

6.2. Detecção de eritrosina

Eritrosina em solução aquosa foi detectada por unidades sensoriais fabricadas com filmes *dipping*- e *spray*-LbL de DODAB/DPPG depositados sobre os eletrodos interdigitados de Pt. Para efeito de comparação, também foram utilizados eletrodos de Pt sem recobrimento e recobertos com filmes *dipping*-LbL de PAH/PSS, *dipping*- e *spray*-LbL de PAH/DPPG. Além do efeito da arquitetura molecular, esse conjunto de sensores permite avaliar o efeito dos materiais (polieletrólitos e lipídios) utilizados sobre a resposta de impedância. Devido às propriedades elétricas de interfaces sólido/líquido serem altamente sensíveis a qualquer mudança no meio líquido, a incorporação de quantidades crescentes de eritrosina causou alterações nas curvas de capacitância vs frequência, tal como indicado na Figura 36.

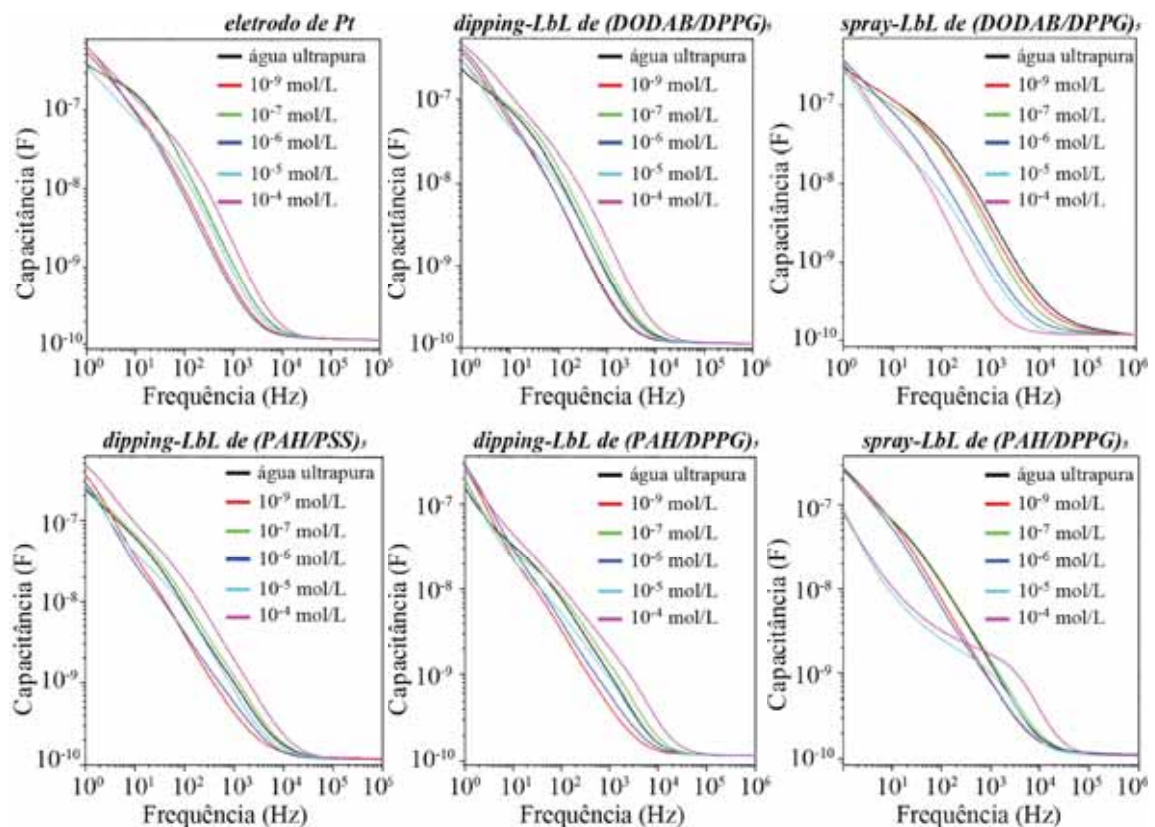


Figura 36: espectroscopia de impedância (capacitância vs frequência) coletada para unidades sensoriais distintas imersas em água ultrapura e soluções de eritrosina em diferentes concentrações (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} mol/L).

A inspeção visual dos dados da Figura 36 aponta para habilidades distintas das diferentes unidades sensoriais em detectar eritrosina. Isso pode ser visualizado de forma mais clara na projeção multidimensional Sammon¹⁰⁹ da Figura 37, onde são apresentados apenas os dados para as concentrações mais diluídas, por serem as mais difíceis de distinguir. Significativamente, a unidade sensorial contendo o filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG é superior às demais, uma vez que as distâncias entre os conjuntos de diferentes concentrações de eritrosina são muito maiores do que para as outras unidades sensoriais.

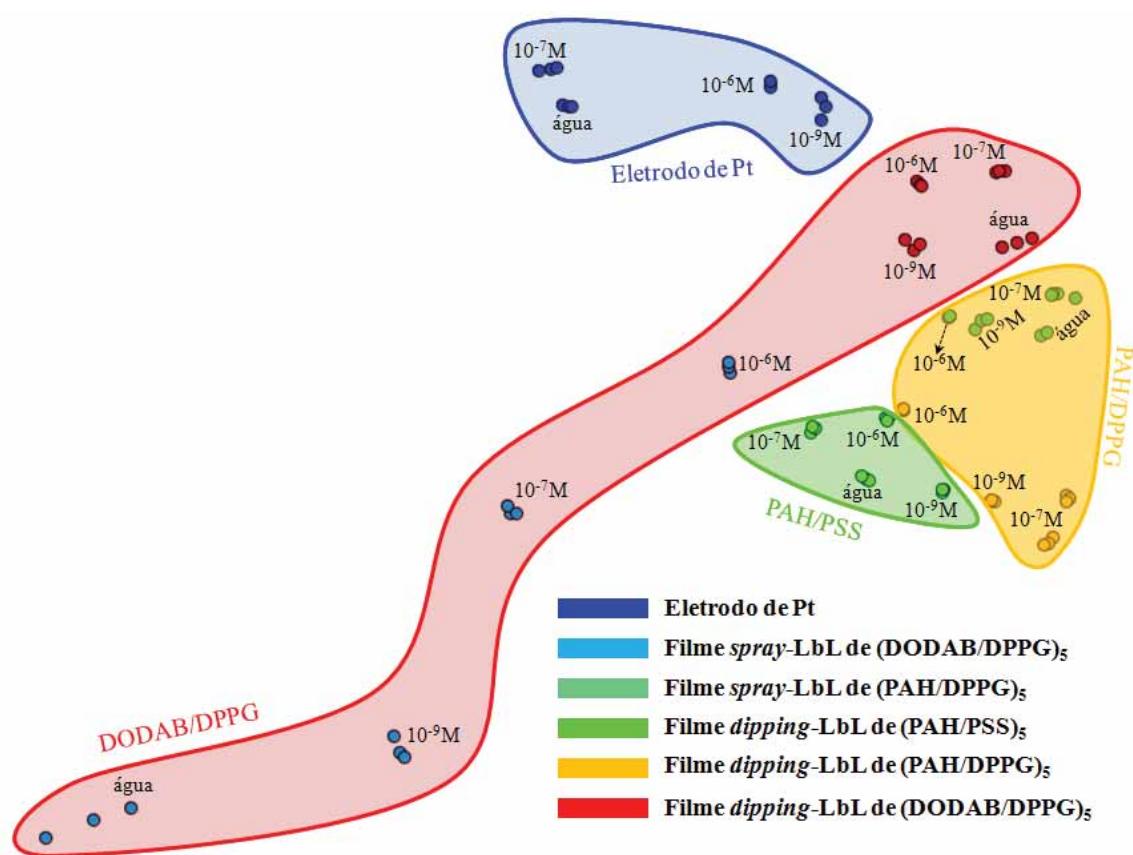


Figura 37: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de solução de eritrosina (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores na inserção.

As diferenças resultantes das distintas arquiteturas moleculares são corroboradas pelos PCAs obtidos com valores de capacitância tomados em uma frequência fixa para cada unidade de detecção (1 kHz), à semelhança de trabalhos anteriores.^{2, 4-5, 99} A Figura 38a mostra um gráfico de PCA em que a resposta combinada das unidades sensoriais, pôde

distinguir soluções de eritrosina até 10^{-9} mol/L. De modo a avaliar a importância de cada unidade sensorial para a elevada sensibilidade global, um teste empírico foi feito onde PCAs foram obtidos através da eliminação de uma das unidades sensoriais.^{2-3, 5} Os gráficos foram ligeiramente afetados quando excluídas as unidades sensoriais formadas pelos filmes *dipping*-LbL de PAH/DPPG, PAH/PSS e DODAB/DPPG (resultados não mostrados). No entanto, os PCAs foram significativamente afetados pela remoção do filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG, como mostrado na Figura 38b, seguido pelo filme *spray*-LbL de PAH/DPPG (resultado não apresentado). De fato, mais de 99% dos dados são explicados por PC1 e PC2 quando a unidade sensorial formada pelo filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG é removida. Este aumento na correlação entre PC1 e PC2, em relação aos PCAs obtidos considerando todas as unidades sensoriais (Figura 38a), indica que a unidade sensorial composta pelo filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG apresenta maior dispersão dos dados de capacitância. Este último está de acordo com os gráficos de *loadings* exibidos na Figura 38c e 38d.^{4, 99} Verifica-se que as unidades sensoriais constituídas pelos filmes *spray*-LbL de DODAB/DPPG e PAH/DPPG são as unidades sensoriais mais diferentes em relação às demais. Além disso, há uma tendência das unidades sensoriais serem agrupadas de acordo com a técnica empregada na fabricação dos filmes (*dipping*- ou *spray*-LbL filmes), destacando-se o efeito da arquitetura molecular. A Figura 38d mostra uma região ampliada, onde todas as unidades sensoriais compostas por filmes *dipping*-LbL são agrupadas.

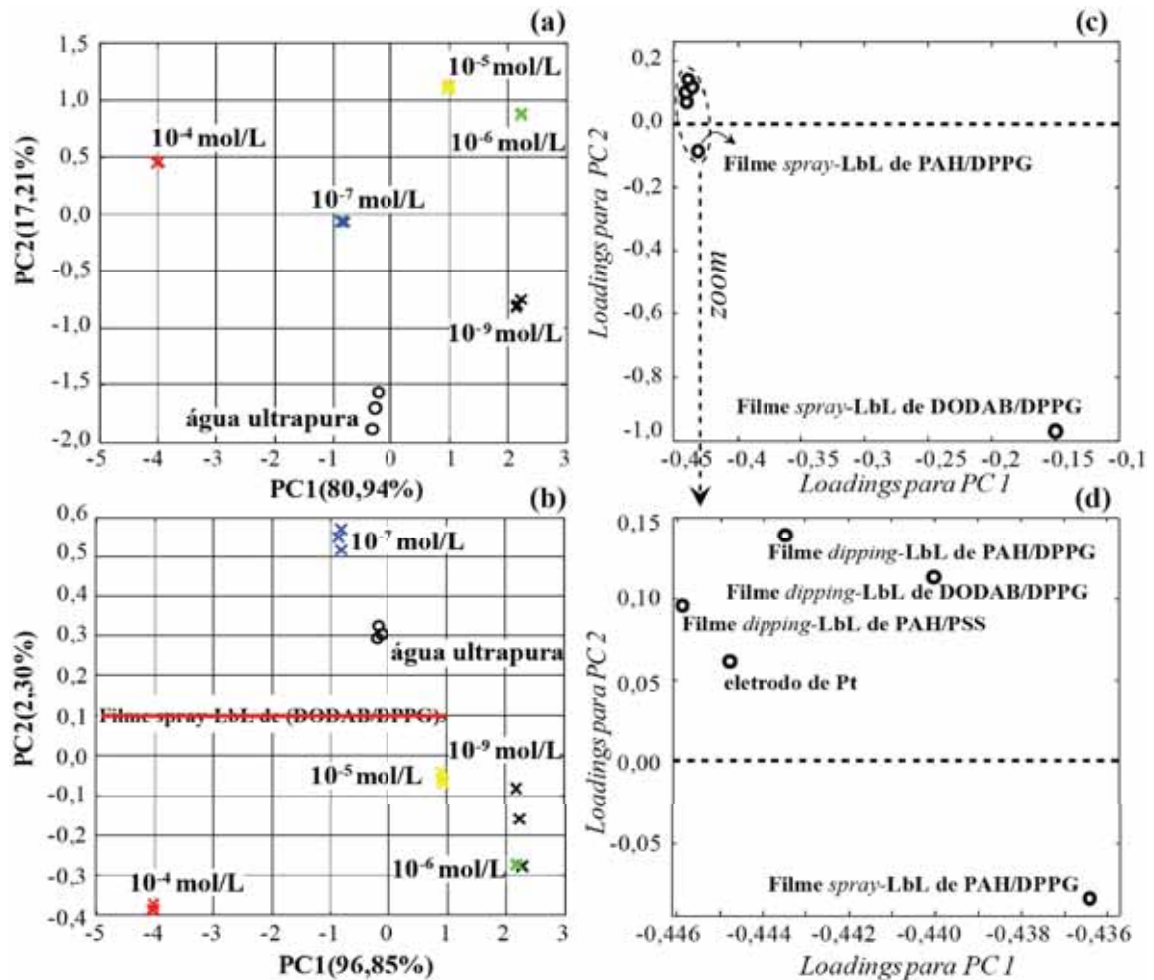


Figura 38: PCA plotado para valores de capacidade coletados a 1kHz para (a) todas as unidades sensoriais e (b) excluindo a unidade sensorial formada pelo filme *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)₅. (c) *Loadings* de PC1 e PC2; (d) *zoom* da região circulada pela linha tracejada em (c).

A resposta das várias unidades sensoriais foram combinadas em um sistema de língua eletrônica, tal como indicado nos resultados apresentados na Figura 38, onde as diferentes concentrações foram distinguidas, de forma semelhante aos resultados apresentados na Figura 37. No entanto, em experimentos de controle notamos que o espectro de impedância para a água ultrapura, depois de uma série de medições em soluções de eritrosina, não retornou aos valores originais. Isto significa que os filmes foram afetados pela eritrosina de forma que até mesmo vários processos de lavagem não foram suficientes para limpar os eletrodos.

A razão para as mudanças irreversíveis na resposta elétrica das unidades sensoriais deve estar relacionada à adsorção de moléculas de eritrosina sobre os filmes, à semelhança de relatos na literatura para outros analitos.^{3-5, 99, 140} Esta hipótese foi confirmada com mapeamentos micro-Raman feitos antes e após as unidades sensoriais serem expostas a soluções de eritrosina. Domínios sobre a superfície dos filmes foram encontrados em todas as unidades sensoriais, como mostrado pela microscopia óptica na Figura 39a para a unidade sensorial formada pelo filme *spray*-LbL de DODAB/DPPG. A identificação química dos domínios foi feita pela sobreposição de um mapeamento Raman à microscopia óptica na Figura 39b. O mapeamento foi obtido através de espectros coletados ponto a ponto ao longo de uma área de 80 μm x 80 μm , com passo de 2 μm , que leva a um total de 1681 espectros. A intensidade da banda em 1500 cm^{-1} (estiramento C = C) foi plotada ao longo da área mapeada, onde regiões mais claras referem-se a intensidades mais elevadas. Os espectros Raman coletados são atribuídos à eritrosina,¹⁴¹⁻¹⁴² consistente com o espectro coletado para o pó da eritrosina exibido pela Figura 39c. É importante ressaltar que o DODAB e DPPG possuem baixas secções de choque para o espalhamento Raman utilizando a linha de laser em 633 nm e não apresentam espectros detectáveis para estes filmes finos.^{3, 99, 119, 143}

A intensidade da banda Raman em 1500 cm^{-1} para o domínio micrométrico de eritrosina segue a distribuição espacial do domínio de acordo com a de imagem óptica, ou seja, o sinal Raman é mais forte onde o domínio de eritrosina é claramente visto na imagem óptica. Portanto, esta mudança morfológica na superfície dos filmes induzida pela adsorção de moléculas de eritrosina é responsável tanto pela alta sensibilidade atingida pelas unidades sensoriais quanto pelas alterações irreversíveis na resposta elétrica. No caso do sistema de detecção utilizado na seção anterior (seção 6.1.) a adsorção de moléculas de eosina sobre os filmes que compõem as unidades sensoriais também é observada. Porém, essa adsorção é menos intensa do que o observado para as moléculas de eritrosina, possibilitando respostas

elétricas reversíveis após a lavagem das unidades sensoriais. Essa diferença deve estar relacionada às concentrações das soluções que as unidades sensoriais foram expostas. As soluções mais concentradas de eritrosina (10^{-4} mol/L) devem proporcionar uma maior interação com os filmes, aumentando o efeito de adsorção sobre as unidades sensoriais.

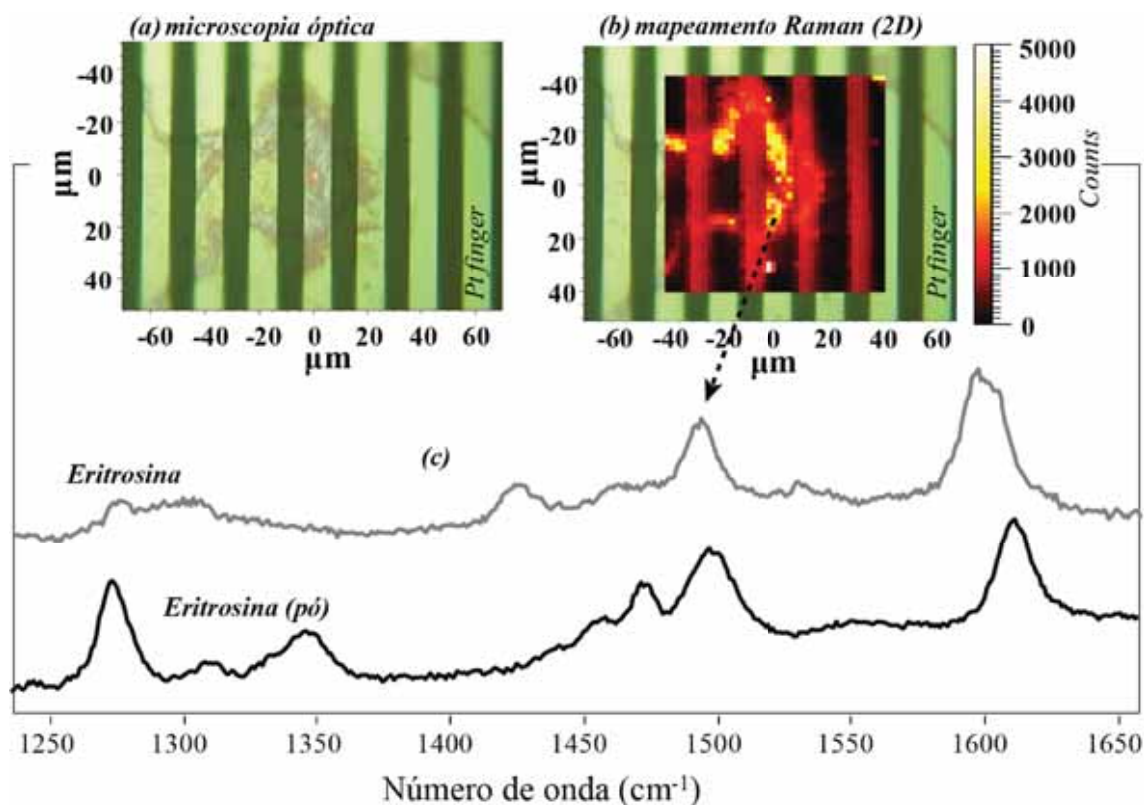


Figura 39: (a) imagem óptica e (b) mapeamento Raman de área (sobrepota) coletado para a unidade sensorial composta pelo filme *spray*-LbL de (DODAB/DPPG)₅ após a exposição a soluções de eritrosina. (c) Espectro Raman da eritrosina extraído da área mapeada mostrado em (b). Na parte inferior é dado um espectro Raman coletado para o pó da eritrosina. Todos os espectros foram obtidos usando a linha de laser em 633nm.

6.3. Detecção de catecol

A forte dependência da matriz para imobilização de enzimas em biossensores é conhecida. Porém, quantificar a importância relativa dos diferentes componentes do filme ainda é um desafio. Nesta seção relatamos arquiteturas moleculares obtidas pela técnica *dipping*-LbL, utilizadas na detecção de catecol por medidas de espectroscopia de impedância. Um conjunto de sensores foi fabricado com filmes *dipping*-LbL de materiais distintos, a fim de otimizar a sensibilidade de biossensores. Em particular, foi comparado o desempenho de dois tipos de arquiteturas moleculares, uma das quais inclui uma enzima capaz de interações específicas com catecol. A importância da detecção de catecol já foi destaque na literatura, como compostos fenólicos amplamente utilizados na proteção da madeira, têxteis, herbicidas e pesticidas,¹⁴⁴⁻¹⁴⁵ além de ser um potencial poluente de água.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ A enzima escolhida foi a tirosinase (Tyr), que é conhecida por ser eficaz na detecção de compostos fenólicos, tais como catecol, clorofenol e fenol.¹⁴⁵ A fim de atingir alto desempenho, a Tyr foi imobilizada sobre filmes LbL contendo vesículas lipídicas de DODAB e DPPG, já apresentados nas seções anteriores. Além de demonstrar uma maior sensibilidade para os biossensores, possível com a utilização de métodos de visualização de informação^{110, 147} para processar os dados de espectroscopia de impedância, discutimos como o desempenho dos biossensores pôde ser otimizado.

6.3.1. Imobilização otimizada de tirosinase (Tyr)

Em espectroscopia de impedância aplicada a filmes finos a interação do analito em solução com a camada superior do filme é um fator bastante relevante. Assim optou-se em adsorver Tyr apenas na última camada dos filmes LbL com o monitoramento via adsorção de massa. Após a imobilização da Tyr, os filmes LbL foram lavados utilizando tanto água ultrapura quanto solução tampão, como mostrado na Figura 40. Observou-se que 100% de Tyr é removida do filme LbL de (PAH/PSS)₅/Tyr quando lavado em água ultrapura (Figura

40a). Por outro lado, 45% (em massa) de Tyr permanece no filme LbL de $(\text{PAH/PSS})_5/\text{Tyr}$ quando lavado em solução tampão (Figura 40b). Esta última pode aumentar para 60% de massa remanescente de Tyr, se imobilizada sobre PAH, formando um filme LbL de $(\text{PAH/PSS})_5/\text{PAH}/\text{Tyr}$ (Figura 40c). Substituindo PSS por DPPG, ou seja, em um filme LbL de $(\text{PAH/DPPG})_5/\text{PAH}/\text{Tyr}$, a massa remanescente de Tyr atingiu 80%, como mostrado na Figura 41a. Uma ligeira diminuição para 75% foi observada substituindo o PAH por DODAB no filme LbL de $(\text{DODAB/DPPG})_5/\text{DODAB}/\text{Tyr}$, como mostrado na Figura 41b.

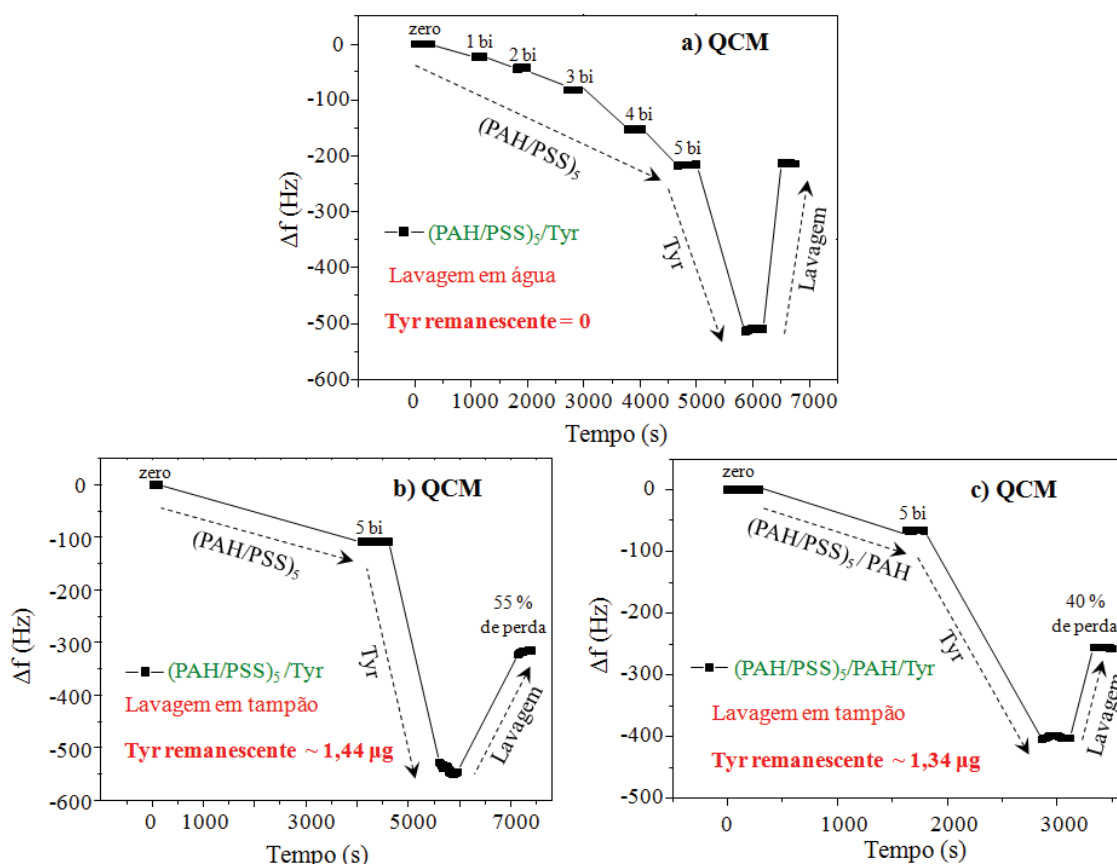


Figura 40: dados de QCM para (a) filme LbL contendo até 5 camadas de $(\text{PAH/PSS})_5/\text{Tyr}$, lavado com água ultrapura após a imobilização de Tyr. Filmes LbL contendo 5 bicamadas de (b) $(\text{PAH/PSS})_5/\text{Tyr}$ e (c) $(\text{PAH/PSS})_5/\text{PAH}/\text{Tyr}$, ambos lavados em solução tampão.

A grande diferença de massa entre os dados nas Figuras 40a, 40b e 40c se deve aos procedimentos utilizados para representar graficamente os dados. Na Figura 40a, a massa foi medida a cada bicamada, de modo que o filme teve de ser seco a cada medida. Nas Figuras

40b e 40c, o filme LbL foi crescido ininterruptamente e ao final da 5ª bicamada foi então seco para a medida de massa.

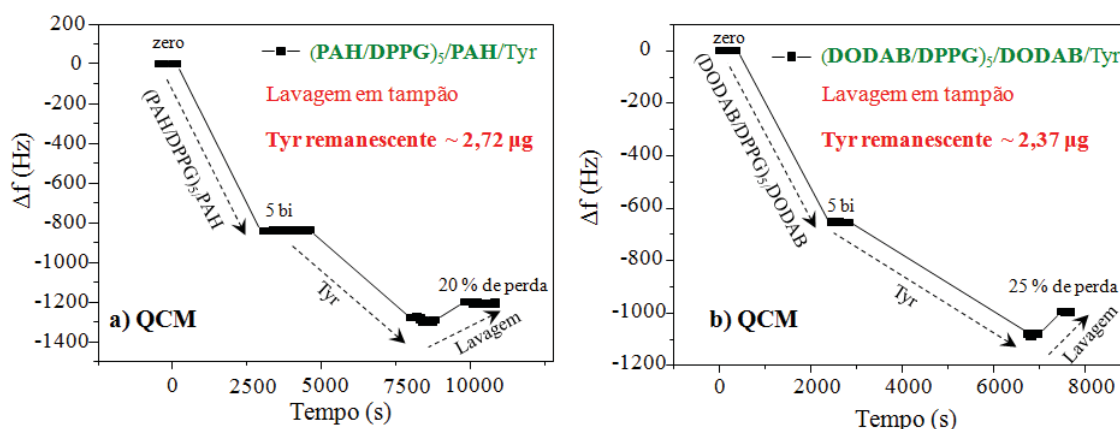


Figura 41: dados de QCM para filmes LbL contendo 5 bicamadas de (a) $(\text{PAH/DPPG})_5/\text{PAH/Tyr}$ e (b) $(\text{DODAB/DPPG})_5/\text{DODAB/Tyr}$, ambos lavados em solução tampão após a imobilização de Tyr.

A eficácia do processo de adsorção da Tyr e a sua estabilidade no filme LbL dependem claramente da escolha de arquiteturas moleculares, além do pH das soluções de lavagem. Essa dependência está relacionada a interações eletrostáticas entre os polieletrólitos, DPPG e Tyr, cujo ponto isoeletrico está em torno de 4,7 – 5.¹⁴⁸ Dessa forma, em pH 6,2 (água ultrapura) a Tyr está carregada negativamente. Em pH 7,1 (tampão) a Tyr está ainda mais carregada negativamente, enquanto o PAH está altamente ionizado em ambos os pHs (6,2 e 7,1).¹⁴⁹ No entanto, as interações secundárias certamente devem ter um papel a fim de permitir a imobilização de Tyr carregada negativamente sobre PSS ou DPPG. A Figura 42 ilustra a arquitetura molecular dos filmes $(\text{PAH/PSS})_5/\text{PAH/Tyr}$, $(\text{PAH/DPPG})_5/\text{PAH/Tyr}$ e $(\text{DODAB/DPPG})_5/\text{DODAB/Tyr}$, aplicados posteriormente como biossensores.

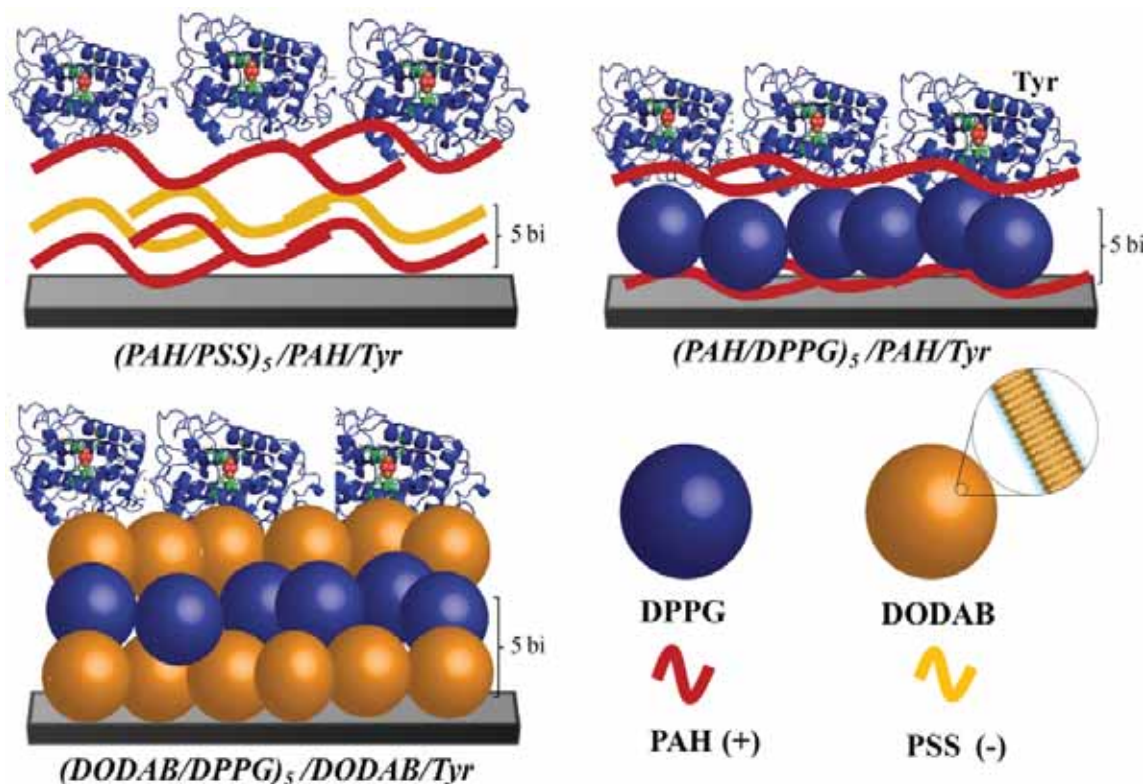


Figura 42: arquiteturas moleculares propostas para os filmes LbL contendo Tyr, sempre imobilizada sobre a última camada dos filmes.

6.3.2. Efeito da matriz para imobilização de enzimas em biossensores

A Figura 43 exibe as curvas de capacitância vs frequência para o eletrodo de Au e as unidades sensoriais $(PAH/PSS)_5/PAH/Tyr$, $(PAH/DPPG)_5/PAH/Tyr$, $(DODAB/DPPG)_5/DODAB/Tyr$ imersas em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L) e em solução tampão. A inspeção visual da Figura 43 não permite inferir se é possível distinguir as amostras com diferentes concentrações de catecol. A capacidade de distinção é demonstrada pelo tratamento dos dados de capacitância da Figura 43, utilizando a técnica de projeção multidimensional IDMAP,¹⁵⁰ cujos resultados são apresentados na Figura 44.

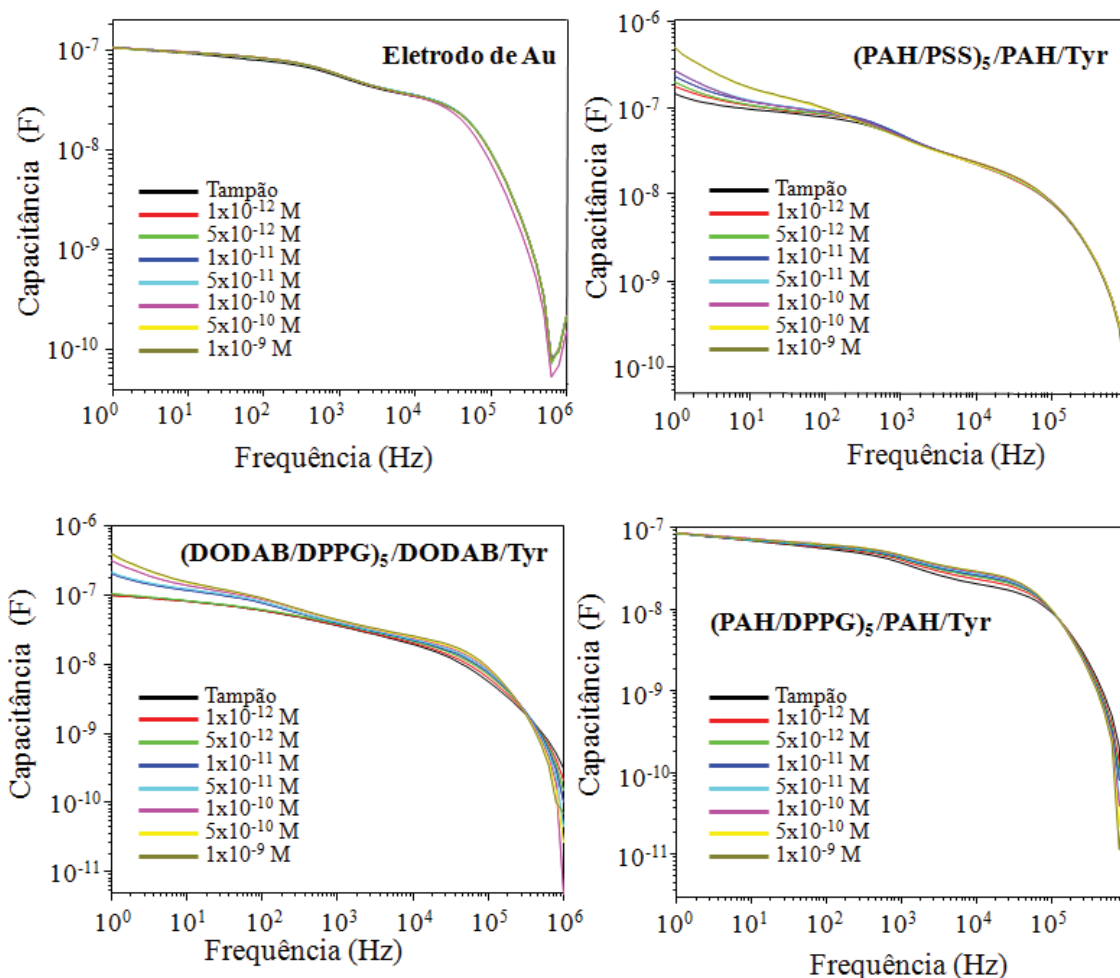


Figura 43: curvas de capacitância (real) vs frequência obtidas para o eletrodo de Au e as unidades sensoriais formadas pelos filmes LbL de (PAH/PSS)₅/PAH/Tyr, (PAH/DPPG)₅/PAH/Tyr e (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr, imersos em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L) e em solução tampão. Os experimentos foram realizados partindo sempre da menor para a maior concentração.

Fica claro que a língua eletrônica pode facilmente distinguir as soluções de catecol até o limite de 10^{-12} mol/L. Ao nosso conhecimento, esta é a menor concentração de catecol já detectada. Em uma busca na literatura encontramos relatos de sensores eletroquímicos com detecção de catecol na faixa de 10^{-3} mol/L até 10^{-10} mol/L.^{146, 151-152} No trabalho de Zucolotto *et al.*,¹⁴⁶ medidas de absorção óptica e espectroscopia de impedância foram utilizadas para diferenciar concentrações da ordem de 10^{-10} mol/L de catecol. A diferença entre o último trabalho¹⁴⁶ e este está na otimização da arquitetura molecular dos filmes utilizados nos

biossensores, além do processamento dos dados de espectroscopia de impedância, que passam a levar em consideração a curva toda de capacitância ao invés de um único ponto.

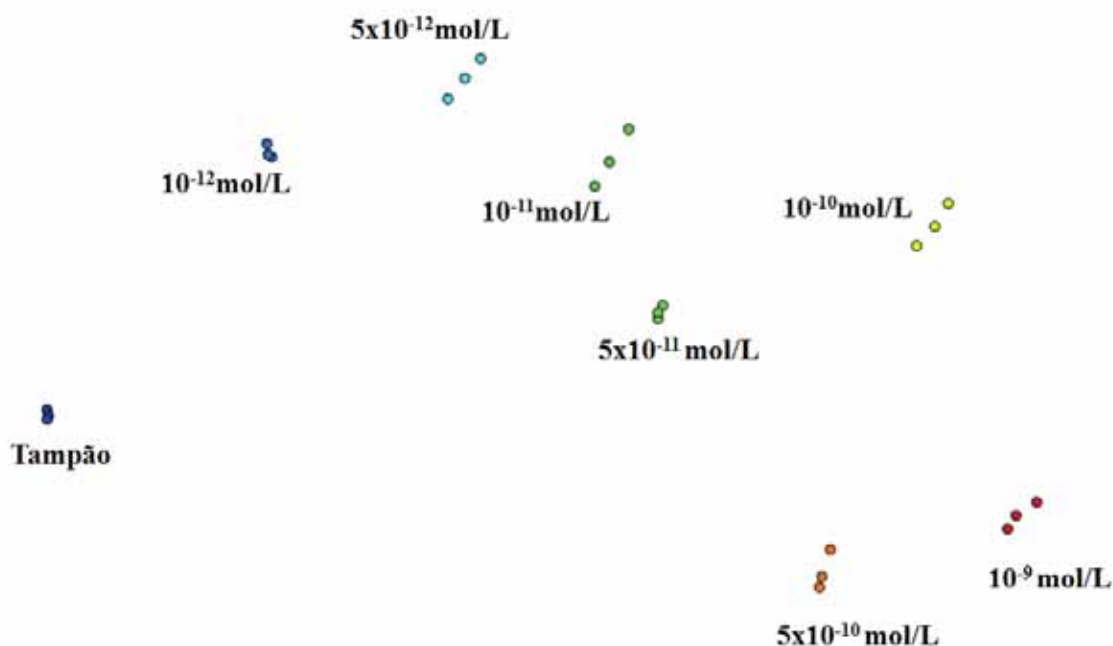


Figura 44: projeção multidimensional IDMAP agrupando os resultados por diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L), considerando os dados medidos com todas as unidades sensoriais.

Os dados obtidos foram ainda avaliados de modo a identificar a contribuição de cada uma das unidades sensoriais na capacidade de distinção, o que é importante para otimizar o conjunto de sensores. A Figura 45 mostra o gráfico onde os dados de capacitância da Figura 43 foram tratados utilizando a projeção multidimensional Sammon.¹⁰⁹ As respostas elétricas de cada unidade sensorial para cada solução analisada são plotadas individualmente. As cores dos círculos identificam a unidade sensorial. Considerando que quanto maior a proximidade dos círculos, maior a similaridade das respostas elétricas, a melhor capacidade de distinção é exibida pela unidade sensorial formada pela matriz lipídica, filme LbL de (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr, tendo em vista que os círculos vermelhos estão mais espalhados no diagrama. Em contraste, o eletrodo de Au não foi capaz de distinguir as soluções, como esperado (ver círculos azuis). Estes resultados confirmam a importância não

só dos filmes ultrafinos depositados sobre os eletrodos interdigitados, mas também as características das moléculas que constituem a matriz onde a biomolécula é imobilizada.

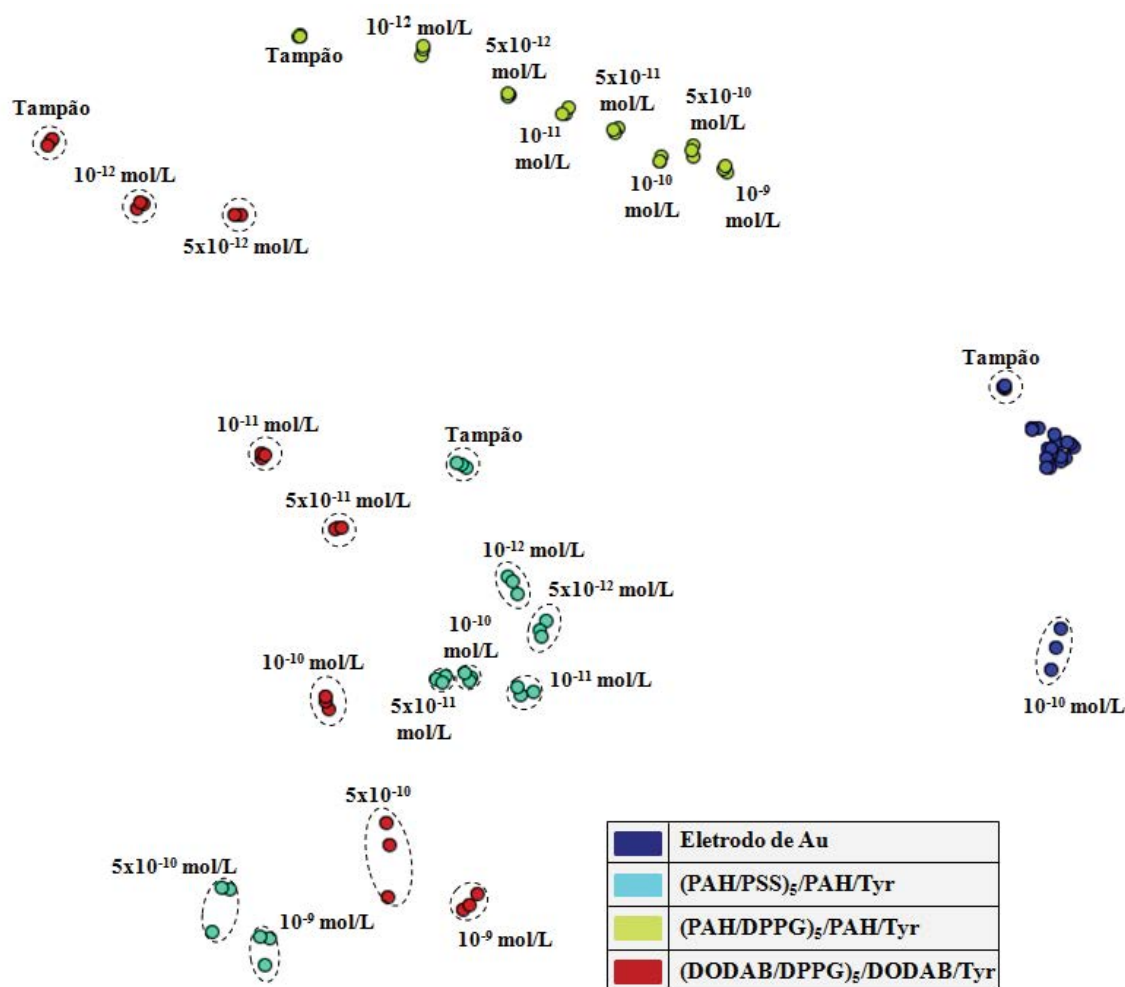


Figura 45: mapeamento Sammon para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-9} mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores na inserção.

A importância da matriz onde a enzima é imobilizada ainda foi investigada utilizando um novo conjunto de unidades sensoriais (chamado de conjunto 2), uma vez mais utilizando catecol como o analito de interesse. A Figura 46 mostra as respostas elétricas (capacitância vs frequência) para um sensor e biossensor formados pelos filmes LbL de (DODAB/DPPG)₅/DODAB e (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr, respectivamente. A Figura 47 mostra o gráfico onde os dados de capacitância da Figura 46 foram tratados utilizando a projeção multidimensional IDMAP. No lado esquerdo do diagrama nota-se que a distinção

das várias amostras foi relativamente menos eficiente para o sensor, em comparação com a distinção mais eficaz obtida com biossensor, cujos dados aparecem no lado direito do diagrama. Dessa forma, a interação específica entre Tyr e catecol tende a conduzir a uma maior sensibilidade dos biossensores.

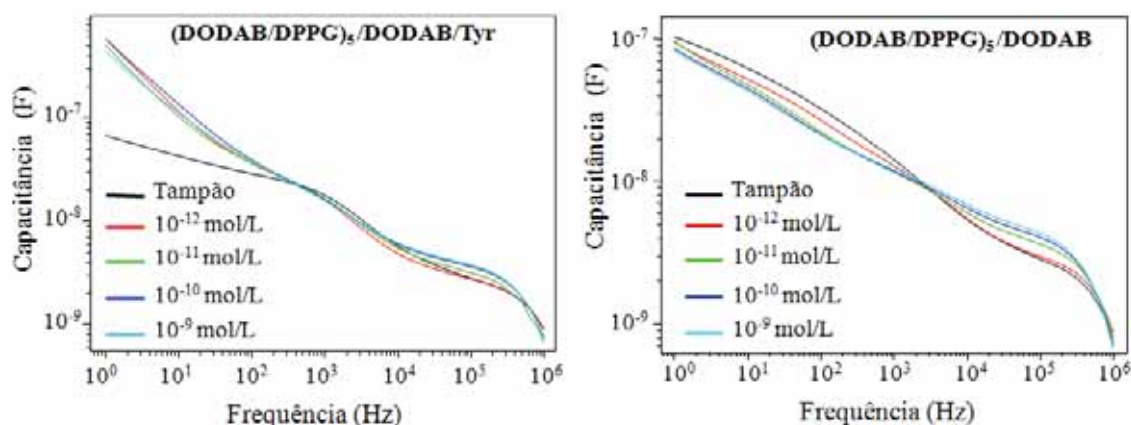


Figura 46: capacitância vs frequência para as unidades sensoriais $(\text{DODAB/DPPG})_5/\text{DODAB/Tyr}$ e $(\text{DODAB/DPPG})_5/\text{DODAB}$ imersas em diferentes concentrações de catecol (10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} mol/L), além da solução tampão.

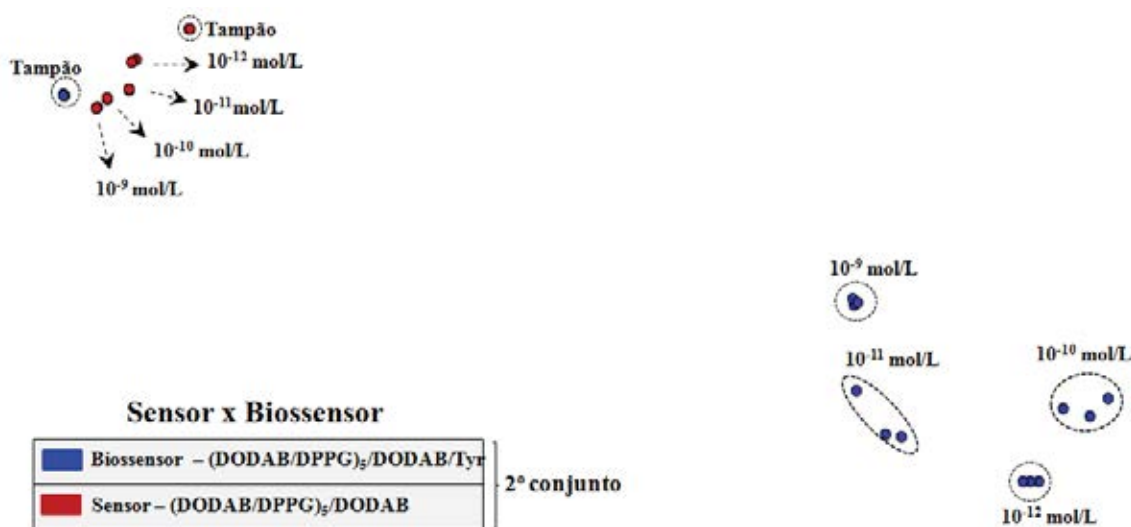


Figura 47: projeção multidimensional IDMAP considerando as unidades de detecção $(\text{DODAB / DPPG})_5/\text{DODAB/Tyr}$ e $(\text{DODAB / DPPG})_5/\text{DODAB}$.

O papel fundamental desempenhado pela matriz onde a enzima é imobilizada pode ainda ser analisada com a Figura 48, que mostra os dados de capacitância coletados para todas as unidades sensoriais previamente discutidas nesta seção (experimentos com conjuntos 1 e

2), projetadas por IDMAP. O desempenho das seguintes unidades sensoriais pôde ser comparado: eletrodo de Au, (DODAB/DPPG)₅/DODAB (duplicatas), (PAH/PSS)₅/PAH/Tyr, (PAH/DPPG)₅/PAH/Tyr e (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr (duplicatas).

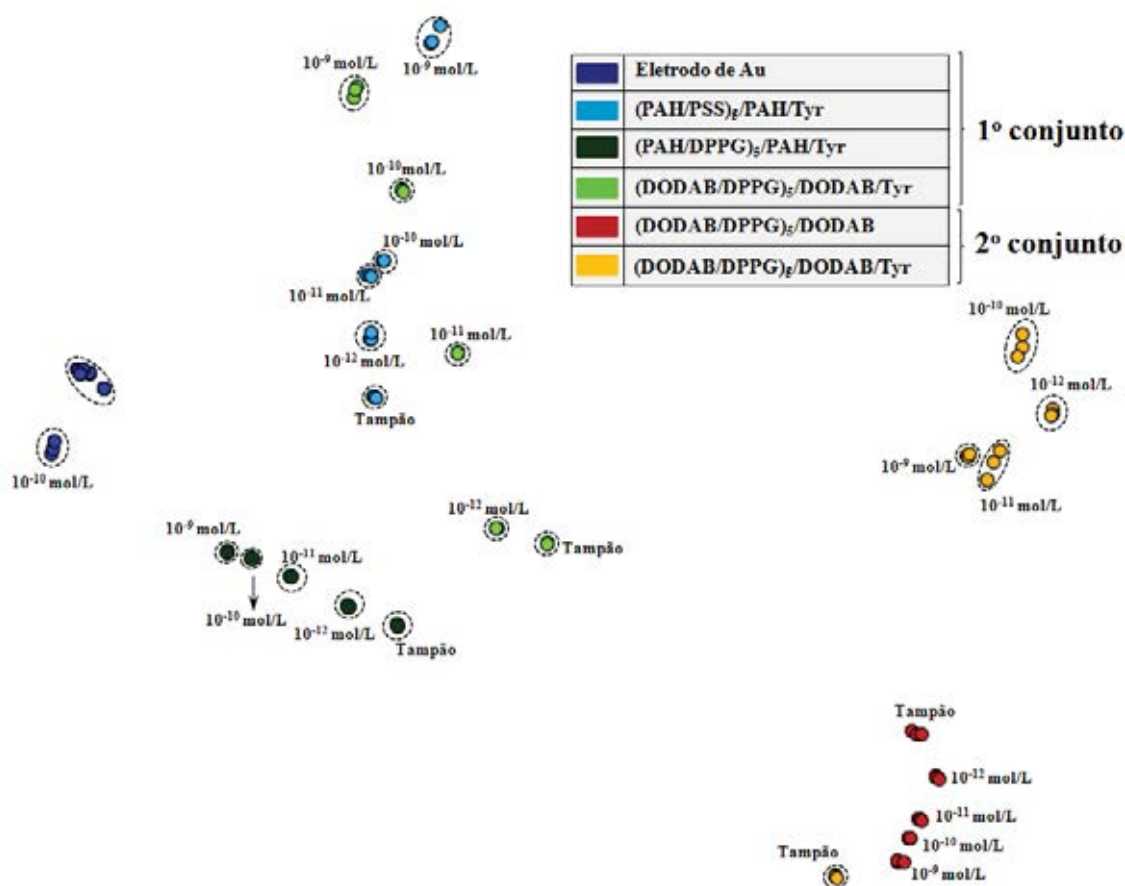


Figura 48: projeção multidimensional IDMAP para as medidas obtidas nos conjuntos de dados 1 e 2.

Os biossensores (DODAB/DPPG)₅/DODAB/Tyr apresentaram melhor desempenho, de acordo com as discussões anteriores. Outra característica importante é o desempenho similar do sensor com (DODAB/DPPG)₅/DODAB (vermelho) e o biossensor (PAH/PSS)₅/PAH/Tyr (azul claro). Apesar da presença de Tyr, sua estabilidade foi determinada baixa (seção 6.3.1), e, por conseguinte, o desempenho na detecção não foi significativamente melhor do que o filme LbL correspondente sem Tyr. O desempenho intermediário do biossensor (PAH/DPPG)₅/PAH/Tyr, que contém uma mistura de polieletrólito e de lipídios, é consistente com esta discussão.

Enquanto o melhor desempenho das unidades sensoriais contendo Tyr pode ser atribuído à interação específica com o catecol, as razões pelas quais a matriz também é relevante são mais difíceis de estabelecer. O fator mais importante é a preservação da atividade enzimática, e isto é altamente dependente da matriz. Por exemplo, a imobilização em filmes LbL tem sido amplamente explorada devido às condições mais brandas para a fabricação dos filmes e a retenção de água, que ajuda a preservar a atividade de biomoléculas (para uma revisão sobre este tema ver Siqueira *et al.*⁴⁹). De fato, em muitos casos a utilização de filmes LbL demonstrou ser superior a outros processos de imobilização.⁴⁹ Comparando as unidades sensoriais contendo Tyr imobilizados em matrizes distintas, foi observado um melhor desempenho para o filme LbL contendo uma matriz lipídica. As interações entre Tyr e os outros componentes dos filmes incluem interações eletrostáticas, ligações de H e forças hidrofóbicas que podem ocorrer para os polieletrólitos, bem como para os lipídios. A vantagem de matrizes lipídicas pode estar relacionada a um ambiente mais biologicamente favorável, mas a razão exata para esse efeito ainda não foi determinada. Outro processo de imobilização é a técnica de Langmuir-Blodgett (LB), onde as enzimas são incorporadas a matrizes lipídicas, também adequadas para a preservação de atividade.^{81-82, 153-155} No que diz respeito à arquitetura molecular, a otimização do desempenho pode ser alcançada com enzimas imobilizadas em todas as bicamadas do filme LbL¹⁵⁶ ou apenas na última camada.¹⁵⁷ No último caso,¹⁵⁷ a deposição de várias camadas de enzima dificulta a difusão do analito e o transporte de elétrons para o eletrodo em medidas eletroquímicas.

Capítulo 7

7. Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana biológica.

A investigação sobre filmes orgânicos nanoestruturados vem servindo a muitas finalidades, incluindo o desenho de superfícies funcionalizadas que podem ser aplicadas em dispositivos biomédicos, de engenharia de tecidos e para o estudo de processos fisiológicos dependendo da interação com as membranas celulares. De especial relevância são monocamadas de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUV), usadas para simular interfaces biológicas. A hidroperoxidação lipídica, um resultado metabólico natural da vida em oxigênio sob luz, é uma reação de oxidação proeminente em tratamentos de fotomedicina. Este capítulo aborda o estudo de interação entre o derivado xantênico eritrosina e sistemas miméticos de membrana biológica baseados em filmes de Langmuir e vesículas gigantes. Particularmente, serão investigados os efeitos microscópicos causados pela foto-oxidação lipídica em GUV gerada pela ação do xantênico.

7.1. Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana: filmes de Langmuir

Nesta seção, avaliamos as interações entre o derivado xantênico eritrosina com modelos de membrana baseados em filmes de Langmuir compostos por fosfolipídios espalhados na interface ar/água. Tendo vista que a fração lipídica da membrana biológica é formada por fosfolipídios com diferentes cadeias e caráter iônico, foram selecionados para o estudo fosfolipídios aniônicos e zwitteriônicos com cadeias alifáticas saturadas e insaturadas. Filmes de Langmuir formados por fosfolipídios saturados (DPPG/aniônico e DPPC/zwitteriônico) e insaturados (DOPG/aniônico e DOPC/zwitteriônico) foram fabricados na tentativa de verificar a sensibilidade das isothermas π -A a presença do xantênico eritrosina, adicionada em diversas concentrações a subfase aquosa. Por meio de deslocamentos nas isothermas é possível identificar mudanças no empacotamento das moléculas de fosfolipídios, nos seus diversos estágios de compressão, em função da concentração de xantênico. As Figuras 49a e 49b apresentam, respectivamente, as isothermas π -A de DPPG e DPPC fabricadas em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L. Estruturas moleculares dos fosfolipídios insaturados (DOPC e DOPG), saturados (DPPC e DPPG) e derivado xantênico (eritrosina) são reproduzidas na Figura 49c. A elevada solubilidade em água das moléculas de eritrosina não permite a formação de filmes de Langmuir quando somente as soluções do xantênico são comprimidas.

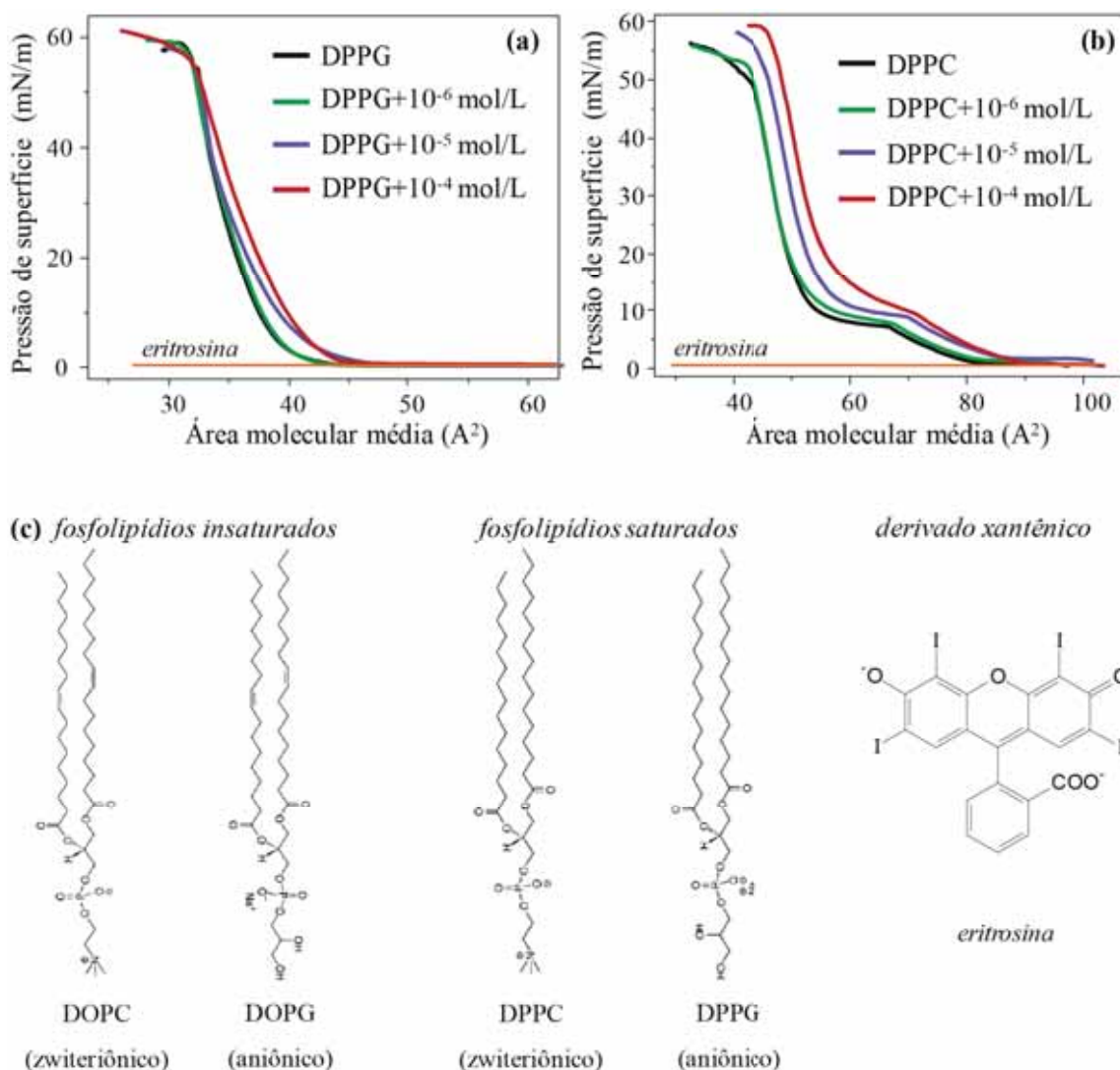


Figura 49: isotermas π -A de (a) DPPG e (b) DPPC em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L. (c) Estruturas moleculares dos fosfolípidios insaturados (DOPC e DOPG), saturados (DPPC e DPPG) e derivado xantênico (eritrosina).

De modo geral, pode-se observar que o aumento de concentração de eritrosina na subfase provoca um deslocamento das isotermas π -A para maiores áreas, resultante da interação entre as moléculas de fosfolípido e eritrosina. Este efeito torna-se significativo para concentrações acima de 10^{-4} mol/L e 10^{-5} mol/L considerando os filmes de DPPG e DPPC, respectivamente. No caso do DPPG, tal deslocamento é observado apenas quando os filmes de Langmuir se encontram em sua fase líquida, onde as moléculas de fosfolípidios não se encontram totalmente empacotadas. Uma vez que um elevado empacotamento molecular é

atingido, correspondente à fase condensada da monocamada, as isotermas π -A são coincidentes com aquelas coletadas sem a presença de eritrosina.

Segundo o trabalho de Batistela *et al.*¹⁵⁸ a eritrosina em pH 5,6 se encontra na forma dianiônica. Considerando o caráter aniônico do DPPG, a repulsão eletrostática existente entre estas moléculas é considerável, fazendo com que as moléculas de eritrosina não se liguem fortemente às moléculas dos fosfolipídios. A partir do momento em que a fase condensada é atingida, a pressão de superfície é suficiente para se sobrepor à interação entre eritrosina e fosfolipídios, fazendo com que as moléculas de eritrosina sejam expelidas da interface ar/água e, por consequência, as isotermas tendem a se sobrepor.

Considerando os filmes de Langmuir de DPPC (Figura 49b), o aumento da concentração de eritrosina na subfase resulta em deslocamentos mais significativos das isotermas π -A em direção a maiores áreas moleculares. A eritrosina pôde ser incorporada à monocamada não só em sua fase líquida, mas também em sua fase condensada, considerando concentrações superiores a 10^{-5} mol/L. Nesse caso, o grupo carregado positivamente (N^+) do fosfolipídio zwitteriônico DPPC deve favorecer interações eletrostáticas (atrativas) com o xantênico eritrosina. Essa interação é suficientemente forte para que a eritrosina na interface ar/água resista à pressão de superfície exercida quando as moléculas de fosfolipídio se encontram em sua fase condensada (concentrações acima de 10^{-5} mol/L), fazendo com que as isotermas se desloquem para regiões de maiores áreas em seus diversos estágios de compressão. Outra evidência é a mudança do valor da pressão de colapso da monocamada com a incorporação do xantênico (aumentando cerca de 10 mN/m, Fig. 49b), ou seja, a força por área molecular a ser aplicada de modo a destruir a monocamada aumenta com a presença da eritrosina adicionada à subfase.

As Figuras 50a e 50b mostram as isotermas π -A de DOPG e DOPC obtidas em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L, respectivamente.

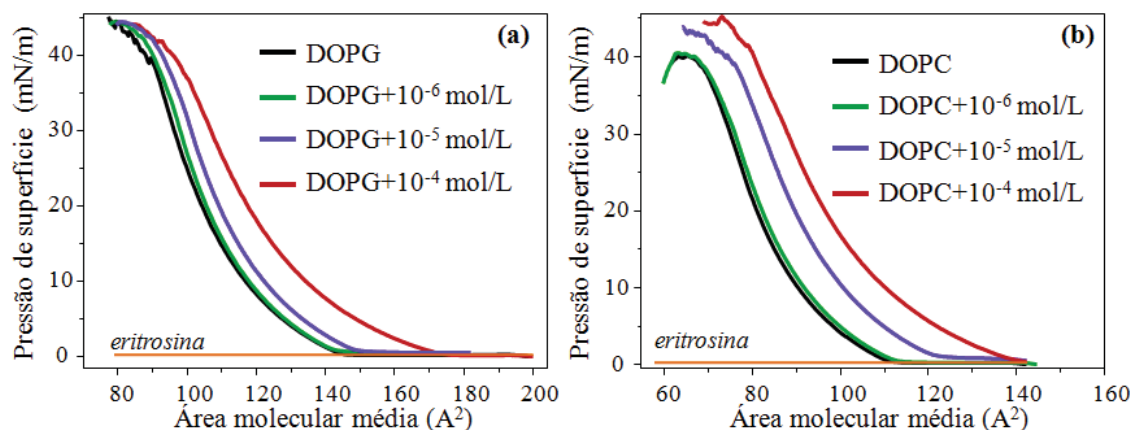


Figura 50: isotermas π -A de (a) DOPG e (b) DOPC em subfase de água ultrapura e em soluções de eritrosina a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L

A exemplo do que foi discutido nas Figuras 49a e 49b, o aumento de concentração de eritrosina na subfase provoca um deslocamento das isotermas π -A para maiores áreas moleculares, resultante da interação entre as moléculas de fosfolípido e eritrosina. Este efeito torna-se significativo para concentrações superiores a 10^{-5} mol/L em ambos os filmes de DOPG e DOPC. A eritrosina foi incorporada à monocamada de DOPG em suas fases líquida e condensada, diferente das monocamadas de DPPG, onde a pressão de superfície na fase condensada foi suficiente para expelir as moléculas de eritrosina de volta para a subfase. Além disso, deslocamentos mais significativos das isotermas π -A em direção a maiores áreas moleculares foram observados para monocamadas de DOPC, similar ao observado para os filmes de DPPC. Vale ressaltar que as cabeças polares fosfatidilcolina (PC) são as mesmas entre os fosfolípidos zwitterionicos (DOPC e DPPC) assim como as cabeças fosfatidilglicerol (PG) para os fosfolípidos aniônicos (DOPG e DPPG). Dessa forma, as diferenças encontradas no deslocamento das isotermas π -A devem estar relacionadas à presença de insaturações nas cadeias alifáticas do DOPC e DOPG.

Existem diferentes maneiras nas quais a membrana celular regula a densidade de empacotamento de seus componentes. A insaturação das cadeias alifáticas lipídicas é uma delas.¹⁰ A ligação dupla dá origem a uma torção no grupo insaturado da cadeia lipídica, o que impede o elevado empacotamento das caudas.¹⁵⁹ O menor empacotamento criado poderia, portanto, facilitar a incorporação de eritrosina na monocamada. Por exemplo, Ishitsuka *et al.*¹⁵⁹ reportam mecanismos de inserção de peptídeos antimicrobianos a filmes de Langmuir formados por monocamadas lipídicas. Carga e propriedades de empacotamento da monocamada foram alteradas usando os fosfolipídios com diferentes grupos polares (aniônicos e zwitteriônicos) e cadeias alifáticas (saturadas e insaturadas). Foi observado que interações eletrostáticas entre o peptídeo catiônico e os fosfolipídios aniônicos são predominantes. Porém, o grau de empacotamento da monocamada também desempenha um papel. Segundo os autores, o menor empacotamento da monocamada formada por fosfolipídios insaturados permite uma maior inserção dos peptídeos na monocamada. Um efeito similar pode estar sendo observado aqui, ou seja, o menor empacotamento dos filmes formados pelos fosfolipídios insaturados permite uma maior inserção da eritrosina, resultado de uma maior interação com a monocamada.

7.2. Estudo da interação entre o derivado xantênico eritrosina e modelos de membrana: Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV)

A oxidação lipídica desempenha um papel fundamental na terapia fotodinâmica (PDT), utilizada clinicamente em patologias tais como câncer de pele e esôfago.¹⁶⁰⁻¹⁶² O método baseia-se na administração controlada de uma molécula fotossensibilizadora, que induz a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), um agente oxidante poderoso capaz de causar necrose ou apoptose em células cancerosas.¹⁶³ Membranas celulares e especialmente fosfolipídios insaturados são os principais alvos do oxigênio singlete. Entretanto, os mecanismos fundamentais envolvidos na influência da oxidação lipídica sobre estruturas automontadas de fosfolipídios ainda não são completamente compreendidos.

Os filmes de Langmuir, apresentados na seção anterior, mostraram que a eritrosina apresenta afinidade pela membrana, principalmente quando formada por fosfolipídios insaturados. Além disso, sabe-se que os derivados xantênicos apresentam elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singlete.¹¹⁴ Nesta seção, o objetivo será tirar proveito da interação membrana - eritrosina para estudar a oxidação de fosfolipídios quando automontados na forma de vesículas unilamelares gigantes (GUV). A foto-oxidação de três diferentes geometrias será investigada: i) GUV formadas pelos fosfolipídios insaturados DOPC e POPC, ii) GUV biotiniladas de DOPC e POPC aderidas em substratos modificados com estreptavidina e iii) GUV formadas pela mistura ternária de DOPC/DPPC/colesterol.

7.2.1. Foto-oxidação de GUV

GUV de DOPC contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina no meio externo foram irradiadas (543 nm e 10 W/cm^2) e simultaneamente observadas. As Figuras 51a e 51b exibem as alterações morfológicas, com relação ao tempo de irradiação, para duas GUV diferentes observadas por microscopias de contraste de fase e fluorescência, respectivamente. A fluorescência coletada na Figura 51b é proveniente do marcador fluorescente (Liss Rod PE) incorporado à membrana (0,5 mol %). Este último é excitado pela mesma faixa de comprimento de onda utilizada para a excitação da eritrosina (λ_{ex} : 543 nm; λ_{em} : 593 nm), possibilitando a observação simultânea das GUV por fluorescência durante a foto-ativação do xantênico.

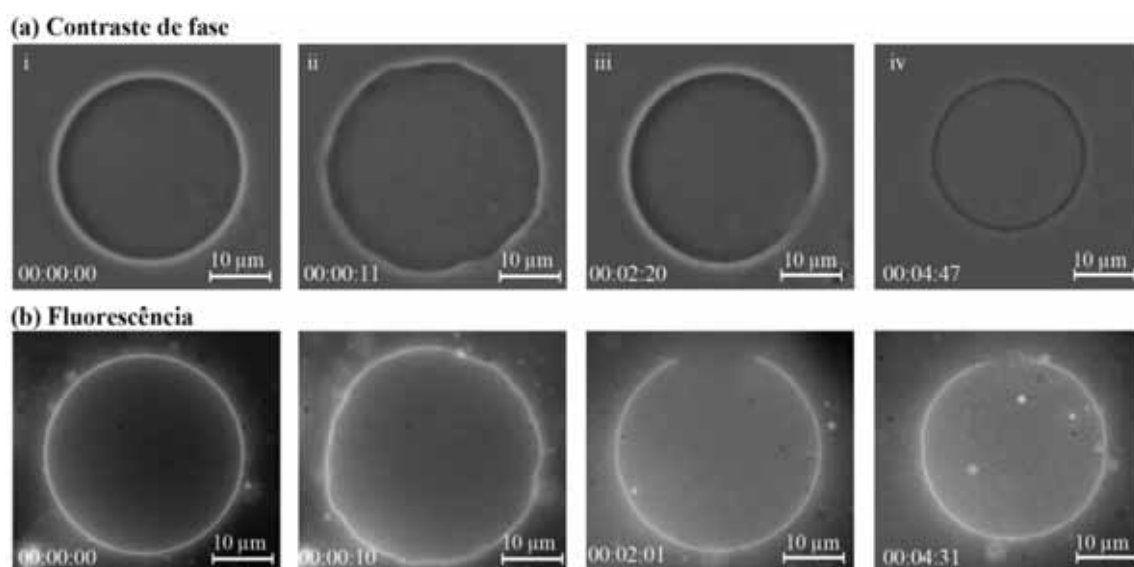


Figura 51: (a) imagens de contraste de fase e (b) fluorescência de GUV de DOPC contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina em seu meio externo, em função do tempo de irradiação.

A Figura 52 mostra a evolução do perímetro relativo e do contraste entre os meios internos e externos da vesícula, com relação ao tempo de irradiação. O perímetro relativo é dado pela razão entre o perímetro inicial da GUV e o perímetro em um dado tempo de irradiação. A inserção da Figura 52 mostra o *zoom* de uma imagem de contraste de fase e um perfil salientando a diferença de contraste (Δ) entre o meio interno e externo da vesícula.

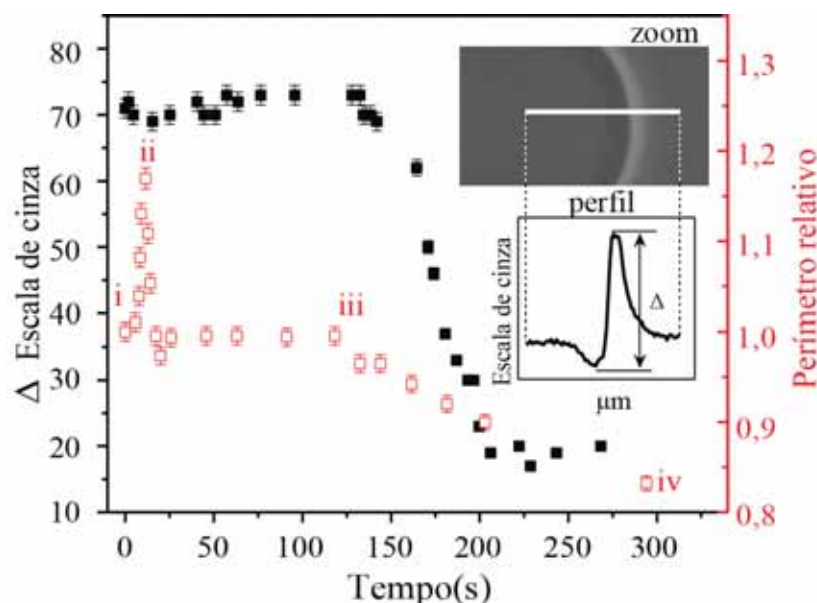


Figura 52: evolução do perímetro relativo e do contraste entre os meios internos e externos da vesícula com relação ao tempo de irradiação. A inserção mostra o *zoom* de uma imagem de contraste de fase e um perfil salientando a diferença de contraste (Δ) entre o meio interno e externo da vesícula.

A evolução dos eventos começa com flutuações da forma, aumento do perímetro e da área superficial das vesículas. Esses eventos ocorrem durante os primeiros 10s (Figuras 51 e 52 - ii) e indicam que a razão entre área superficial e volume das vesículas aumentou.²⁹ Alguns segundos mais tarde, a maior parte das vesículas expõem alguns *buds*, ou seja, pequenas vesículas satélites ligadas à vesícula principal através de finos tubos, que podem ser a origem da diminuição do perímetro relativo mostrado na Figura 52. A diferença de contraste é mantida constante mostrando que não houve alteração significativa na permeabilidade da membrana. No entanto, após aproximadamente 2 minutos de irradiação ocorre a abertura de poros na membrana, observados nas imagens de fluorescência e contraste de fase (Figuras 51 e 52 - iii). Em seguida, a assimetria inicial entre sacarose (interior da vesícula) e glicose (exterior da vesícula) não é mais preservada e o contraste diminui exponencialmente.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵ O perímetro relativo diminui drasticamente até o colapso da vesícula (Figuras 51 e 52 - iv). A mesma sequência de eventos é observada para concentrações de até 15 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina. No entanto, os efeitos são muito menos pronunciados e lentos. É importante mencionar que as

alterações morfológicas ocorreram apenas em vesículas formadas por fosfolipídios insaturados (DOPC e POPC). A irradiação da eritrosina adicionada à GUV formadas por fosfolipídios saturados (DPPC e DMPC) não induziu quaisquer alterações relevantes nas vesículas. Assim, o aumento da área superficial observada está associado a reações oxidativas originadas nas duplas ligações das caldas alifáticas dos fosfolipídios.

Pellosi *et al.*¹¹⁴ reportaram recentemente um elevado rendimento quântico de oxigênios singletos ($\Phi_{\Delta} \sim 0,62$) gerados pela eritrosina. Dessa forma, o estresse oxidativo produzido na membrana deve estar relacionado a interações entre os oxigênios singletos e as insaturações das cadeias do DOPC. Esta hipótese foi confirmada irradiando, sob as mesmas condições experimentais, vesículas de DOPC contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina e 10^{-3} mol/L de azida de sódio (NaN_3). A NaN_3 é utilizada como supressor de oxigênios singletos. Nesta situação, nenhuma modificação morfológica significativa foi observada, indicando que a reação entre oxigênio singlete e as duplas ligações das cadeias fosfolipídicas é a principal responsável pelo aumento da área superficial. É importante mencionar que nenhuma modificação morfológica significativa foi detectada quando GUV contendo marcadores fluorescentes convencionais foram irradiadas. De fato, os marcadores fluorescentes apresentam relaxamento do estado excitado principalmente pela emissão de fluorescência e não por cruzamento intersistema para o estado tripleto, o que não favorece a geração de oxigênios singletos.

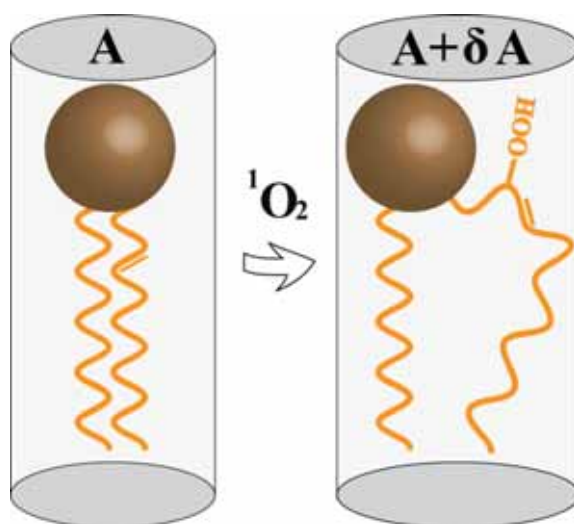


Figura 53: representação esquemática da hidroperoxidação e aumento relativo da área molecular (δA) de um fosfolípido insaturado.

ocupada por fosfolípidios que contêm grupo hidroperoxido, refletindo no aumento global da área superficial das vesículas,²⁹ conforme ilustrado na Figura 53. Com o prosseguimento da reação oxidativa, a clivagem da cadeia de carbono próxima à posição inicial da dupla ligação é obtida,¹⁷⁰⁻¹⁷¹ favorecendo a abertura de poros e a destruição da vesícula.¹⁷²⁻¹⁷³ Essa sequência de eventos está de acordo com o trabalho reportado por Caetano *et al.*²⁵, baseado na irradiação de GUV de DOPC contendo em seu meio externo o derivado fenotiazínico azul de metileno. Cwiklik *et al.*¹⁷³ estudaram recentemente a formação de poros em membranas oxidadas de DOPC por simulações numéricas. Foi observado que a abertura de poros e a clivagem das duas cadeias alquílicas do DOPC levam a uma forte perturbação na membrana, favorecendo sua destruição.

Hidroperoxidos são conhecidos por serem o primeiro produto estável da reação entre oxigênio singlete e duplas ligações.¹⁶⁶ Dessa forma, é razoável associar o aumento da área superficial a formação de hidroperoxidos.^{25, 29} A hidrofiliicidade do grupo hidroperoxido é maior que a das cadeias alquílicas, favorecendo sua migração em direção à interface bicamada/água.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Uma área maior é

7.2.2. Foto-oxidação de GUV biotiniladas aderidas à superfície modificada com estreptavidina: método bio-adesivo

Na busca por um método simples e rápido para determinar o aumento de área superficial da membrana, foi desenvolvida a metodologia bio-adesiva que se baseia nas alterações geométricas que seguem a oxidação das GUV aderidas sobre o substrato. O método foi implementado segundo as etapas: i) funcionalização das GUV com uma pequena fração (2 mol%) de fosfolipídios biotinilados, ii) adesão das GUV biotiniladas a substratos modificados com estreptavidina (descritos em 3.6.3.), iii) adição de eritrosina no meio externo das vesículas e acompanhamento das variações nas dimensões da zona de adesão durante a foto-ativação do xantênico. As Figuras 54a - 54c apresentam uma representação esquemática do substrato modificado com estreptavidina, GUV biotiniladas e as três etapas do método bio-adesivo. A Figura 54d exibe a imagem confocal 3-dimensional de uma vesícula biotinilada de DOPC (verde) aderida a um substrato modificado com estreptavidina (vermelho). A fluorescência da vesícula e do substrato foi obtida, respectivamente, pela incorporação de 0,5 mol% do marcador NBD à membrana e 10 mol % de neutravidina modificada com rodamina à camada de estreptavidina.

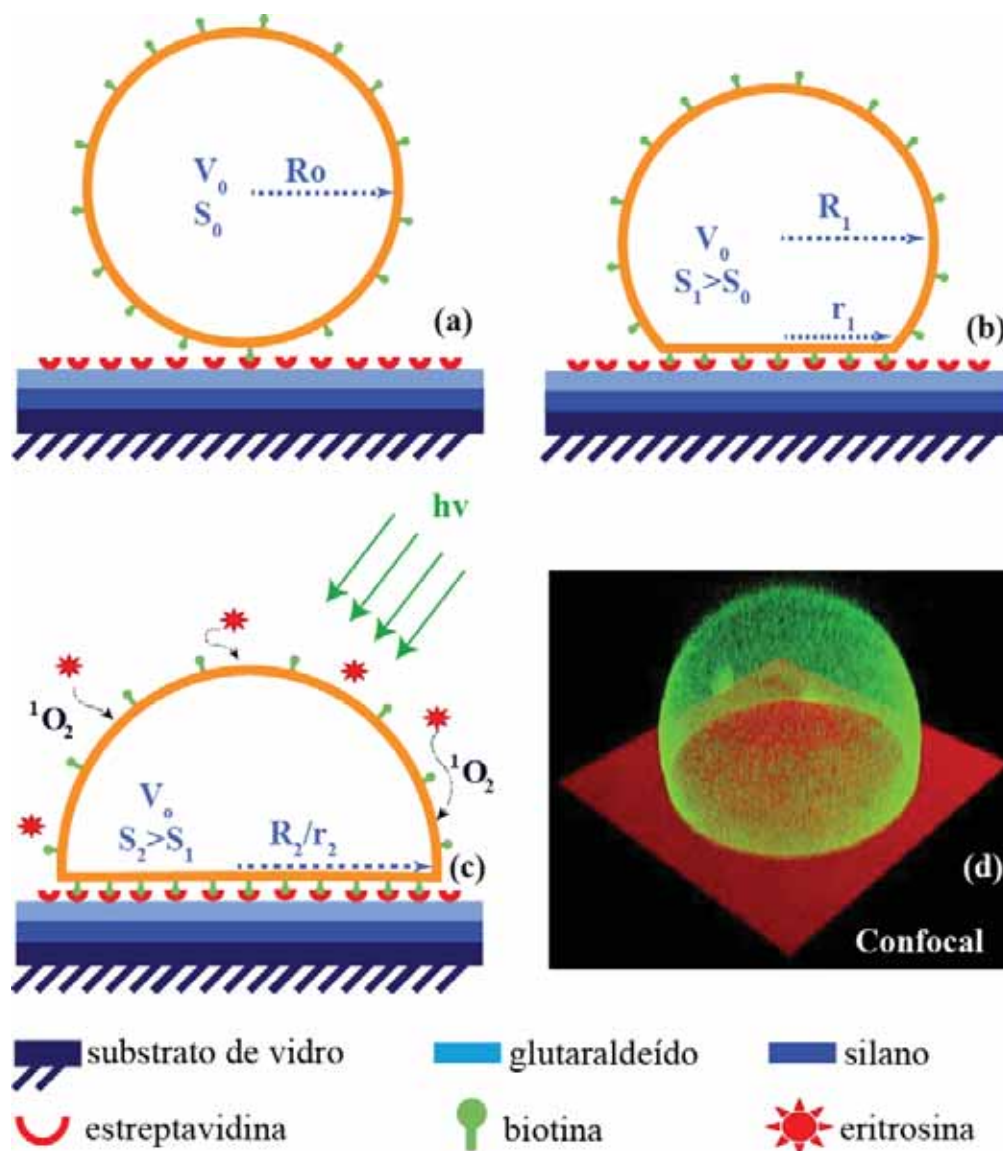


Figura 54: (a-c) representação esquemática do substrato modificado com estreptavidina, GUV biotiniladas e as três etapas do método bio-adesivo. (d) Imagem confocal projetada em 3-dimensões de uma vesícula biotinilada de DOPC (verde) aderida a um substrato modificado com estreptavidina (vermelho).

GUV biotiniladas foram espalhadas sobre as superfícies modificadas com estreptavidina. No primeiro estágio (Figura 54a) as vesículas mantêm o volume inicial V_0 e área de superfície S_0 , formando uma zona de contato com a superfície, cujo tamanho depende da tensão das vesículas. O processo de adesão se inicia com o aumento das interações entre ligantes (biotina-GUV) e receptores (estreptavidina – substrato). GUV inicialmente com raio R_0 volume V_0 e superfície S_0 aderem ao substrato em menos de 10 s, atingindo uma geometria

final com raios r_1 e R_1 (Figuras 54b e 54d).¹⁷⁴ O processo de adesão ocorre sob volume constante V_0 , resultando no aumento da área superficial da vesícula de S_0 a S_1 . A condição de equilíbrio é alcançada (Figura 54d) quando a tensão da vesícula e as forças adesivas se igualam.¹⁷⁵ Neste estágio, o aumento relativo da área superficial é de aproximadamente 2% (veja Figura 55).

A eritrosina é então adicionada ao meio externo das GUV aderidas. Nesta geometria, o processo de foto-oxidação ocorre sob irradiação, induzindo modificações da área aderida da vesícula, como mostrado na Figura 54c. O aumento da área de superfície da vesícula pode ser extraído pela diferença entre a área da superfície de uma vesícula aderida antes (S_1) e depois (S_2) da foto-oxidação. Este último pode ser determinado medindo simplesmente o raio da região aderida antes (r_1) e depois (r_2) da foto-oxidação. Para isso, considere uma vesícula de volume inicial $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ e área de superfície inicial $S_0 = 4\pi R_0^2$. Ao se aderirem ao substrato, o volume V e a superfície S podem ser expressos como uma função do raio R da secção esférica da vesícula e do raio r da região de adesão.

$$V = \frac{2}{3}\pi R^3 \left(1 + \frac{3}{2} \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{1}{2} \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right)^{\frac{3}{2}} \right) \quad (1)$$

$$S = \pi r^2 + 2\pi R^2 \left(\left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) + 1 \right) \quad (2)$$

Considerando uma vesícula aderindo com volume constante, o raio R pode ser expresso como:

$$R = \frac{1}{16} \left(\frac{r^8}{\Delta} + r^4 + \Delta \right) \quad (3)$$

$$\text{Com } \Delta \text{ dado por: } \Delta = \left(r^{12} + 128r^6 + 16 \left(\left((r^6 + 16)(r^6 + 32) \right)^{\frac{1}{2}} + 128 \right) \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

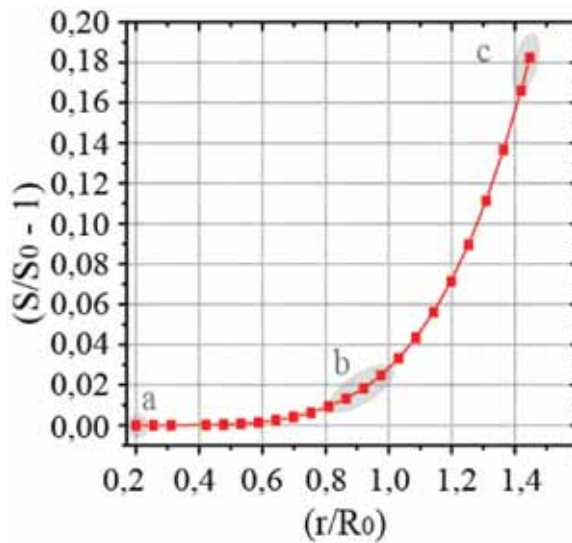


Figura 55: expansão da área superficial relativa ($S/S_0 - 1$) em função do raio reduzido (r/R_0) da região aderida. As regiões destacadas representam o aumento da área superficial para diferentes estágios discutidos na Figura 54a-c.

A Figura 55 exibe uma projeção teórica da expansão da área superficial relativa ($S/S_0 - 1$) em função do raio reduzido (r/R_0) da região aderida, considerando os diferentes estágios discutidos na Figura 54a-c. A Figura 56a mostra a microscopia de fluorescência e RICM para uma vesícula DOPC aderida contendo 25 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina no meio externo, antes e após a irradiação (543 nm e 10 W/cm^2). A fluorescência coletada é proveniente do marcador Liss Rod PE incorporado à

membrana (0,5 mol%), excitado pela mesma faixa de comprimento de onda de excitação da eritrosina. O raio R da secção esférica pode ser extraído a partir da microscopia de fluorescência e o raio r da área aderida a partir do RICM. Aplicando as equações (2), (3) e (4) aos valores medidos para o raio r da região aderida, obtêm-se os valores da área superficial da vesícula. A evolução com o tempo do aumento de área superficial relativa ($S_2/S_1 - 1$), considerando diferentes intensidades de irradiação (10, 2,5 e 0,31 W/cm^2), é exibida na Figura 56b.

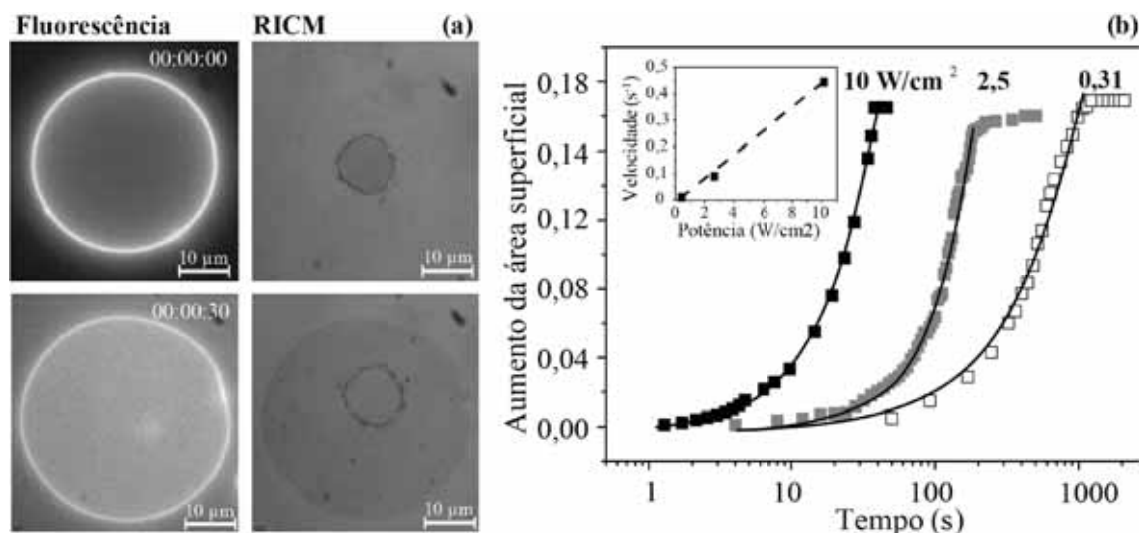


Figura 56: GUV biotilada de DOPC aderida sobre a superfície modificada com estreptavidina, contendo 25 µmol/L de eritrosina no meio externo. (a) Microscopia de fluorescência e RCM, antes e depois da irradiação. (b) Evolução com o tempo (segundos - escala logarítmica) do aumento de área superficial relativo ($S_2/S_1 - 1$), considerando diferentes potências de irradiação (10, 2,5 e 0,31 W/cm²). A inserção mostra a dependência linear entre a potência de irradiação e a variação do aumento de área superficial com relação ao tempo (velocidade, s⁻¹).

Uma expansão linear da área superficial relativa foi observada, atingindo um platô em aproximadamente 18%. Essa expansão linear não fica evidente na Figura 56b devido à escala logarítmica utilizada para o tempo de irradiação, escolhida para melhor comparação entre as diferentes curvas. A diminuição da potência de irradiação retarda o aumento da área superficial, uma vez que a menor quantidade de fótons incidentes diminui a quantidade de oxigênios singletos gerados pela eritrosina. Porém, uma completa hidroperoxidação do DOPC foi observada, atingindo valores similares para o aumento de área superficial relativo, independentemente da potência de irradiação. A inserção da Figura 56b mostra a dependência linear entre a potência de irradiação e a variação do aumento de área superficial com relação ao tempo (velocidade, s⁻¹). Para períodos de irradiação acima de 2, 8 e 20 minutos a permeabilidade da membrana não é mais preservada considerando as potências de 10, 2,5 e 0,31 W/cm², respectivamente. A abertura de poros é favorecida seguida da explosão das vesículas, de acordo com o discutido na secção 7.2.1.

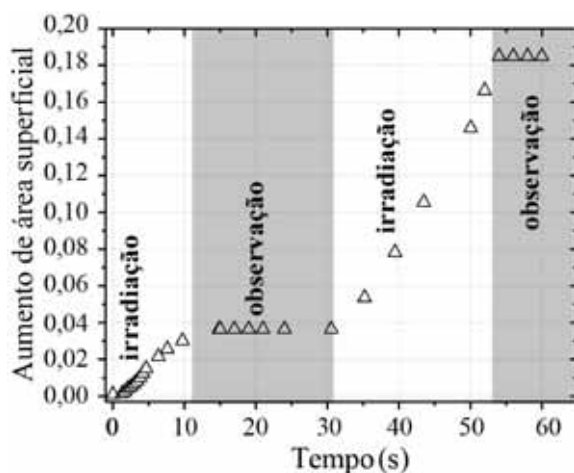


Figura 57: aumento de área superficial relativa ($S_2/S_1 - 1$) em função do tempo, alternando diferentes períodos de irradiação (10 W/cm²), considerando GUV biotiniladas de DOPC contendo 25 µmol/L de eritrosina no meio externo.

pode ser observado na Figura 57.

GUV biotiniladas de POPC aderidas em superfícies modificadas com estreptavidina também foram avaliadas, mantendo as mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Diferentes GUV de DOPC e POPC foram analisadas e um histograma foi construído com a distribuição do aumento da área superficial das vesículas após a foto-oxidação, conforme exibido na Figura 58. O aumento de área superficial relativo de aproximadamente 18% observado para GUV de DOPC é ligeiramente maior que os 14% encontrados para GUV de POPC. A origem desta diferença está relacionada ao número de insaturações encontradas nas cadeias dos fosfolipídios. As cadeias carbônicas de DOPC apresentam duas insaturações, uma em cada cadeia, enquanto o POPC apenas uma. Isso indica que uma bicamada de DOPC totalmente hidroperoxidada tem, em média, mais grupos hidroperóxidos na vizinhança da interface bicamada/água quando comparada à bicamada POPC totalmente hidroperoxidada. A Figura 58b ilustra a maior área ocupada pelo DOPC hidroperoxidado, refletindo no maior aumento global da área superficial das vesículas.

Complementarmente, experimentos foram realizados seguindo a evolução do aumento de área superficial relativo sob uma irradiação intermitente, ou seja, a amostra foi irradiada durante alguns segundos e em seguida observada por outros poucos segundos sem irradiação. Não foram detectados efeitos retardados depois de parar ou reiniciar a irradiação, indicando uma resposta instantânea do aumento da área superficial com a irradiação, como

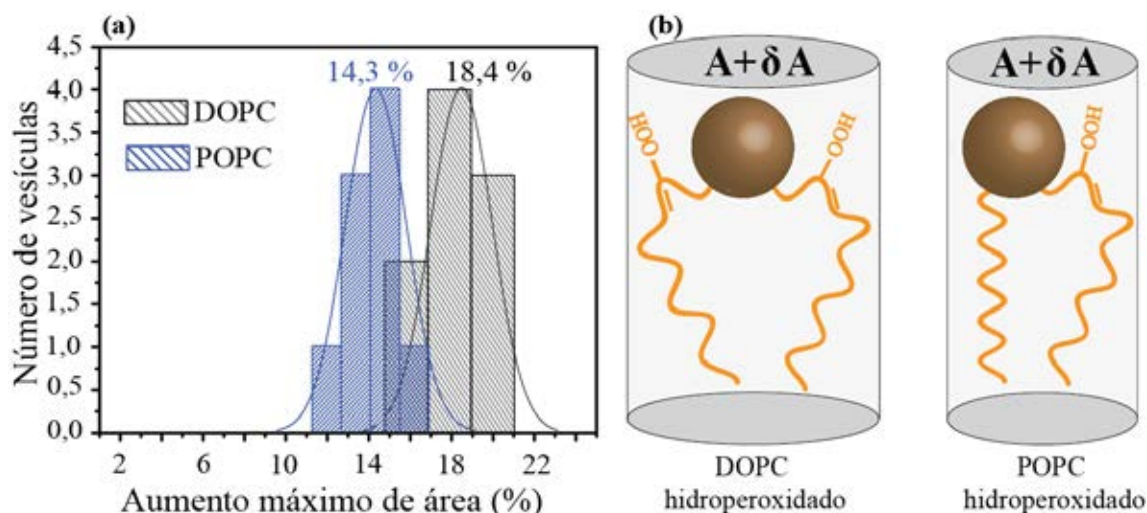


Figura 58: (a) histograma construído com a distribuição do aumento da área superficial das vesículas de DOPC e POPC após a hidroxidação. (b) Representação da área ocupada pelas moléculas hidroxidadas de DOPC e POPC.

Poucos são os métodos relatados para a determinação quantitativa do aumento da área superficial de GUV sob estresse oxidativo. Por exemplo, Riske *et al.*²⁹ propõem uma metodologia de quantificação baseada na forma prolata assumida pelas vesículas quando submetidas a um campo elétrico alternado (AC). Verificou-se que a magnitude do alongamento das vesículas depende do aumento de área superficial causado pela hidroxidação. Considerando GUV de POPC hidroxidadas pelo derivado de porfirina (*PE-porph*), um aumento de área superficial de aproximadamente 8% foi observado pelos autores. Simulações de dinâmica molecular aplicadas a hidroxidação do fosfolípido monoinsaturado 1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (PLPC) apontaram um aumento de área superficial maior, em torno de 16%, conforme o trabalho de Wong-Ekkabut *et al.*¹⁶⁸ Um desempenho experimental mais eficiente foi obtido por Weber *et al.*¹⁷⁶ combinando as técnicas de microscopia de fluorescência e aspiração por micropipeta. O aumento da área superficial encontrado para GUV de DOPC e POPC hidroxidadas por um derivado de porfirina (*Chlorin-12*) foi de aproximadamente 19% e 16%, respectivamente, o que está de acordo com os resultados apresentados aqui.

7.3. Sistema ternário de fosfolípidios e colesterol

7.3.1. Mistura ternária de DOPC/DPPC/colesterol

Veatch *et al.*¹⁷⁷ foram os primeiros a mapear os limites entre diferentes fases para um sistema ternário completo composto pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol. As diferentes fases encontradas pelos autores podem ser representadas pelo diagrama mostrado na Figura 59. Este diagrama registra as fases observadas para diferentes composições da mistura considerando o resfriamento do sistema a partir de uma região de alta temperatura, acima da temperatura de transição de fase do DPPC. Por se tratar de um diagrama que contém informações de diferentes temperaturas, a Figura 59 não é considerada um diagrama de fase.

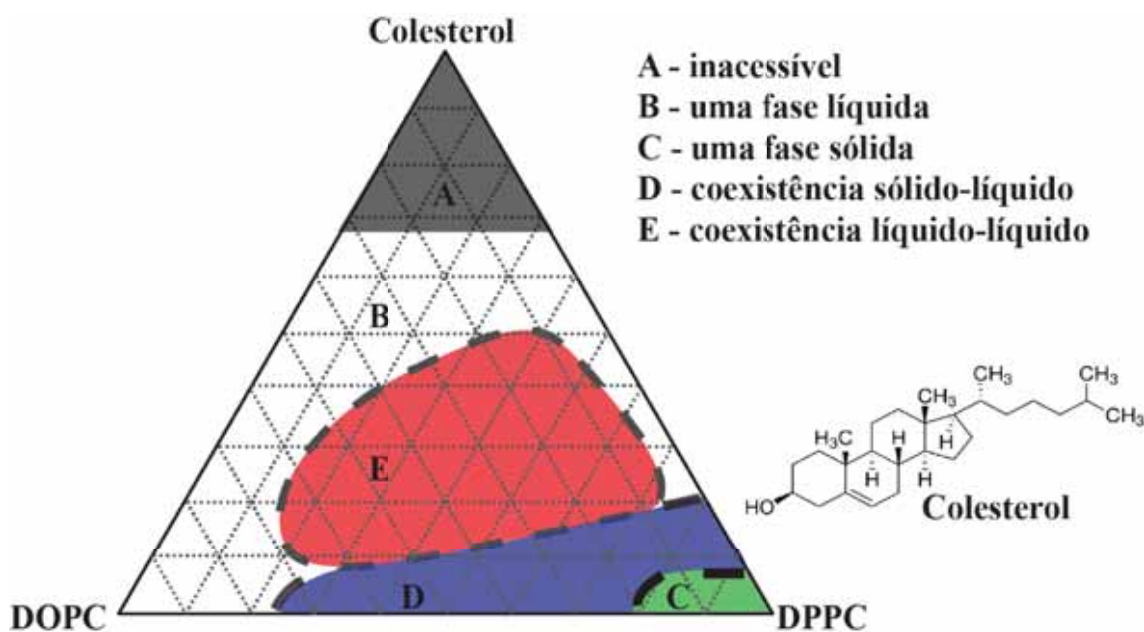


Figura 59: fases observadas para diferentes composições da mistura ternária DOPC/DPPC/colesterol considerando o resfriamento do sistema a partir de uma região de alta temperatura. A inserção mostra a estrutura molecular do colesterol. *Adaptado de [177].*

Cinco regiões diferentes (A, B, C, D e E) são exibidas na Figura 59. Para elevadas frações molares, o colesterol é expelido das vesículas de forma que composições elevadas de colesterol são inacessíveis na região A.¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ Excluindo a região A e partindo de uma temperatura elevada, todas as vesículas são observadas em uma fase líquida homogênea. Com o resfriamento do sistema para temperaturas inferiores a de transição de fase do DPPC, as

misturas apresentam as seguintes possibilidades: (i) permanecer em uma única fase líquida uniforme exibida na região B. Isso acontece para vesículas com elevada fração de fosfolipídios insaturados (DOPC) ou para a mistura binária de DPPC e colesterol. Frações intermediárias de DOPC exigem um aumento da fração de colesterol. (ii) Região C, onde a elevada fração de DPPC favorece a formação de uma fase sólida. (iii) Partindo da região C em direção a maiores frações de DOPC, haverá a coexistência das fases sólido-líquido, delimitada pela região D. (iv) A última possibilidade é a coexistência de duas fases líquidas, líquido-ordenada (Lo / DPPC) e líquido-desordenada (Ld / DOPC), delimitadas pela região E. A coexistência líquido-líquido da região E é diferenciada da coexistência sólido-líquido da região D pela morfologia dos domínios. Domínios sólidos da fase D são geralmente não circulares e se movimentam como corpo rígido em um meio de fase líquida. Por outro lado, as fases líquidas da região E são mais fluidas e apresentam domínios circulares.

A Figura 60a exibe um diagrama de fase contendo uma aproximação baseada no trabalho de Veatch *et al.*¹⁷⁷ sobre a região de coexistência líquido-líquido a uma temperatura de 25 °C para o sistema de DOPC/DPPC/colesterol. Foram analisadas GUV contendo diferentes frações de DOPC/DPPC/colesterol: 20/50/30 (1), 30/40/30 (2), 50/20/30 (3) e 70/0/30 (4). A Figura 60b mostra as imagens confocais das GUV coletadas para as diferentes frações (1, 2, 3 e 4). A fluorescência nas imagens é proveniente dos marcadores fluorescentes (NBD e Liss Rod PE), ambos incorporados à membrana a uma proporção de 0,5 mol%.

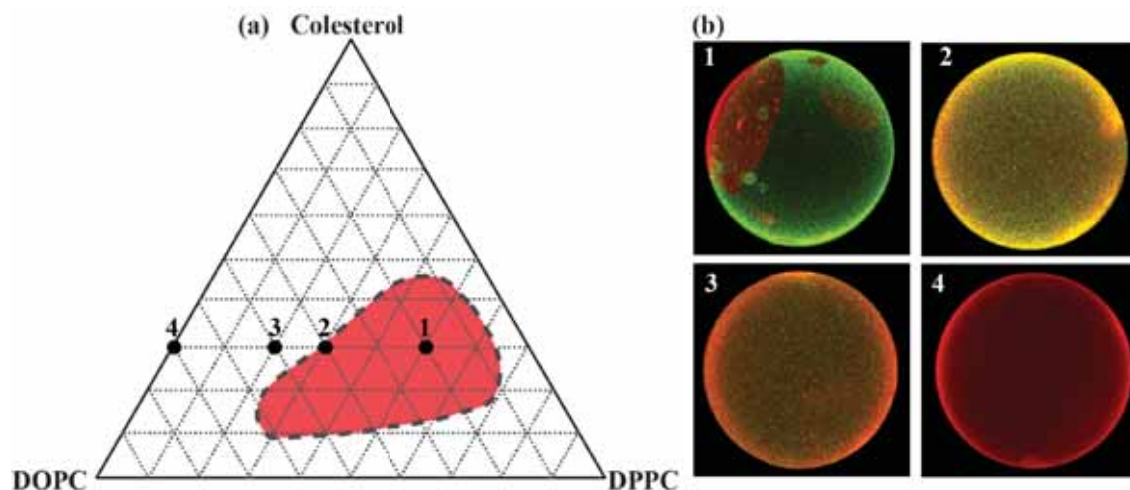


Figura 60: (a) diagrama de fase contendo uma aproximação da região de coexistência líquido-líquido a uma temperatura de 25 °C para o sistema de DOPC/DPPC/colesterol. (b) Imagens confocais para GUV contendo diferentes frações de DOPC/DPPC/colesterol: 20/50/30 (1), 40/30/30 (2), 30/40/30 (3) e 50/20/30 (4).

A separação das fases Lo e Ld foi observada somente para a fração da mistura contida no interior da região destacada no diagrama de fase, conforme exibido pela microscopia 1. Fixando a fração de colesterol e diminuindo a fração de DPPC em direção à mistura binária de DOPC/colesterol, o sistema sai da região de coexistência das fases líquido-líquido e vai para a região onde somente uma fase líquida é uniformemente observada. As microscopias 2, 3 e 4 confirmam essa tendência apresentando uma distribuição uniforme dos componentes, o que está de acordo com a literatura.¹⁷⁷ Considerando a região de coexistência líquido-líquido (1), imediatamente após a diminuição da temperatura (de 50 °C para 25 °C), muitos pequenos domínios circulares são observados. A Figura 61a exibe os vários domínios em uma GUV coletada imediatamente após o resfriamento do sistema a 25 °C. Os domínios de mesma natureza são fundidos através de colisões sucessivas, e tendem a se separar completamente em apenas duas fases circulares, como exibido na Figura 61b. O tempo médio observado para a completa separação das fases está em torno de 5-10 minutos o que corrobora com os resultados reportados por Sharom *et al.*¹⁸⁰

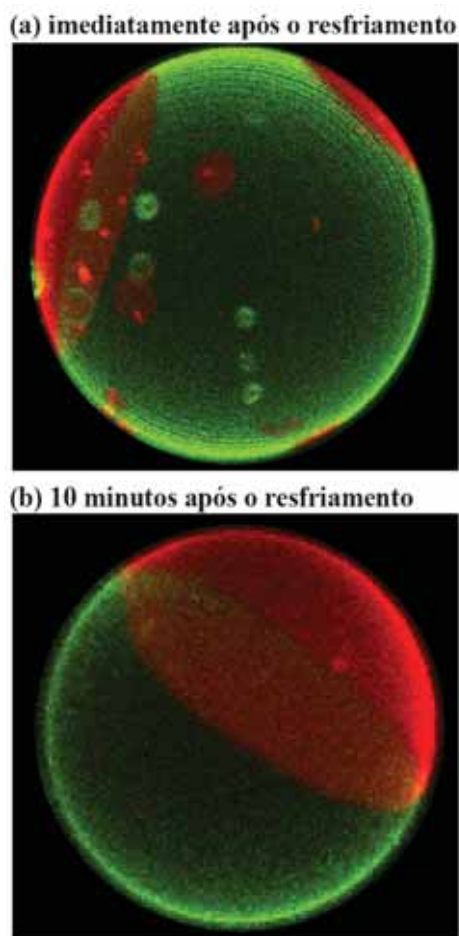


Figura 61: imagens confocais de duas GUV distintas para a mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contidas na região 1 da Figura 60a coletadas (a) imediatamente após o resfriamento e (b) após 10 minutos com o sistema a 25 °C.

A partição dos marcadores fluorescentes NBD e Liss Rod PE foi analisada por imagens confocais geradas pela fluorescência de cada marcador separadamente. A Figura 62a exibe a imagem confocal de uma GUV composta pela fluorescência de ambos marcadores. A Figura 62b e 62c exibe a mesma GUV para a qual as imagens confocais foram geradas apenas pela fluorescência do NBD (verde) e Liss Rod PE (vermelho), respectivamente. Pode-se observar a completa partição dos marcadores entre as fases Lo e Ld, isto é, não há sobreposição da fluorescência de ambos marcadores para uma mesma fase. Considerando a maior fração de DPPC na mistura, é razoável supor que a maior fase observada nas imagens seja composta pela fase Lo. Como a fase verde nas imagens é maior que a vermelha, espera-se que a partição do NBD ocorra em direção à fase

Lo e a da Liss Rod PE, portanto, em direção à fase Ld. De fato, o NBD é um dos poucos marcadores fluorescente com afinidade pela fase Lo.¹⁸¹⁻¹⁸³ Esta afinidade está relacionada com a cadeia carbônica saturada do fosfolípido (DPPE) ligado ao fluoróforo, similar às cadeias carbônicas do DPPC. No caso da Liss Rod PE, a cadeia carbônica insaturada do fosfolípido (DOPE) ligado ao fluoróforo, similar às cadeias carbônicas do DOPC, aumenta sua afinidade com a fase Ld.¹⁸⁴

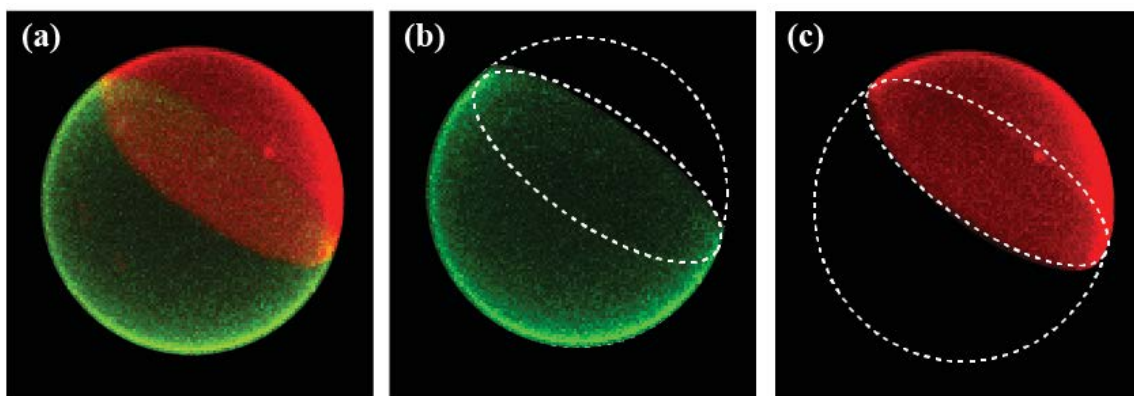


Figura 62: imagem confocal de uma GUV composta (a) pela combinação da fluorescência de ambos NBD (verde) e Liss Rod PE (vermelho). Mesma imagem composta somente pela fluorescência do (b) NBD e (c) Liss Rod PE.

7.3.2. Foto-oxidação das misturas DOPC/DPPC/colesterol

Sistemas ternários de lipídios e colesterol podem ser aplicados em estudos de interação com moléculas biologicamente ativas, uma vez que o equilíbrio desse sistema pode ser alterado em função dessas interações.⁴⁰⁻⁴² Para compreender como a oxidação dos fosfolipídios afeta o comportamento de fase da membrana para a mistura DOPC/DPPC/colesterol, as quatro composições exibidas no diagrama da Figura 60 foram investigadas. GUV contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina no meio externo foram irradiadas (543 nm e 10 W/cm^2) e simultaneamente observadas, mantendo as mesmas condições experimentais descritas na seção 7.2.1. Os resultados obtidos para cada composição das misturas são exibidos a seguir.

DOPC/DPPC/colesterol: 20/50/30 (1)

A Figura 63 exibe as alterações morfológicas da fase Ld, com relação ao tempo de irradiação, observada por microscopia de fluorescência. A Liss Rod PE, particionada na fase Ld, é excitada pela mesma faixa de comprimento de onda de excitação da eritrosina, possibilitando a observação simultânea por fluorescência durante a foto-ativação do xantênico. Sob irradiação, observou-se um aumento nas flutuações da fase Ld, acompanhadas

por alterações morfológicas e aumento de área aparente. Esses eventos ocorrem durante os primeiros 15s, semelhante aos efeitos previamente relatados na seção 7.2.1 para GUV de DOPC. Nenhuma modificação significativa foi observada para a fase Lo, rica em DPPC. Este resultado confirma o mecanismo de interação entre oxigênios singletos e as duplas ligações das cadeias fosfolipídicas como principal responsável pelo aumento da área superficial através da formação de grupos hidroperóxidos.^{25, 29} Haluska *et al.*¹⁸⁵ demonstra que a foto-oxidação do sistema binário DPPC/colesterol resulta em apenas pequenas deflexões da membrana, sem aumento de área, devido a formação de grupos hidroperóxidos nas insaturações do colesterol. Estes resultados confirmam que o aumento da área superficial observado para a fase Ld está relacionado com a hidroperoxidação do DOPC e não do colesterol.

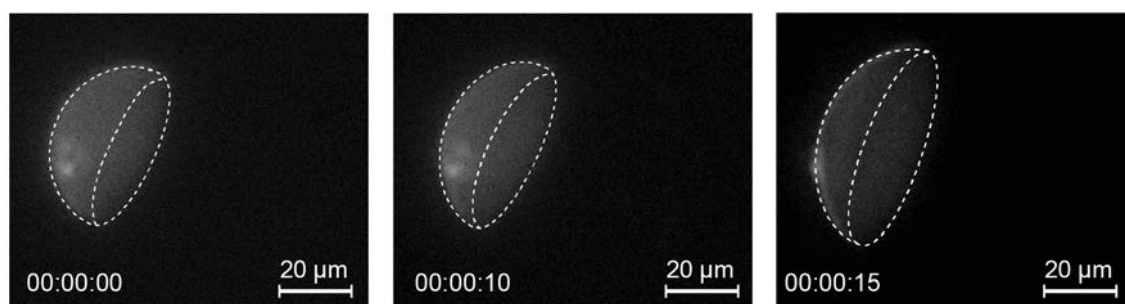
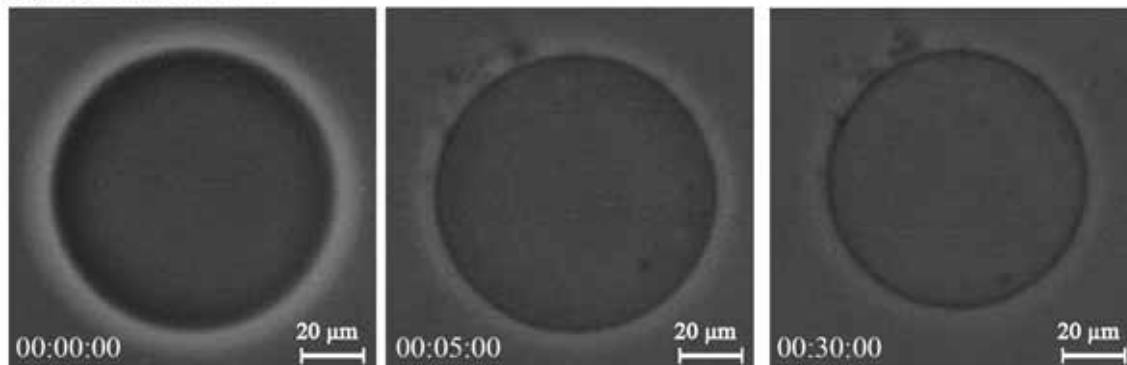


Figura 63: imagens de fluorescência em função do tempo de irradiação para uma GUV composta pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contendo 50 µM de eritrosina em seu meio externo.

Após aproximadamente 4 minutos de irradiação, foi observada a abertura de poros na membrana composta pela fase Ld. Comparado aos resultados obtidos para GUV de DOPC, o tempo gasto para a abertura de poros nesta composição da mistura é cerca de duas vezes maior. As Figuras 64a e 64b exibem imagens de contraste de fase e confocal, respectivamente, considerando períodos de irradiação de até 30 minutos. Após a abertura dos poros, a assimetria inicial entre sacarose (interior da vesícula) e glicose (exterior da vesícula) não é mais preservada, como pode ser observado na Figura 64a.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵ Parte da membrana é expelida a cada abertura de poros e, como consequência, a área superficial da vesícula diminui. Porém, mesmo para longos períodos de irradiação, a fase Ld não foi destruída, tão

pouco a vesícula como um todo. Apesar da diminuição da área superficial após 30 minutos de irradiação, ainda é possível observar a separação das fases Lo e Ld (Figura 64b).

(a) Contraste de fase



(b) Confocal

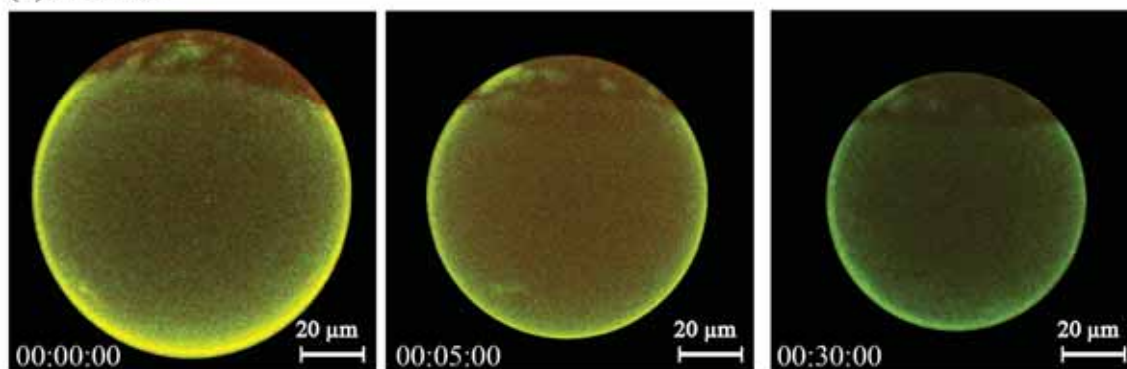


Figura 64: imagens de (a) contraste de fase e (b) confocal para duas GUV distintas compostas pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30) contendo 50 µmol/L de eritrosina em seu meio externo, em função do tempo de irradiação.

DOPC/DPPC/colesterol: 40/30/30 (2)

A Figura 65a exibe as alterações morfológicas da fase Ld, com relação ao tempo de irradiação, observada por microscopia de fluorescência. Para essa composição da mistura (2), as fases se encontram uniformemente distribuídas antes da irradiação. Flutuações da membrana, acompanhadas por alterações morfológicas e aumento de área aparente das vesículas foram observadas nos primeiros 15s de irradiação, relacionados a hidroxidação das cadeias carbônicas do DOPC. Após aproximadamente 4 minutos de irradiação ocorrem a abertura de poros, perda de contraste e diminuição nas dimensões da vesícula. Estes efeitos

são similares ao discutido na seção anterior para a fração da mistura DOPC/DPPC/colesterol (20/50/30).

Interessante é a separação das fases Lo e Ld ativada após aproximadamente 1 minuto de irradiação. Após 2 minutos de irradiação as fases se encontram totalmente separadas, como observado nas imagens confocais exibidas na inserção da Figura 65b. Esse efeito indica um possível deslocamento nos limites de coexistência das fases Lo e Ld, representado no diagrama de fase da Figura 60a. De fato, as alterações moleculares induzidas por hidroperoxidação transformam o diagrama ternário DOPC/DPPC/colesterol (Figura 60a) em um novo diagrama de fases composto pela mistura DOPC(OOH)/DPPC/colesterol(OOH), conforme exibido na Figura 65b. O efeito combinado da foto-oxidação de ambos DOPC e colesterol sobre o diagrama de fases ainda não é claro. Porém, os resultados mostram que a linha limite de coexistência das fases Lo e Ld é deslocada horizontalmente em direção a frações mais elevadas de DOPC, em relação ao diagrama ternário de DOPC/DPPC/colesterol na ausência de espécies oxidadas (Figura 60a). Resultados similares foram encontrados por Haluska *et al.*¹⁸⁵ através da hidroperoxidação do sistema ternário composto pela mistura POPC/DPPC/colesterol utilizando um fotossensibilizador derivado de porfirina (*PE-porph*). Foi observado que a hidroperoxidação do POPC e colesterol desloca as linhas de separação da região de coexistência das fases Lo e Ld em direção a maiores frações de colesterol.

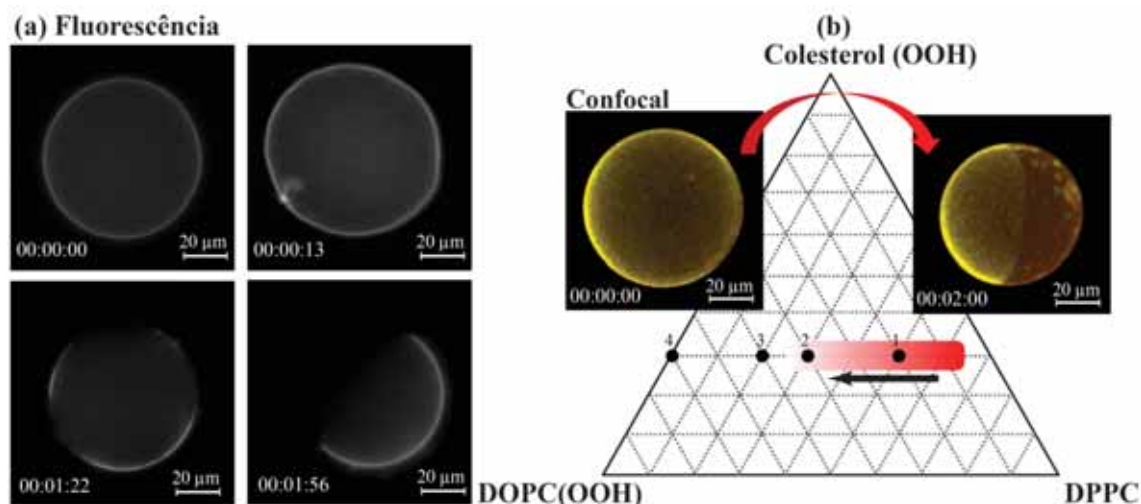


Figura 65: (a) fluorescência em função do tempo de irradiação para uma GUV composta pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (40/30/30) contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina em seu meio externo. (b) Representação do diagrama de fases composto pela mistura DOPC(OOH)/DPPC/colesterol(OOH). A inserção mostra imagens confocais coletadas antes e após 2 minutos de irradiação.

A separação de fases em sistemas binários tem sido observada pela adição de lipídios oxidados (5-15 mol%) ao sistema.¹⁸⁶ Este efeito foi atribuído a alterações na estrutura química da cauda lipídica,¹⁸⁶ que pode facilitar a difusão lateral dos lipídios.¹⁸⁷ Dessa forma, o aumento da área molecular média por fosfolipídio gerado pela hidroxidação das cadeias alifáticas do DOPC deve aumentar a incompatibilidade entre as diferentes fases e induzir sua separação. Complementarmente, Akimov *et al.*¹⁸⁸ demonstraram que a inserção de um lipídio com uma curvatura mais positiva na fase Ld, como pode ser o caso do DOPC hidroxidado, aumenta a tensão lateral na interface com a fase Lo. Como consequência, domínios submicrométricos existentes na membrana na ausência de tensão lateral, podem se fundir sob a presença de uma tensão lateral, formando domínios micrométricos.¹⁸⁸ Por último, transições de fase em misturas de lipídicas com mesma cabeça hidrofílica são regidas pelo grau de organização de suas cadeias alifáticas. A presença de uma insaturação ao longo da cadeia é suficiente para alterar a temperatura de transição de fase líquido-gel e, por consequência, o grau de organização da cadeia. É provável que a hidroxidação tenha um

efeito semelhante. Porém, não foram encontrados dados disponíveis na literatura sobre a transição líquido-gel da forma hidroperoxidada do DOPC.

DOPC/DPPC/colesterol: 50/20/30 (3) e 70/0/30 (4)

As Figuras 66a e 66b exibem imagens de fluorescência com as alterações morfológicas em relação do tempo de irradiação para GUV formadas pela composição (3) e (4), respectivamente. A diminuição da fração de DPPC da composição (2) em direção à mistura binária DOPC/colesterol (4) não mais favorece separação de fases foto-ativada pelo estresse oxidativo. Esse resultado indica que os limites de coexistência das fases Lo e Ld são deslocados para os arredores da composição (2), não atingindo a composição (3). A separação de fases foto-ativada por estresse oxidativo abre uma série de possibilidades para estudos biofísicos. Por exemplo, pode-se supor que a formação de domínios após a oxidação pode facilitar a detecção de lipídios oxidados, sinalizando para a recuperação ou eliminação pela célula. Isso demonstra a importância de estabelecer os diagramas de fase para misturas com formas hidroperoxidadas de DOPC com DPPC e colesterol. Além disso, informações sobre a coexistência de fases entre fosfolipídios e formas oxidadas de colesterol são escassas na literatura. Assim, a influência da oxidação do colesterol no diagrama de fase é também um desafio para trabalhos futuros.

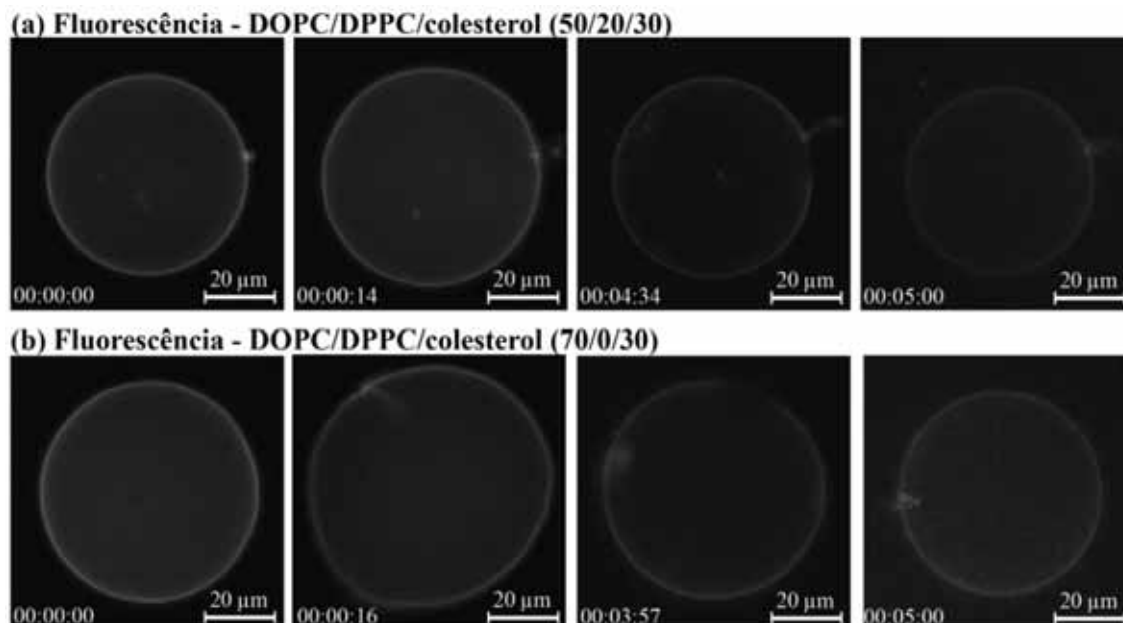


Figura 66: imagens de fluorescência em função do tempo de irradiação para GUV compostas pela mistura de DOPC/DPPC/colesterol (a) 50/20/30 (3) e (b) 70/0/30 (4) contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina no meio externo.

O aumento da fração de DOPC na mistura resulta num comportamento foto-oxidativo similar ao observado para as GUV formadas somente por DOPC: aumento da área aparente nos primeiros 15 segundos de irradiação, abertura de poros após 4 minutos, perda de contraste e diminuição das dimensões da vesícula. O que é comum em todas as composições das misturas estudadas é o maior tempo de irradiação exigido para a abertura de poros, em comparação com GUV formadas apenas por DOPC. Além disso, em todas as composições não foi observada a explosão das vesículas, mesmo para longos períodos de irradiação. Isso deve estar relacionado ao fato de que parte dos oxigênios singletos gerados pela eritrosina agem na hidroxidação do colesterol, diminuindo assim a eficiência na hidroxidação das cadeias insaturadas do DOPC. Kerdous *et al.*¹⁶⁵ trabalhando com a foto-oxidação de misturas binárias de DOPC/colesterol, demonstraram que o aumento na fração de colesterol retarda o efeito de permeabilização da membrana de DOPC, corroborando com os resultados apresentados aqui.

Capítulo 8

8. Conclusões

Filmes nanoestruturados contendo vesículas de DPPG imobilizadas em camadas alternadas de PAH foram fabricados com sucesso utilizando o método *spray*-LbL. A deposição de multicamadas contendo vesículas de DPPG pode ser simplificada e acelerada em 60 vezes pela aplicação das soluções via *spray*. Verificou-se que o controle do crescimento de filmes é perdido para tempos de *spray* maiores que 2 s (4 s e 6 s) e, considerando a fragilidade das vesículas, 10 psi de pressão foi escolhido para evitar uma possível destruição das vesículas. Também foi observado que a etapa de lavagem pode ser descartada sem comprometer as propriedades dos filmes *spray*-LbL. Morfologicamente, as imagens de AFM revelaram que, apesar da pressão aplicada durante o processo de deposição das camadas, as vesículas de DPPG não são destruídas nos filmes *spray*-LbL. A principal diferença em relação ao filme *dipping*-LbL é a distribuição espacial das vesículas de DPPG, que não recobrem completamente a camada de PAH nos filmes *spray*-LbL, o que foi confirmado pelas medidas de SERS. A espessura dos filmes *dipping* e *spray*-LbL estimada também via AFM revelou que os filmes *spray*-LbL são mais espessos, o que corrobora com a maior adsorção de massa observada por absorção no UV-Vis e QCM. Os resultados de FTIR revelaram que interações eletrostáticas entre os grupos PO_4^- (DPPG) e NH_3^+ (PAH) não são as principais forças envolvidas no crescimento dos filmes *spray*-LbL, ao contrário do que foi encontrado para os filmes *dipping*-LbL de PAH/DPPG.

Filmes LbL de DODAB/DPPG exibiu arquiteturas bastante distintas, dependendo se os filmes foram produzidos pelo processo convencional via *dipping*- ou pelo método *spray*. Ao combinar AFM e SERS determinou-se que as vesículas assumiram formas de esferóides em camadas não estratificadas dos filmes *spray*-LbL. Por outro lado, camadas estratificadas

foram obtidas no caso dos filmes *dipping*-LbL. Mais uma vez, constatou-se que interações eletrostáticas desempenham um papel, mas não são a única interação relevante para o crescimento dos filmes *spray*-LbL aqui estudados. A natureza exata das forças envolvidas no crescimento dos filmes *spray*-LbL ainda não é conhecida. Porém, verificou-se que as forças envolvidas no crescimento de filmes *dipping*- e *spray*-LbL contendo os mesmos materiais podem ser diferentes. A importância da arquitetura molecular também fica evidente analisando os dados disponíveis na literatura.

Diferentes conjuntos de sensores foram aplicados com sucesso na detecção de soluções diluídas dos derivados xantênicos eosina e eritrosina. Verificou-se que a arquitetura molecular dos filmes depositados sobre os eletrodos interdigitados de Pt desempenha um papel importante na resposta elétrica (capacitância vs frequência) e, consequentemente, sobre as discriminações das concentrações de solução. A alta sensibilidade alcançada por essas unidades sensoriais está intimamente relacionada a mudanças na morfologia dos filmes em função da adsorção de moléculas de xantênico, conforme evidenciado pela técnica de micro-Raman. Finalmente, a escolha de arquiteturas moleculares adequadas para filmes LbL que compõem unidades sensoriais levou a um conjunto de sensores com elevada sensibilidade para detecção de catecol. Concentrações de até 10^{-12} mol/L puderam ser detectadas utilizando uma camada de tirosinase (Tyr) no topo de filmes LbL contendo lipídios. Significativamente, os métodos de visualização - projeções multidimensionais – puderam ser utilizados para otimizar o desempenho das unidades sensoriais. Por meio destas, foi possível confirmar que um biossensor (unidade sensorial contendo Tyr) é mais eficiente do que um sensor (unidade sensorial sem enzima) na detecção de catecol. A alta sensibilidade alcançada não significa que os conjuntos de sensores aqui apresentados são seletivos a catecol, e pretende-se abordar esta questão em trabalhos futuros com compostos semelhantes, tais como fenol, resorcinol, hidroquinona e ácido salicílico.

Os filmes de Langmuir demonstraram que o derivado xantênico eritrosina apresenta afinidade em estabelecer interações com a membrana lipídica, principalmente quando formada por fosfolipídios insaturados. Interações eletrostáticas entre eritrosina e os grupos polares dos fosfolipídios são relevantes. Porém, o menor empacotamento dos filmes formados pelos fosfolipídios insaturados (DOPG e DOPC) permitiu uma maior inserção da eritrosina, resultado de uma maior interação com a monocamada. De maneira complementar, os efeitos da oxidação lipídica gerados pela foto-ativação do xantênico foram avaliados em vesículas unilamelares gigantes (GUV). Os resultados mostraram que o estresse oxidativo produzido na membrana está relacionado a interações entre os oxigênios singletos e as insaturações das cadeias dos fosfolipídios. O resultado dessa interação é a criação de grupos hidroperóxidos, responsáveis pelo aumento global da área superficial das vesículas, devido às alterações conformacionais impostas pela migração do grupo mais hifrofílico à superfície da bicamada. Através da metodologia bio-adesiva determinou-se um aumento de área superficial relativo de aproximadamente 18% e 14% para GUV de DOPC e POPC, respectivamente. A origem desta diferença foi relacionada ao número de insaturações encontradas nas cadeias dos fosfolipídios: duas insaturações nas cadeias carbônicas de DOPC e apenas uma nas cadeias do POPC. Portanto, a bicamada de DOPC totalmente hidroperoxidada possui mais grupos hidroperóxidos da interface bicamada/água quando comparada à bicamada de POPC.

Finalmente, a oxidação lipídica afeta o equilíbrio do sistema ternário formado pela mistura DOPC/DPPC/colesterol. Haja vista a composição da mistura 30/40/30, inicialmente numa fase líquida uniforme, cuja separação das fases líquido-ordenada e líquido-desordenada é foto-ativada. As alterações moleculares induzidas por hidroperoxidação transformam o diagrama ternário DOPC/DPPC/colesterol em um novo diagrama de fases composto pela mistura DOPC(OOH)/DPPC/colesterol(OOH). O efeito combinado da foto-oxidação de ambos, DOPC e colesterol, resultaram num deslocamento da linha limite de coexistência das

fases líquido-ordenada e líquido-desordenada em direção a frações mais elevadas de DOPC. O aumento da área molecular média por fosfolípido gerado pela hidroxidação das cadeias alifáticas do DOPC deve aumentar a incompatibilidade entre as diferentes fases e induzir sua separação.

Considerações finais

Esta tese de doutorado apresentou resultados a partir das atividades executadas no período de março/2011 a novembro/2014 referentes ao projeto de doutorado financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP processo nº 2010/17965-0. Este projeto é uma continuação do trabalho de mestrado, o qual foi desenvolvido por um período de 24 meses (FAPESP 2008/07241-5), abordando a fabricação e caracterização estrutural de filmes LbL contendo multicamadas de fosfolípidios. Foi realizado, ainda, um estágio de doutorado no exterior (BEPE 2012/01610-4) junto ao Instituto Charles Sadron da Universidade de Strasbourg, França (01/06/2012 a 31/05/2013), sob a orientação do professor Carlos M. Marques, no estudo de sistemas miméticos de membrana biológica baseados em vesículas unilamelares gigantes (GUV). Esta tese contou com a co-orientação do professor Dr. Wilker Caetano da UEM/Maringá, que atua na área de biofísica molecular, e com a colaboração do professor Dr. Antonio Riul Jr. da UNICAMP, especialista em sensores para meio líquido (“língua eletrônica”).

É importante ressaltar que o conteúdo apresentado no capítulo IV e os resultados do capítulo VI relacionados a detecção do xantênico eosina, foram adaptados e reproduzidos de “Aoki P H B, Volpati D, Cabrera F C, Trombini V L, Riul Jr A, Constantino C J L, Spray Layer-by-Layer Films Based on Phospholipid Vesicles Aiming Sensing Application Via E-Tongue System. *Materials Science and Engineering: C* 2012; 32(4): 862-871. Copyright (2012)” com permissão da Elsevier. O conteúdo apresentado no capítulo V e os resultados do

capítulo VI relacionados a detecção do xantênico eritrosina, foram adaptados e reproduzidos de “Aoki P H B, Alessio P, Volpati D, Paulovich F V, Riul A, Jr., Oliveira O N, Jr., Constantino C J L, *On the Distinct Molecular Architectures of Dipping- and Spray-Lbl Films Containing Lipid Vesicles. Materials Science & Engineering: C* 2014; 41: 363-71. Copyright (2014)” com permissão da Elsevier. Os resultados do capítulo VI relacionados a fabricação de biossensores para a detecção de catecol foram adaptados e reproduzidos de “Aoki P H B, Alessio P, Furini L N, Constantino C J L, Neves T T A T, Paulovich F V, de Oliveira M C F, Oliveira O N, Jr., *Molecularly Designed Layer-by-Layer (Lbl) Films to Detect Catechol Using Information Visualization Methods. Langmuir* 2013; 29(24): 7542-50. Copyright (2013)” com permissão da American Chemical Society. O conteúdo do capítulo III é uma composição dos procedimentos experimentais encontrado nas três publicações citadas anteriormente, também reproduzido com as devidas permissões.

Referências

1. J. Li, Q. He and X. Yan, *Molecular Assembly of Biomimetic Systems*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2011.
2. P. H. B. Aoki, W. Caetano, D. Volpati, A. Riul, Jr. and C. J. L. Constantino, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008, **8**, 4341-4348.
3. P. H. B. Aoki, D. Volpati, A. Riul, W. Caetano and C. J. L. Constantino, *Langmuir*, 2009, **25**, 2331-2338.
4. P. H. B. Aoki, P. Alessio, A. Riul, J. A. D. Saez and C. J. L. Constantino, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 3537-3546.
5. P. H. B. Aoki, P. Alessio, M. L. Rodriguez-Mendez, J. A. D. Saez and C. J. L. Constantino, *Langmuir*, 2009, **25**, 13062-13070.
6. G. Decher, *Science*, 1997, **277**, 1232-1237.
7. G. Decher, J. D. Hong and J. Schmitt, *Thin Solid Films*, 1992, **210**, 831-835.
8. J. B. Schlenoff, S. T. Dubas and T. Farhat, *Langmuir*, 2000, **16**, 9968-9969.
9. E. Sackmann, in *Handbook of Biological Physics* Elsevier, 1995.
10. W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, J. Hardin and G. P. Bertoni, *The World of the Cell*, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009.
11. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science* 1972, **175**, 720-731.
12. D. M. Engelman, *Nature*, 2005, **438**, 578-580.
13. S. Damjanovich, L. Bene, J. Matko, L. Matyus, Z. Krasznai, G. Szabo, C. Pieri, R. Gaspar and J. Szollosi, *Biophysical Chemistry*, 1999, **82**, 99-108.
14. S. Damjanovich, R. Gaspar and C. Pieri, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1997, **30**, 67-106.
15. S. Damjanovich, J. Matko, L. Matyus, G. Szabo, J. Szollosi, J. C. Pieri, T. Farkas and R. Gaspar, *Cytometry*, 1998, **33**, 225-233.
16. C. Dietrich, B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi and K. Jacobson, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 274-284.
17. M. Edidin, *Journal of Cell Science*, 1993, 165-169.
18. J. W. Goding and J. E. Layton, *Journal of Experimental Medicine*, 1976, **144**, 852-857.
19. A. Kusumi, Y. Sako and M. Yamamoto, *Biophysical Journal*, 1993, **65**, 2021-2040.
20. K. Simons and E. Ikonen, *Nature*, 1997, **387**, 569-572.
21. G. Vereb, J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann and S. Damjanovich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**, 8053-8058.
22. G. Brezesinski and H. Mohwald, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2003, **100**, 563-584.
23. H. Brockman, *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, **9**, 438-443.
24. R. M. Leblanc, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, **10**, 529-536.
25. W. Caetano, P. S. Haddad, R. Itri, D. Severino, V. C. Vieira, M. S. Baptista, A. P. Schroder and C. M. Marques, *Langmuir*, 2007, **23**, 1307-1314.
26. A. Yamada, M. Le Berre, K. Yoshikawa and D. Baigl, *Chembiochem*, 2007, **8**, 2215-2218.
27. M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, *Faraday Discussions*, 1986, **81**, 303-+.
28. P. Walde, K. Cosentino, H. Engel and P. Stano, *Chembiochem*, 2010, **11**, 848-865.
29. K. A. Riske, T. P. Sudbrack, N. L. Archilha, A. F. Uchoa, A. P. Schroder, C. M. Marques, M. S. Baptista and R. Itri, *Biophysical Journal*, 2009, **97**, 1362-1370.

30. M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1987, **152**, 89-104.
31. D. S. Dimitrov and M. I. Angelova, *Studia Biophysica*, 1987, **119**, 61-65.
32. D. S. Dimitrov and M. I. Angelova, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1988, **19**, 323-336.
33. M. I. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon and P. Bothorel, *PREPARATION OF GIANT VESICLES BY EXTERNAL AC ELECTRIC-FIELDS - KINETICS AND APPLICATIONS*, 1992.
34. L. A. Bagatolli and E. Gratton, *Biophysical Journal*, 2000, **78**, 290-305.
35. O. Wesolowska, K. Michalak, J. Maniewska and A. B. Hendrich, *Acta Biochimica Polonica*, 2009, **56**, 33-39.
36. G. W. Feigenson, in *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2007, pp. 63-77.
37. J. Wolff, C. M. Marques and F. Thalmann, *Physical Review Letters*, 2011, **106**.
38. G. Leidy, W. F. Wolkers, K. Jorgensen, O. G. Mouritsen and J. H. Crowe, *Biophysical Journal*, 2001, **80**, 1819-1828.
39. T. Y. Wang, R. Leventis and J. R. Silvius, *Biophysical Journal*, 2000, **79**, 919-933.
40. S. Fahsel, E. M. Pospiech, M. Zein, T. L. Hazlet, E. Gratton and R. Winter, *Biophysical Journal*, 2002, **83**, 334-344.
41. J. T. Marques, A. S. Viana and R. F. M. De Almeida, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2011, **1808**, 405-414.
42. O. Wesolowska, K. Michalak and A. B. Hendrich, *Molecular Membrane Biology*, 2011, **28**, 103-114.
43. R. K. Iler, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1966, **21**, 569-&.
44. L. Netzer and J. Sagiv, *Journal of the American Chemical Society*, 1983, **105**, 674-676.
45. M. Ferreira, J. H. Cheung and M. F. Rubner, *Thin Solid Films*, 1994, **244**, 806-809.
46. J. H. Cheung, A. F. Fou and M. F. Rubner, *Thin Solid Films*, 1994, **244**, 985-989.
47. Y. Y. Zhang, R. Yuan, Y. Q. Chai, Y. Xiang, C. L. Hong and X. Q. Ran, *Biochemical Engineering Journal*, 2010, **51**, 102-109.
48. W. Zhang, T. Yang, W. J. Li, G. C. Li and K. Jiao, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, **25**, 2370-2374.
49. J. R. Siqueira, L. Caseli, F. N. Crespilho, V. Zucolotto and O. N. Oliveira, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, **25**, 1254-1263.
50. A. Izquierdo, S. S. Ono, J. C. Voegel, P. Schaaf and G. Decher, *Langmuir*, 2005, **21**, 7558-7567.
51. O. Felix, Z. Q. Zheng, F. Cousin and G. Decher, *Comptes Rendus Chimie*, 2009, **12**, 225-234.
52. G. Popa, F. Boulmedais, P. Zhao, J. Hemmerle, L. Vidal, E. Mathieu, O. Felix, P. Schaaf, G. Decher and J. C. Voegel, *Acs Nano*, 2010, **4**, 4792-4798.
53. A. Buffet, M. M. A. Kashem, J. Perlich, G. Herzog, M. Schwartzkopf, R. Gehrke and S. V. Roth, *Advanced Engineering Materials*, 2010, **12**, 1235-1239.
54. J. S. Kim, W. S. Chung, K. Kim, D. Y. Kim, K. J. Paeng, S. M. Jo and S. Y. Jang, *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**, 3538-3546.
55. A. Wolz, S. Zils, M. Michel and C. Roth, *Journal of Power Sources*, 2010, **195**, 8162-8167.
56. J. B. Lu, B. Kumar, M. Castro and J. F. Feller, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2009, **140**, 451-460.
57. Q. F. Liu, T. Fujigaya, H. M. Cheng and N. Nakashima, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 16581-16586.

58. V. H. Pham, T. V. Cuong, S. H. Hur, E. W. Shin, J. S. Kim, J. S. Chung and E. J. Kim, *Carbon*, 2010, **48**, 1945-1951.
59. G. M. Nogueira, D. Banerjee, R. E. Cohen and M. F. Rubner, *Langmuir*, 2011, **27**, 7860-7867.
60. N. Fukao, K. H. Kyung, K. Fujimoto and S. Shiratori, *Macromolecules*, 2011, **44**, 2964-2969.
61. T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin and A. Schepartz, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 438-+.
62. S. Kamino, H. Ichikawa, S.-i. Wada, Y. Horio, Y. Usami, T. Yamaguchi, T. Koda, A. Harada, K. Shimanuki, M. Arimoto, M. Doi and Y. Fujita, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, **18**, 4380-4384.
63. T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano and T. Nagano, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 6555-6562.
64. E. Slyusareva, A. Sizykh, A. Tyagi and A. Penzkofer, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2009, **208**, 131-140.
65. D. Setiawan, A. Kazaryan, M. A. Martoprawiro and M. Filatov, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 11238-11244.
66. S. Miljanic, A. Dijanosic and Z. Meic, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, **75**, 1008-1012.
67. N. P. W. Pieczonka, G. Moula and R. F. Aroca, *Langmuir*, 2009, **25**, 11261-11264.
68. N. V. Kozel and N. V. Shalygo, *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, **56**, 316-322.
69. P. Mandal, M. Bardhan and T. Ganguly, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2010, **99**, 78-86.
70. C.-C. Chang, Y.-T. Yang, J.-C. Yang, H.-D. Wu and T. Tsai, *Dyes and Pigments*, 2008, **79**, 170-175.
71. R. Giri, J. R. Goodell, C. Xing, A. Benoit, H. Kaur, H. Hiasa and D. M. Ferguson, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, **18**, 1456-1463.
72. C. Soldani, A. C. Croce, M. G. Bottone, A. Frascini, M. Biggiogera, G. Bottioli and C. Pellicciari, *Histochemistry and Cell Biology*, 2007, **128**, 485-495.
73. K. Chibale, M. Visser, D. van Schalkwyk, P. J. Smith, A. Saravanamuthu and A. H. Fairlamb, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 2289-2296.
74. J. P. Brown, G. W. Roehm and R. J. Brown, *Mutation Research*, 1978, **56**, 249-271.
75. A. B. C. Alvares, C. Diaper and S. A. Parsons, *Environmental Technology*, 2001, **22**, 409-427.
76. Y. Yang, Y. H. Guo, C. W. Hu, C. J. Jiang and E. B. Wang, *Journal of Materials Chemistry*, 2003, **13**, 1686-1694.
77. R. Pelegrini, P. Peralta-Zamora, A. R. de Andrade, J. Reyes and N. Duran, *Applied Catalysis B-Environmental*, 1999, **22**, 83-90.
78. P. H. B. Aoki, D. Volpati, W. Caetano and C. J. L. Constantino, *Vibrational Spectroscopy*, 2010, **54**, 93-102.
79. P. Alessio, F. J. Pavinatto, O. N. Oliveira, Jr., J. A. De Saja Saez, C. J. L. Constantino and M. Luz Rodriguez-Mendez, *Analyst*, 2010, **135**, 2591-2599.
80. F. J. Pavinatto, E. G. R. Fernandes, P. Alessio, C. J. L. Constantino, J. A. de Saja, V. Zucolotto, C. Apetrei, O. N. Oliveira, Jr. and M. L. Rodriguez-Mendez, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**, 4995-5003.
81. C. Apetrei, P. Alessio, C. J. L. Constantino, J. A. de Saja, M. L. Rodriguez-Mendez, F. J. Pavinatto, E. G. R. Fernandes, V. Zucolotto and O. N. Oliveira, *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, **26**, 2513-2519.

82. L. Caseli, F. N. Crespilho, T. M. Nobre, M. E. D. Zaniquelli, V. Zucolotto and O. N. Oliveira, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **319**, 100-108.
83. T. E. Goto, R. F. Lopez, O. N. Oliveira and L. Caseli, *Langmuir*, 2010, **26**, 11135-11139.
84. T. F. Schmidt, L. Caseli, T. Viitala and O. N. Oliveira, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008, **1778**, 2291-2297.
85. B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
86. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.
87. J. N. Israelchivili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, 1992.
88. D. D. Lasic, *Biochemical Journal*, 1988, **256**, 1-11.
89. A. H. Kunding, M. W. Mortensen, S. M. Christensen and D. Stamou, *Biophysical Journal*, 2008, **95**, 1176-1188.
90. J. Radler and E. Sackmann, *Journal De Physique II*, 1993, **3**, 727-748.
91. L. Limozin and K. Sengupta, *Chemphyschem*, 2009, **10**, 2752-2768.
92. Y. Sun, Université de Strasbourg, Strasbourg, 2010.
93. G. P. C. Drummen, *Molecules*, 2012, **17**, 14067-14090.
94. V. Studer, J. Bobin, M. Chahid, H. S. Mousavi, E. Candes and M. Dahan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**, E1679-E1687.
95. E. Feitosa, G. Karlsson and K. Edwards, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2006, **140**, 66-74.
96. J. Minones, P. Dynarowicz-Latka, J. M. R. Patino and E. Iribarnegaray, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, **265**, 380-385.
97. J. M. Boggs, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1987, **906**, 353-404.
98. M. C. Sainz, J. R. Chantres, B. Elorza and M. A. Elorza, *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, **89**, 183-190.
99. P. H. B. Aoki, D. Volpati, F. C. Cabrera, V. L. Trombini, A. Riul Jr and C. J. L. Constantino, *Materials Science and Engineering: C*, 2012, **32**, 862-871.
100. D. M. Taylor and A. G. Macdonald, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 1987, **20**, 1277-1283.
101. M. L. Moraes, L. Petri, V. Oliveira, C. A. Olivati, M. C. F. de Oliveira, F. V. Paulovich, O. N. Oliveira and M. Ferreira, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2012, **166**, 231-238.
102. M. L. Moraes, U. P. Rodrigues, O. N. Oliveira and M. Ferreira, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2007, **11**, 1489-1495.
103. P. Geladi, A. Nelson and B. Lindholm-Sethson, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **595**, 152-159.
104. A. K. Gorban, B.; Wunsch, D.; Zinovyev, A. , *Principal Manifolds for Data Visualisation and Dimension Reduction*, Springer, Berlin, 2007.
105. E. Tejada, R. Minghim and L. G. Nonato, *Information Visualization*, 2003, **2**, 218-231.
106. E. Tejada, R. Minghim and L. G. Nonato, *Information Visualization* 2003, **2**, 218-231.
107. F. V. Paulovich and R. Minghim, *Ieee Transactions on Visualization and Computer Graphics*, 2008, **14**, 1229-1236.
108. R. Minghim, F. V. Paulovich and A. A. Lopes, in *IS&T/SPIE Symposium on Electronic Imaging - Visualization and Data Analysis*, 2006, pp. S1-S12.
109. J. W. Sammon, Jr., *Computers, IEEE Transactions on*, 1969, **C-18**, 401-409.
110. F. V. Paulovich, M. L. Moraes, R. M. Maki, M. Ferreira, O. N. Oliveira, Jr. and M. C. F. de Oliveira, *Analyst*, 2011, **136**, 1344-1350.

111. F. V. Paulovich, R. M. Maki, M. C. F. de Oliveira, M. C. Colhone, F. R. Santos, V. Migliaccio, P. Ciancaglini, K. R. Perez, R. G. Stabeli, A. C. Perinoto, O. N. Oliveira, Jr. and V. Zucolotto, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, **400**, 1153-1159.
112. O. N. Oliveira Jr., F. J. Pavinatto, C. J. L. Constantino, F. V. Paulovich and M. C. F. de Oliveira, *Biointerphases*, 2012, **7**.
113. G. Sauerbrey, *Zeitschrift Fur Physik*, 1959, **155**, 206-222.
114. D. S. Pellosi, B. M. Estevao, J. Semensato, D. Severino, M. S. Baptista, M. J. Politi, N. Hioka and W. Caetano, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2012, **247**, 8-15.
115. P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski and F. R. Salemme, *Science*, 1989, **243**, 85-88.
116. E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing and I. Lundstrom, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **147**, 103-118.
117. A. V. Krasnoslobodtsev and S. N. Smirnov, *Langmuir*, 2002, **18**, 3181-3184.
118. A. Michel, A. Izquierdo, G. Decher, J. C. Voegel, P. Schaaf and V. Ball, *Langmuir*, 2005, **21**, 7854-7859.
119. P. H. B. Aoki, P. Alessio, J. A. De Saja and C. J. L. Constantino, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, **41**, 40-48.
120. A. A. Duarte, P. J. Gomes, J. H. F. Ribeiro, P. A. Ribeiro, S. V. Hoffmann, N. J. Mason, O. N. Oliveira, Jr. and M. Raposo, *European Physical Journal E*, 2013, **36**.
121. C. Bonazzola and E. J. Calvo, *Langmuir*, 2003, **19**, 5279-5286.
122. A. Dicko, H. Bourque and M. Pezolet, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998, **96**, 125-139.
123. K. O. Kwon, M. J. Kim, M. Abe, T. Ishinomori and K. Ogino, *Langmuir*, 1994, **10**, 1415-1420.
124. G. Mao, J. Desai, C. R. Flach and R. Mendelsohn, *Langmuir*, 2008, **24**, 2025-2034.
125. R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, 2006.
126. P. Alessio, C. J. L. Constantino, R. F. Aroca and O. N. Oliveira, Jr., *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2010, **55**, 469-478.
127. G. Moula and R. F. Aroca, *Analytical Chemistry*, 2011, **83**, 284-288.
128. C. H. Porcel, A. Izquierdo, V. Ball, G. Decher, J. C. Voegel and P. Schaaf, *Langmuir*, 2005, **21**, 800-802.
129. I. Langmuir, *Journal of the American Chemistry Society*, 1917, **39**, 1848-1906.
130. K. B. Blodgett, *Journal of the American Chemistry Society*, 1935, **57**, 1007-1022.
131. S. Hecht, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, **42**, 24-26.
132. K. Ariga, M. V. Lee, T. Mori, X.-Y. Yu and J. P. Hill, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2010, **154**, 20-29.
133. K. Ariga, M. Li, G. J. Richards and J. P. Hill, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2011, **11**, 1-13.
134. K. Ariga, Q. Ji, M. J. McShane, Y. M. Lvov, A. Vinu and J. P. Hill, *Chemistry of Materials*, 2012, **24**, 728-737.
135. M. Osada and T. Sasaki, *Advanced Materials*, 2012, **24**, 210-228.
136. R. Rajbhandari, L. K. Shrestha and R. R. Pradhananga, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2012, **12**, 7002-7009.
137. K. Ariga, S. Ishihara, H. Abe, M. Li and J. P. Hill, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 2369-2377.
138. M. C. Zaretsky, L. Mouayad and J. R. Melcher, *Ieee Transactions on Electrical Insulation*, 1988, **23**, 897-917.

139. A. Gorban, B. Kegl, D. Wunsch and A. Zinovyev, *Principal Manifolds for Data Visualisation and Dimension Reduction*, Springer, Berlin, 2007.
140. D. Volpati, P. H. B. Aoki, C. A. R. Dantas, F. V. Paulovich, M. C. F. de Oliveira, O. N. Oliveira, Jr., A. Riul, Jr., R. F. Aroca and C. J. L. Constantino, *Langmuir*, 2012, **28**, 1029-1040.
141. V. A. Narayanan, D. L. Stokes and V. D. Tuan, *Journal of Raman Spectroscopy*, 1994, **25**, 415-422.
142. R. Rossetti and L. E. Brus, *Journal of the American Chemical Society*, 1984, **106**, 4336-4340.
143. P. H. B. Aoki, E. G. E. Carreon, D. Volpati, M. H. Shimabukuro, C. J. L. Constantino, R. F. Aroca, O. N. Oliveira, Jr. and F. V. Paulovich, *Applied Spectroscopy*, 2013, **67**, 563-569.
144. L. J. Yang, H. Y. Xiong, X. H. Zhang and S. F. Wang, *Bioelectrochemistry*, 2012, **84**, 44-48.
145. F. Karim and A. N. M. Fakhruddin, *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2012, **11**, 261-274.
146. V. Zucolotto, A. P. A. Pinto, T. Tumolo, M. L. Moraes, M. S. Baptista, A. Riul, A. P. U. Araujo and O. N. Oliveira, *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, **21**, 1320-1326.
147. O. N. Oliveira, Jr., F. J. Pavinatto, C. J. L. Constantino, F. V. Paulovich and M. C. F. de Oliveira, *Biointerphases*, 2012, **7**, 53-53.
148. D. A. Robb and S. Gutteridge, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 1481-1485.
149. S. S. Shiratori and M. F. Rubner, *Macromolecules*, 2000, **33**, 4213-4219.
150. R. Minghim, F. V. Paulovich and A. d. Andrade Lopes, in *Visualization and Data Analysis 2006*, eds. R. F. Erbacher, J. C. Roberts, M. T. Grohn and K. Borner, 2006.
151. A. A. Ensafi, H. Karimi-Maleh, S. Mallakpour and B. Rezaei, *Colloids and Surfaces B-Biointerphases*, 2011, **87**, 480-488.
152. S. M. Mobin, B. J. Sanghavi, A. K. Srivastava, P. Mathur and G. K. Lahiri, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 5983-5992.
153. N. C. M. Zanon, O. N. Oliveira and L. Caseli, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, **373**, 69-74.
154. A. P. Girard-Egrot, S. Godoy and L. J. Blum, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2005, **116**, 205-225.
155. L. Caseli, M. L. Moraes, V. Zucolotto, M. Ferreira, T. M. Nobre, M. E. D. Zaniquelli, U. P. Rodrigues and O. N. Oliveira, *Langmuir*, 2006, **22**, 8501-8508.
156. M. Ferreira, P. A. Fiorito, O. N. Oliveira and S. I. C. de Torresi, *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, **19**, 1611-1615.
157. L. Caseli, D. S. dos Santos, M. Foschini, D. Goncalves and O. N. Oliveira, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **303**, 326-331.
158. V. R. Batistela, D. S. Pelloso, F. D. de Souza, W. F. da Costa, S. M. de Oliveira Santin, V. R. de Souza, W. Caetano, H. P. M. de Oliveira, I. S. Scarminio and N. Hioka, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, **79**, 889-897.
159. Y. Ishitsuka, D. S. Pham, A. J. Waring, R. I. Lehrer and K. Y. C. Lee, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2006, **1758**, 1450-1460.
160. C. J. Gomer, *Photodynamic therapy: methods and protocols*, *Methods in molecular biology*, Springer New York, 2010.
161. L. I. Grossweiner, L. R. Jones, J. B. Grossweiner and B. H. G. Rogers, *The science of phototherapy: an introduction* Springer, Dordrecht, 2005.
162. M. Ochsner, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1997, **39**, 1-18.
163. D. P. Valenzano, *Photochemistry and Photobiology*, 1987, **46**, 147-160.

164. J. Heuvingh and S. Bonneau, *Biophysical Journal*, 2009, **97**, 2904-2912.
165. R. Kerdous, J. Heuvingh and S. Bonneau, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2011, **1808**, 2965-2972.
166. A. W. Girotti, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2001, **63**, 103-113.
167. G. Vanginkel, J. M. Muller, F. Siemsen, A. A. Vantveld, L. J. Korstanje, M. A. M. Vanzandvoort, M. L. Wratten and A. Sevanian, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 1992, **88**, 1901-1912.
168. J. Wong-Ekkabut, Z. T. Xu, W. Triampo, I. M. Tang, D. P. Tieleman and L. Monticelli, *Biophysical Journal*, 2007, **93**, 4225-4236.
169. G. R. Buettner, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, **300**, 535-543.
170. G. R. Buettner and B. A. Jurkiewicz, *Radiation Research*, 1996, **145**, 532-541.
171. M. R. M. Domingues, A. Reis and P. Domingues, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008, **156**, 1-12.
172. E. Karatekin, O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P. H. Puech and F. Brochard-Wyart, *Biophysical Journal*, 2003, **84**, 1734-1749.
173. L. Cwiklik and P. Jungwirth, *Chemical Physics Letters*, 2010, **486**, 99-103.
174. M. L. Hisette, P. Haddad, T. Gisler, C. M. Marques and A. P. Schroder, *Soft Matter*, 2008, **4**, 828-832.
175. D. Cuvelier and P. Nassoy, *Physical Review Letters*, 2004, **93**.
176. G. Weber, T. Charitat, M. S. Baptista, A. F. Uchoa, H. C. Junqueira, R. Itri, C. M. Marques and A. P. Schroder, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **In press**.
177. S. L. Veatch and S. L. Keller, *Biophysical Journal*, 2003, **85**, 3074-3083.
178. D. Bach and E. Wachtel, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2003, **1610**, 187-197.
179. J. Y. Huang, J. T. Buboltz and G. W. Feigenson, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1999, **1417**, 89-100.
180. J. Juhasz, F. J. Sharom and J. H. Davis, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2009, **1788**, 2541-2552.
181. J. M. Crane and L. K. Tamm, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 2965-2979.
182. C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson and E. Gratton, *Biophysical Journal*, 2001, **80**, 1417-1428.
183. A. G. Ayuyan and F. S. Cohen, *Biophysical Journal*, 2006, **91**, 2172-2183.
184. T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb and G. W. Feigenson, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2007, **1768**, 2182-2194.
185. C. K. Haluska, M. S. Baptista, A. U. Fernandes, A. P. Schroder, C. M. Marques and R. Itri, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2012, **1818**, 666-672.
186. P. D. Schley, D. N. Brindley and C. J. Field, *Journal of Nutrition*, 2007, **137**, 548-553.
187. L. Beranova, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof and P. Jungwirth, *Langmuir*, 2010, **26**, 6140-6144.
188. S. A. Akimov, P. I. Kuzmin, J. Zimmerberg and F. S. Cohen, *Physical Review E*, 2007, **75**.