

# INCT de Fluidos Complexos

Proc. N°: 2014/50983-3 (FAPESP) e 465259/2014-6 (CNPq)

Vigência: de 01/07/2017 a 30/06/2023 e 25/11/2016 a 30/11/2022

Recursos aprovados: R\$ 9.657.980,48

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto

Sede: Instituto de Física da USP

## RELATÓRIO DE ATIVIDADES ANO 5 (julho de 2021 a junho de 2022)

### Resumo

Neste projeto propomos o aperfeiçoamento e continuidade das atividades do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx), com a missão de congrega profissionais das áreas de física, química, biologia, farmácia, medicina, engenharia biomédica, matemática e estatística, em torno de problemas que requeiram um enfoque multidisciplinar envolvendo fluidos complexos, para gerar conhecimentos de fronteira, disseminá-los no ambiente acadêmico e divulgá-los à sociedade. Os fluidos complexos são sistemas formados por várias moléculas que se auto-agregam e geram constituintes básicos com diferentes escalas de tamanho, dando origem a propriedades características. Esta proposta do INCT-FCx foi precedida do Instituto do Milênio de Fluidos Complexos, que focalizou as atividades em cristais líquidos, colóides magnéticos e fluidos biológicos, seguida do INCT-FCx, que teve ênfase em agregados supra-moleculares de interesse biológico, principalmente membranas e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) além do assunto dos cristais líquidos e ferrofluidos. Este projeto pretende focalizar as atividades propostas em sistemas multi-componentes que apresentam auto-agregação molecular em condições termodinâmica específicas, como os cristais líquidos, nanopartículas e colóides magnéticos, micelas, lipossomas e vesículas, surfactantes, complexos surfactantes-membranas, surfactantes-proteínas e surfactantes-DNA, e lipoproteínas de alta e baixa densidade. Incorporamos a esta proposta novos pesquisadores, potencializando a atuação da rede formada na área de Fluidos Complexos. As atividades de pesquisa terão ênfase em (i) materiais/sistemas modelo, em condições físico-químicas controladas em laboratório, que visam a obtenção de relações entre estrutura e atividade ou função biológica e a dinâmica das interfaces, a fim de entender as interações moleculares que produzem o comportamento complexo; (ii) novos materiais, que serão desenvolvidos, sintetizados e caracterizados com finalidade de aplicações tecnológicas e médicas; e (iii) materiais biológicos, em particular lipoproteínas de baixa e alta densidade, que visam aplicação em medicina e imunologia. O projeto foi dividido em 3 subprojetos, que serão apresentados em seções subsequentes, e têm os seguintes marcos: (i) desenvolvimento de conhecimento em física básica: investigar as fases nemáticas biaxiais na escala microscópica e elucidar se as micelas apresentam simetria ortorrômbica; estudar efeitos de superfície e organização molecular em sistemas com ordem líquido cristalina; estudar e compreender a seletividade iônica interfacial de micelas e como isso altera suas propriedades; recriar a partir de membranas-modelo situações que são encontradas em células de seres vivos; confeccionar membranas-modelo e propor mecanismos de ação lítica e possíveis caminhos para a obtenção de novos fármacos; estudar propriedades físicas e físico-químicas de diversos tipos de membranas-modelo, caracterizando-as estruturalmente e descrevendo suas interações com biossensores fluorescentes, peptídeos microbianos, surfactantes e proteínas; propor novos modelos teóricos, estatísticos ou atomísticos em multiescala, e ferramentas computacionais para estudar as interações de sistemas supramoleculares de alta densidade e prever situações pouco acessíveis aos experimentos; (ii) desenvolvimento de aplicações tecnológicas como: *displays*, materiais inteligentes com cristais líquidos, partículas coloidais com ordem líquido cristalina, fases nemáticas biaxiais termotrópicas em filmes finos, dispositivos eletro-ópticos, elastômeros dopados com partículas magnéticas e corantes para o controle mecânico via campos externo; carregadores que controlem a entrega de fármacos e outros materiais, incluindo material genético para células, visando a terapia genética com complexos DNA-surfactantes; e materiais biocompatíveis visando implantes sintéticos através do estudo da adesão de proteínas em substratos sólidos; (iii) desenvolvimento de novos materiais através da síntese e caracterização de nanopartículas, colóides magnéticos e peptídeos microbianos com aplicações biomédicas; (iv) caracterização de aspectos fisiopatológicos, diagnósticos e de aplicação prática, envolvendo principalmente o tratamento das doenças cardiovasculares e de neoplasias: desenvolver novos métodos de diagnóstico das doenças cardiovasculares utilizando técnicas de físico-química, em particular técnicas de óptica não-linear, lipidômica e ressonância magnética nuclear; utilizar vetores

de droga para o tratamento das doenças cardiovasculares relacionados às lipoproteínas de transporte do colesterol nos seres humanos; disponibilizar no Brasil uma metodologia de análise do plasma humano, por meio da ressonância magnética nuclear, que forneça de maneira rápida e barata o perfil das lipoproteínas.

## Introdução

O relatório aqui apresentado traz os principais resultados obtidos pela equipe na investigação dos temas do nosso Projeto.

Neste quinto ano de atividades do novo INCT-FCx é possível notar os progressos na sinergia entre os enfoques e membros da equipe do Instituto. O total de trabalhos publicados no período foi de **176** artigos. Foram publicados 9 artigos em periódicos de divulgação internacional com participação de mais de um Grupo do INCT.

Apesar dos problemas trazidos pela pandemia da COVID-19, que reduziu significativamente nossa mobilidade entre laboratórios e acesso aos próprios laboratórios, descrevemos, a seguir, os principais resultados das pesquisas por nós desenvolvidas, enfatizando aquelas em que houve a colaboração efetiva de membros de diferentes Grupos do INCT. O relatório traz os assuntos de pesquisa nos quais as interações e interdisciplinaridade procurou ser evidenciada.

Há 4 anexos a este relatório: I) explicita a produção científica, a formação de estudantes e informações complementares; II) traz a lista de seminários do Instituto proferidos de forma *online* no período; III) Relatório sobre gestão de dados; IV) Solicitação de prorrogação do projeto e programa de atividades.

**O CNPq resolveu complementar os recursos dos INCTs, recompondo o corte de 30% efetuado por ocasião da divulgação do resultado da chamada em 2017. Assim, romperam a paridade anteriormente estabelecida com as FAPs de para cada R\$ 1 do CNPq, as FAPs colocariam R\$ 1. Além dessa recomposição orçamentária, o CNPq prorrogou a vigência dos atuais INCTs até 2024 (especificamente, 30/11/2024). Apresentamos ao Conselho um projeto de pesquisa e de aplicação desses recursos para os próximos 2 anos da prorrogação (anexo IV a esta solicitação, que foi aprovado pelo CNPq). Dessa forma, solicito à Fundação a prorrogação da vigência do nosso INCT de Fluidos Complexos, sem custos adicionais para a FAPESP, acompanhando a prorrogação concedida pelo CNPq. Cabe ressaltar que a pandemia de COVID-19 prejudicou bastante nossas atividades de laboratório e de intercâmbio de docentes e estudantes de graduação e pós-graduação.**

### 1) Síntese dos principais resultados alcançados no período

#### a) Eventual fator protetivo para as LDLs promovido por terapias hipolipemiantes e antiplaquetárias

Os pesquisadores, pós-doutores e estudantes pós-graduação e graduação) envolvidos neste trabalho são: Zahra Lotfollahi, Ana P. Q. Mello, Francisco A. H. Fonseca, Luciene O. Machado, Maria C. Izar, Nagila R. T. Damasceno, Cristiano L. P. Oliveira, Antônio M. F. Neto.

Cabe ressaltar aqui a sinergia atingida pela equipe, uma vez que médicos, físicos, imunologistas e nutricionistas desenharam o experimento, coletaram dados por meio de diferentes técnicas experimentais, discutiram esses resultados e participam das análises finais visando as conclusões.

Este trabalho é um *spin off* do estudo por nós realizado com pacientes infartados e submetidos a terapias hipolipemiantes e antiplaquetárias, descrito no relatório anterior.

O objeto de estudo foi abordado por meio de diferentes técnicas de análise, tanto as usadas em biomedicina, quanto da Física da Matéria Condensada. Essa abordagem multidisciplinar é inédita na literatura e produziu resultados muito interessantes.

Amostras de soluções de LDL de pacientes normolipidêmicos, separadas em nosso laboratório, foram colocadas em contato com duas substâncias, utilizadas naquelas terapias. As moléculas testadas foram a ticagrelor (tica) e clopidogrel (clop) (Figs. a1 e a2).

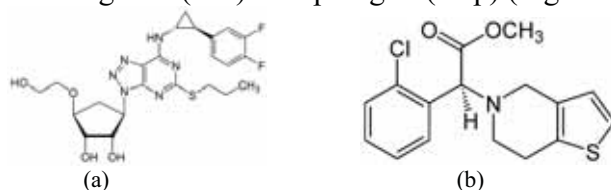


Figura a1: Molécula do ticagrelor (a) e do clopidogrel (b).

Em alguns experimentos, as concentrações utilizadas procuraram reproduzir aquelas presentes nos pacientes tratados após o infarto, a saber: tica – 800 ng/mL e clop – 15 ng/mL. Em outros, as concentrações foram variadas.

Propriedades ópticas não-lineares de amostras de LDL foram examinadas por meio da Varredura-Z (*Z-scan*) para verificar o estado oxidativo dessas lipoproteínas. Experimentos de óptica linear também foram realizados com as LDLs dos pacientes para determinar a quantidade de betacaroteno nessas partículas em diferentes tempos de incubação e concentração das moléculas-teste durante a intervenção.

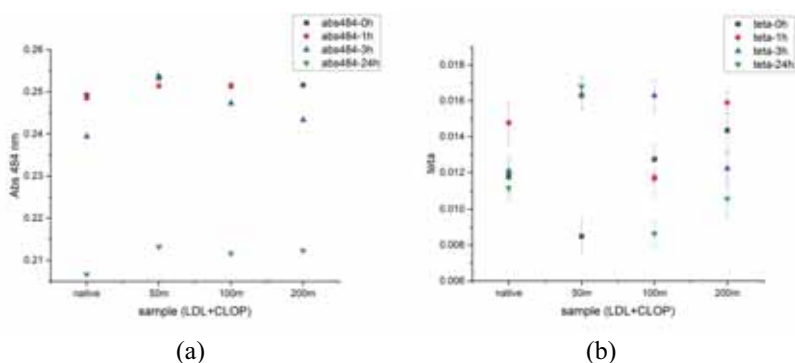


Figura a2: Amostras dopadas com clop com diferentes concentrações em mg/mL, em diferentes tempos de incubação. (a) absorvância em 484 nm. (b) amplitude pico-vale em um experimento de Varredura-Z.

A figura a2 traz a absorvância em 484 nm e a amplitude pico-vale em um experimento de Varredura-Z para solução de LDL com clop, em diferentes concentrações e tempos de incubação. Nas concentrações de clop que reproduzem o que o paciente recebe após o infarto, em função do tempo de incubação, mostramos na Fig. a3 a e b a absorvância em 484 nm e a amplitude pico-vale.

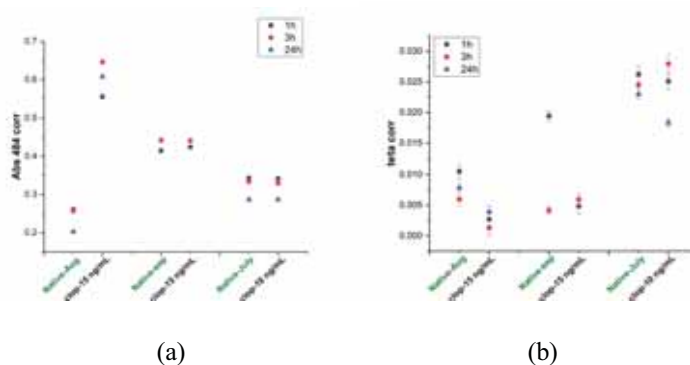


Figura a3: Amostras dopadas com clop, com diferentes concentrações em ng/mL, em diferentes tempos de incubação. Experimentos efetuados em condições experimentais diferentes (Aug, Sep, July) revelaram a importância da padronização de procedimentos de separação da LDL e diálise. (a) absorbância em 484 nm. (b) amplitude pico-vale em um experimento de Varredura-Z.

Um importante resultado obtido foi o estabelecimento de padrões específicos de separação das LDLs e de diálise das amostras (para a retirada do sal colocado na centrifugação seriada). A reprodutibilidade dos resultados foi atingida apenas após essa cuidadosa padronização.

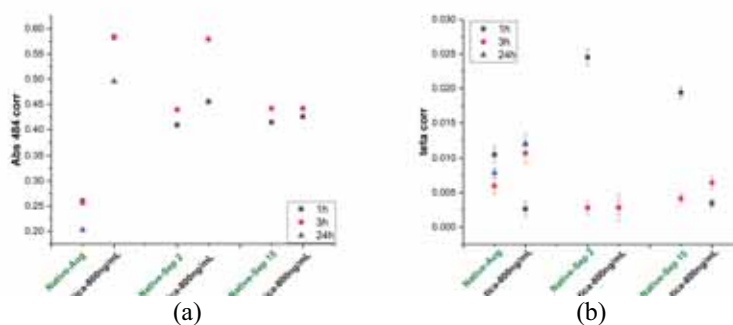


Figura a4: Amostras dopadas com tica, com diferentes concentrações em ng/mL, em diferentes tempos de incubação. Experimentos efetuados em condições experimentais diferentes (Aug, Sep, July) revelaram a importância da padronização de procedimentos de separação da LDL e diálise. (a) absorbância em 484 nm. (b) amplitude pico-vale em um experimento de Varredura-Z.

Experimentos semelhantes foram realizados com tica, com resultados preliminares reportados na Figura a4.

Em ambos experimentos com as moléculas-teste, o sinal de Varredura-Z se mostrou bastante fraco. O processo de diálise efetuado nas amostras para a retirada do sal parece estar causando uma perda de partículas de LDL, o que diminui o sinal de Varredura-Z. Estamos em fase de discussão da necessidade da diálise nesse estudo e, caso realmente essa etapa se mostre essencial, o processo dever ser otimizado para evitar essa perda de partículas.

O Dr. Lionel Gamarra, do Hospital Israelita Albert Einstein, seu grupo e colaboradores são os responsáveis pelas pesquisas relacionadas a seguir (b → d).

### b) Nanocompósito de vidro bioativo/SPIONS superparamagnético e altamente bioativo e sua potencial aplicação na hipertermia magnética

As vitrocerâmicas bioativas magnéticas são biomateriais aplicados para hipertermia magnética no tratamento do câncer ósseo, tratando assim o tumor ósseo além de regenerar o osso danificado. No entanto, combinar alta bioatividade e magnetização de alta saturação continua sendo um desafio, uma vez que a etapa de tratamento térmico empregada para crescer as fases magnéticas também está relacionada à perda de bioatividade. Aqui, propomos um novo nanocompósito feito de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) dispersas em uma matriz de vidro bioativo derivado de sol-gel, que não necessita de nenhum tratamento térmico para cristalização das fases magnéticas. A bioatividade e as caracterizações *in vitro* mostram que tais nanocompósitos apresentam propriedades formadoras de apatita semelhantes ao vidro original altamente bioativo, além de serem osteoindutivos. Esta metodologia é uma nova alternativa para produzir materiais bioativos magnéticos para os quais as propriedades magnéticas dependem apenas da qualidade das SPIONs utilizadas na síntese. Com isso, esses nanocompósitos podem ser reconhecidos como uma nova classe de materiais bioativos para aplicações no tratamento de câncer ósseo por hipertermia, além de evidenciar interações intermagnéticas de nanopartículas dentro do nanocompósito (Figs b1, b2 e b3).

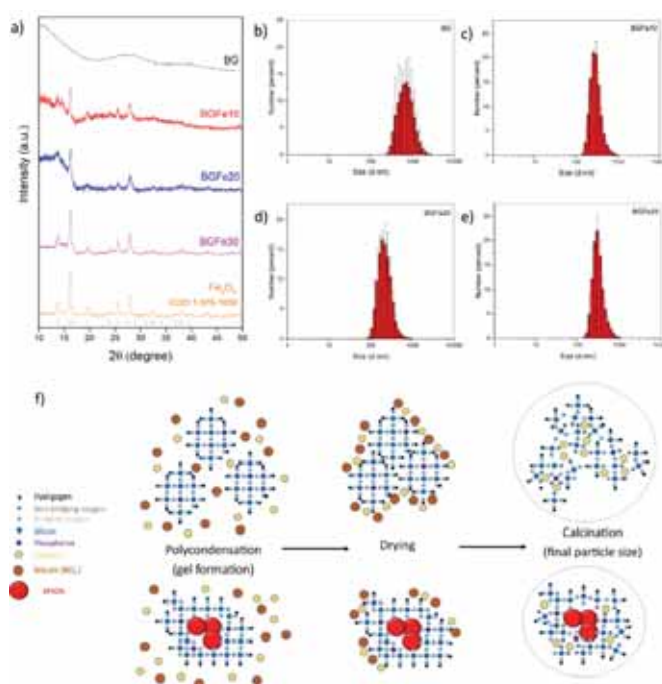


Figura b1: Caracterização estrutural de nanocompósitos de BGFe: a) Padrão de difração de DRX dos nanocompósitos em comparação com SPIONs , ICDD 1-075-1609 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e BG. (b–e): Medidas de tamanho de partícula por DLS: b) BG; c) BGFe10; d) BGFe20; e) BGFe30. f) Esquema da formação da fase vítrea na ausência (imagens superiores) ou presença (imagens inferiores) de SPION.

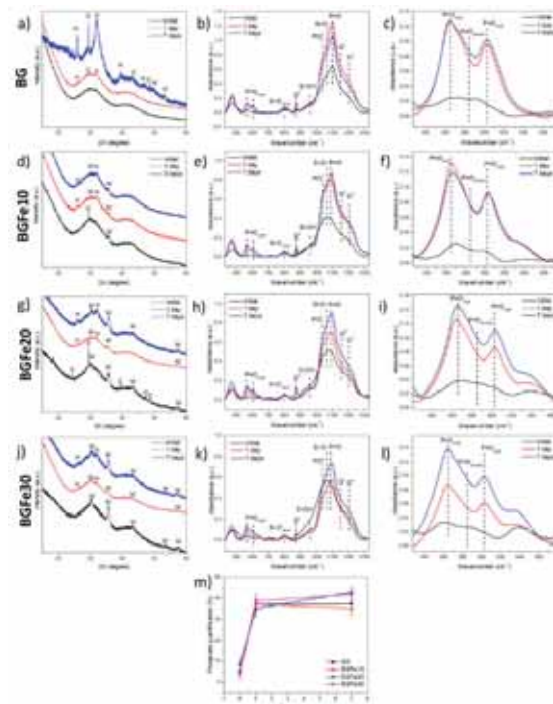


Figura b2: Análise de superfícies de vidro BG e nanocompósito BGFe antes e após imersão em solução SBF por 1 e 7 dias. Coluna da esquerda: resultados de XRD de BG (a), BGFe10 (d), BGFe20 (g) e BGFe30 (j). Coluna do meio: análise FTIR de BG (b), BGFe10 (e), BGFe20 (h) e BGFe30 (k). Colunas da direita: análise FTIR (em uma faixa de zoom) dos grupos funcionais fosfato de BG (c), BGFe10 (f), BGFe20 (i) e BGFe30 (l). m) Quantificação de fosfato derivada da análise de grupos funcionais de fosfato.

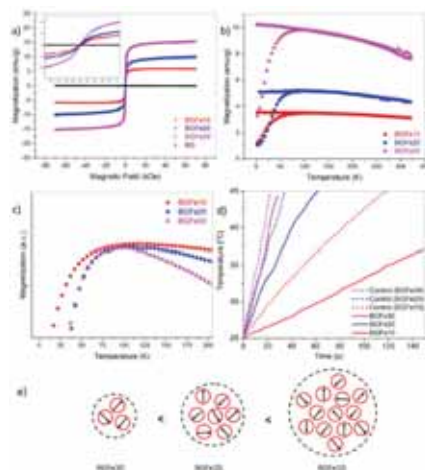


Figura b3: Caracterização magnética dos nanocompósitos: a) curvas de temperatura corporal (300 K) MH; b) curvas ZFC-FC; c) curvas das ZFCs sobrepostas intencionalmente para melhor visualização de seu alargamento; d) ensaio calorimétrico sob campo magnético para nanocompósitos e seus controles (ou seja, a mesma fração mássica de



SPION dispersa em água); e) ilustração representativa do tamanho do cluster SPION nos diferentes nanocompósitos de BGF<sub>e</sub>.

### c) Tecnologia sobre Glioblastoma On-a-Chip para Abordagens Terapêuticas

O presente trabalho teve como objetivo verificar o uso de dispositivos microfluídicos no processo de implementação e avaliação da eficácia das abordagens terapêuticas no glioblastoma on-a-chip, proporcionando uma visão ampla dos avanços até o momento no uso dessa tecnologia e suas perspectivas. Este estudo identificou uma diversidade de glioblastoma on-a-chip para avaliar abordagens terapêuticas, muitas vezes usando níveis intermediários de complexidade. O nível mais avançado implementou a interseção entre diferentes sistemas biológicos (fígado-cérebro ou intestino-fígado-cérebro), modelo BBB, permitindo estudos *in vitro* com maior similaridade genética humana, reprodutibilidade e baixo custo, em uma plataforma altamente personalizável (Fig. c1). Algumas terapias alternativas foram relatadas em poucos estudos (22,6%).

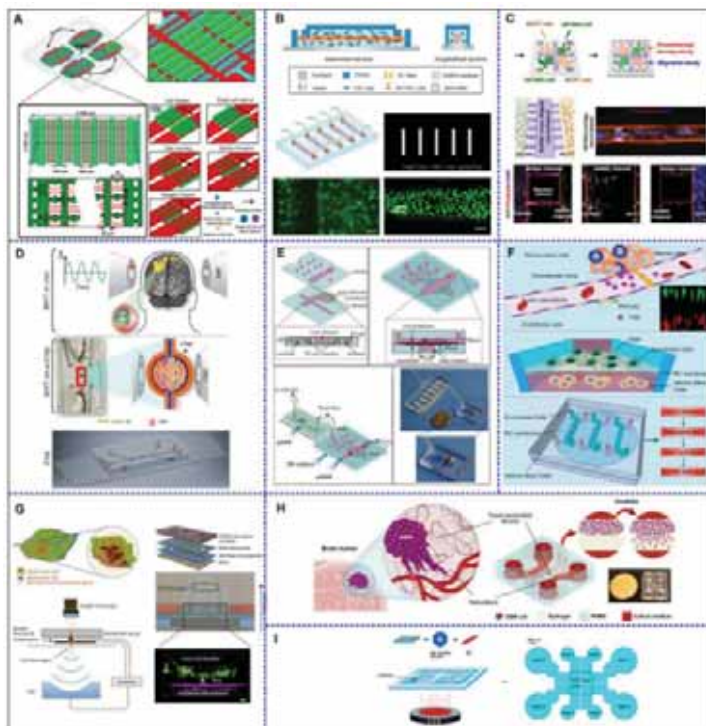


Figura c1: Dispositivos on-a-chip de glioblastoma para abordagem terapêutica utilizada em alguns dos estudos selecionados desta revisão sistemática em diversas plataformas para estudo tumoral.

### d) Efeito da Terapia Celular e do Exercício Físico em um Modelo de AVC, considerando o homing Celular por Imagem Molecular e Análise Comportamental

O objetivo deste estudo é ver como a combinação de atividade física com tratamento celular afeta a recuperação funcional em um modelo de acidente vascular cerebral. Imagens moleculares e nanopartículas multimodais auxiliaram no rastreamento celular e monitoramento longitudinal (MNP). A viabilidade de células-tronco mesenquimais (MSC) foi determinada usando um ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio (MTT) e imagem bioluminescente (BLI) após transdução lentiviral e marcação de MNP. Aleatoriamente, os animais foram divididos em 5 grupos (controle-G1 e experimental G2-G5). A indução do AVC fototrombótico foi confirmada pela redução da perfusão sanguínea local e cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), e as CTM nos grupos G3 e G5 foram implantadas após 24 h, com BLI e imagem de fluorescência no infravermelho próximo (NIRF) rastreando essas células em 28 h, 2, 7, 14 e 28 dias. Durante um período de 28 dias, o G5 também realizou treinamento físico, enquanto o G4 simplesmente fez o treinamento. Aos 0, 7, 14 e 28 dias, os animais foram testados funcionalmente usando um teste de cilindro e um teste de atividade motora espontânea. A internalização de MNP em MSC foi confirmada usando microscopia de campo claro e fluorescência. Em relação ao grupo G1, houve redução de apenas 3% da viabilidade celular. Os grupos G2-G5 apresentaram mais de 69% de redução da perfusão sanguínea. O grupo G5 apresentou melhor desempenho ao longo do tempo, com recuperação progressiva da simetria e aumento dos movimentos verticais rápidos. Até 7 dias, BLI e NIRF seguiram MSC no local danificado, demonstrando um aumento de sinal que pode estar relacionado à proliferação celular no local da lesão durante a fase aguda do acidente vascular cerebral. A terapia local de MSC combinada com atividade física resultou em melhores resultados no alívio da disfunção motora, principalmente durante o período agudo. Quando se trata de neuroreabilitação, essa terapia alternativa pode ser adequada (Figs. d1, d2 e d3).

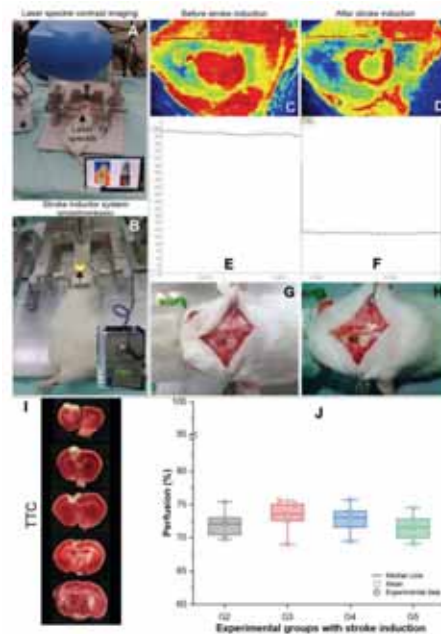


Figura d1: Avaliação da lesão cerebral isquêmica focal por fototrombose. ( A ) O sistema de imagem laser speckle utilizado para avaliação da perfusão sanguínea local; ( B ) O equipamento de laser utilizado induz lesão isquêmica focal por fototrombose; ( C ) Perfusão sanguínea local basal antes da indução do AVC; ( D ) Perfusão local após a indução do AVC; ( E , F ) A representação gráfica da perfusão sanguínea antes e após a indução do AVC,



respectivamente; ( G , H ) Visualização do crânio do animal com craniectomia antes e após a indução do AVC, respectivamente; ( I ) Avaliação da indução de acidente vascular cerebral por TTC; e ( J ) Box plot da alteração da perfusão sanguínea local nos grupos experimentais G2-G5. G2: Grupo AVC; G3: Grupo AVC + MSC; G4: Grupo AVC + exercício; G5: Grupo AVC + MSC + exercício; SD: Desvio padrão.

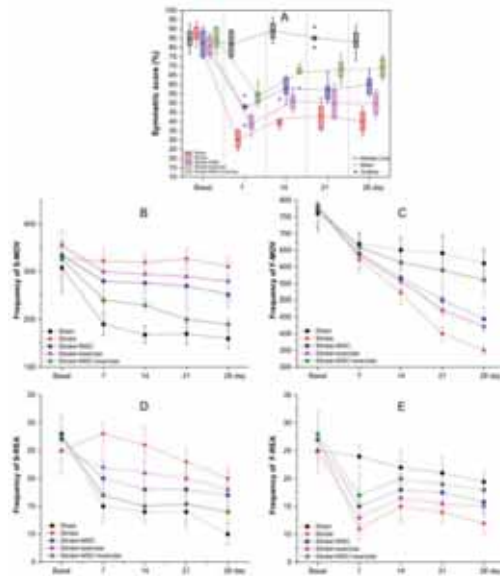


Figure d2: Avaliação comportamental pelo teste do cilindro e teste de atividade locomotora espontânea antes da indução do AVC e aos 7, 14, 21 e 28 dias após nos grupos experimentais (representados pela estrela vermelha, quadrado azul, triângulo rosa e círculo verde) e grupo controle (símbolo quadrado preto). ( A ) ao longo do tempo pelo teste do cilindro; ( B – E ) Avaliação motora pelo teste de atividade locomotora espontânea considerando a frequência dos seguintes movimentos— ( B ) Movimentos horizontais lentos (S-MOV); ( C ) Movimentos horizontais rápidos (F-MOV); ( D ) Movimentos verticais lentos (S-REA); e ( E ) Movimentos verticais rápidos (F-REA).

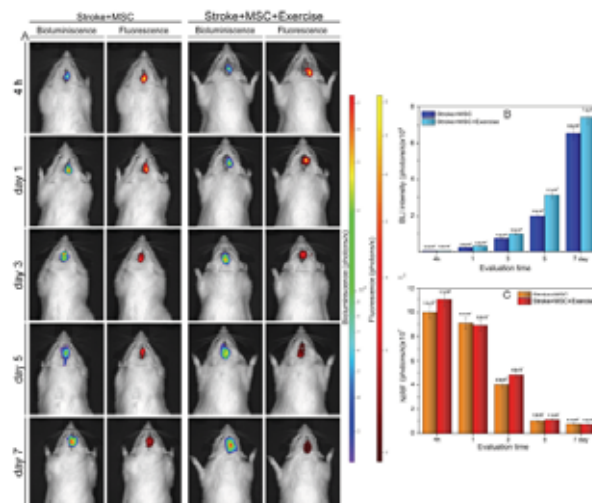


Figura d3: Avaliação do sinal de bioluminescência e fluorescência nos grupos “AVC + CTM” (G3) e “AVC + CTM + exercício” (G5), nas seguintes condições: 4 h e 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias após a administração de MSC marcadas com MNP. ( A ) Representações do sinal BLI e NIRF nos grupos “AVC + CTM” (G3) e “AVC + CTM + exercício” (G5) ao longo do tempo com sinal detectável para ambas as técnicas (até 7 dias); ( B ) O gráfico da intensidade do sinal BLI dos grupos analisados ao longo do tempo; e ( C ) O gráfico da intensidade do sinal NIRF dos grupos analisados ao longo do tempo.

O Dr. Roberto Salinas, seu grupo e colaboradores são os responsáveis pela pesquisa relatada a seguir.

e) Estudo da dinâmica entre os domínios CBD1 e CBD2 do trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  por simulações de dinâmica molecular, medidas de RMN, e SAXS

Ao longo do período continuamos os estudos de estrutura e função da proteína trocadora de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), utilizando como modelo o trocador de *Drosophila* (CALX) e o trocador da arquea termofílica *Methanococcus janaschii* (NCX-Mj). Estes estudos envolveram a aplicação de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear em solução a 800 MHz, biologia molecular e química de proteínas, Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS) (em colaboração com o Prof. Cristiano Luis Pinto de Oliveira do IFUSP), medidas de calorimetria isotérmica de titulação (ITC), e simulações computacionais por dinâmica molecular (DM). Especificamente, caracterizamos a dinâmica das construções CBD2 e CBD12 da isoforma 1.2 do CALX por medidas de RMN, SAXS e DM (Figura e1). Os dados obtidos sugerem que a alça-FG do domínio CBD2 visita duas conformações discretas na isoforma 1.1, enquanto menor flexibilidade foi observada na isoforma 1.2. Essa observação foi interpretada como sendo devido a diferentes contatos na interface entre os domínios CBD1 e CBD2 devido às diferenças na sequência de aminoácidos das duas isoformas. Essas diferenças potencialmente explicam como a regulação por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular das isoformas 1.1 e 1.2 do CALX é diferente, e esses resultados estão reunidos em um manuscrito em preparação. Em paralelo, clonamos os genes que codificam para os trocadores CALX e NCX humano (NCX 1.1) em um vetor de expressão em oócitos de rã (pGH19), e construímos mutantes contendo um *linker* flexível de serinas e glicinas separando os dois domínios CBD1 e CBD2 na alça citoplasmática do trocador (CALX-GGS e NCX-GGS) (Figura e2). Medidas de RMN realizadas anteriormente tinham mostrado que a inserção deste *linker* é capaz de desacoplar a dinâmica entre os dois CBDs. Essas construções serão utilizadas para a realização de ensaios de eletrofisiologia com o objetivo de estabelecer correlações entre estrutura e função dos trocadores NCX. Em paralelo, expressamos e purificamos o trocador NCX-Mj enriquecido isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  em micelas de dodecilmaltosídeo. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY adquiridos com essas amostras mostraram que a proteína se encontra bem enovelada (Figura e3). No entanto apenas a metade do número de picos esperados foi observada no espectro. O trocador NCX-Mj foi incorporado em lipossomos com o objetivo de realizar experimentos de transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando a sonda fluorescente CalciumGreen-5N em colaboração com a Profa. Iolanda Cuccovia. Porém, os experimentos de transporte ainda não são suficientemente claros para chegarmos a uma conclusão com relação à atividade de transporte deste trocador.

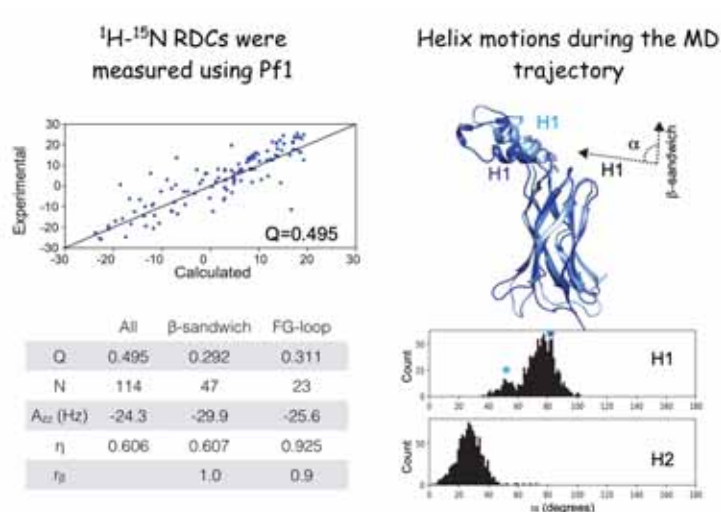


Figura e1: Caracterização da estrutura e dinâmica do domínio CBD2 (CALX isoforma 1.1) por medidas de acoplamentos dipolares residuais (<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N RDCs) (esquerda) e por simulações de dinâmica molecular (direita). A observação de um alinhamento ( $A_{zz}$ ) levemente menor na alça-FG ( $A_{zz} = -25.6$  Hz) do que no sanduíche-beta ( $A_{zz} = -29.9$  Hz) sugerem leve mobilidade da alça. Essa mobilidade é consistente com a observação de duas conformações discretas da hélice H1 durante a simulação (direita).

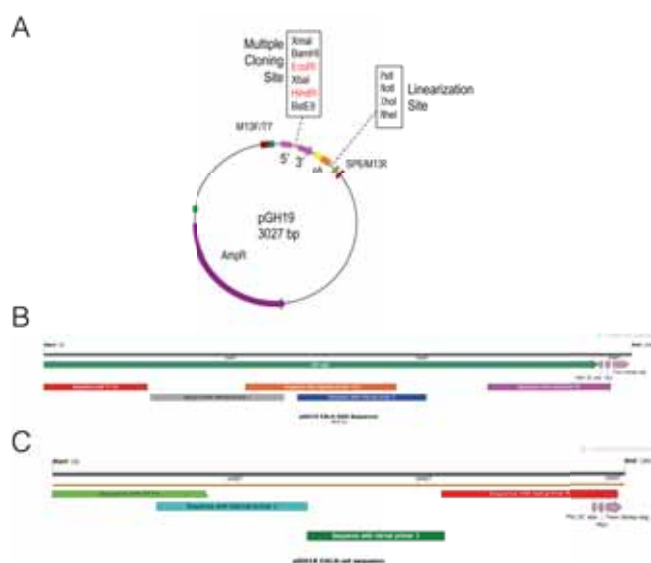


Figura e2: **A)** Mapa do plasmídeo pGH19. Os genes *CALX-GGS* e *CALX* selvagem foram clonados entre os sítios de EcoRI e HindIII; **B)** Cobertura do sequenciamento dos genes *CALX-GGS* e **C)** *CALX* selvagem clonados no vetor pGH19 para expressão em *Lithobates*. O sequenciamento foi realizado com diferentes *primers* internos e com o *primer* do promotor T7. Os genes *CALX-GGS* e *CALX* selvagem foram obtidos comercialmente clonados em pcDNA3.1. Os dois genes foram clonados em fusão com o sítio de clivagem de HRV3C, seguido de *myc-tag* para reconhecimento por anticorpos, e duas *strep-tags* para purificação no C-terminal.

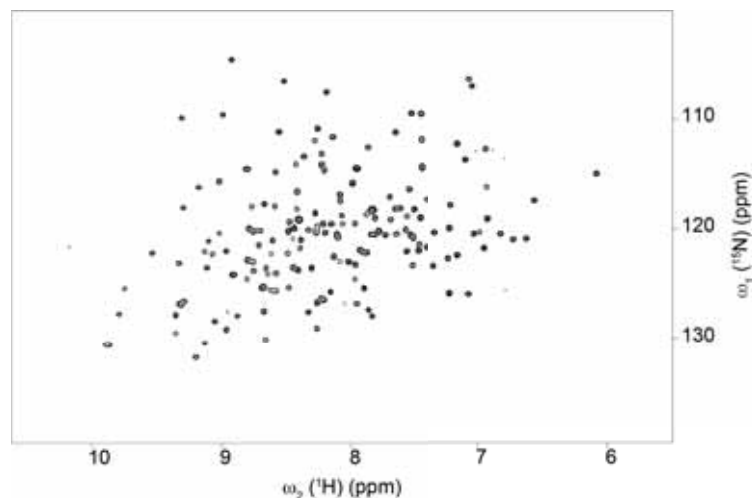


Figura e3: Espectro de RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY a 800 MHz do trocador NCX-Mj enriquecido uniformemente com  $^{15}\text{N}$  e solubilizado com beta-dodecilmaltosídeo (DDM). Condições: temperatura = 308 K, 16 scans, 768x64 pontos complexos, Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, DDM 0,03 %.

Os pesquisadores envolvidos neste trabalho são: Thereza Soares e Kaline Coutinho, bem como seus estudantes e pós-doutores.

f) **Desenvolvimento do Programa SuAVE v2. Surface Assessment via Grid Evaluation (SuAVE) for Every Surface Curvature and Cavity Shape.**

O programa SuAVE (Surface Assessment Via grid Evaluation) é um programa escrito em Fortran 90 que faculta a análise de propriedades geométricas de superfícies e interfaces químicas, considerando a morfologia estrutural destes sistemas. O conjunto de rotinas numéricas depende de um processo de ajuste de superfície estabelecido com base na geometria diferencial e computacional e no cálculo numérico. O programa foi desenvolvido para ser aplicado a qualquer superfície ou interface orgânica, inorgânica ou biológica, apresentando ou não curvatura e exibindo uma ampla gama de morfologias. O programa SuAVE utiliza como arquivos de entrada, a localização das partículas de uma superfície ou interface química, em formato PDB, oriunda de qualquer metodologia de simulação molecular, determinística ou estocástica. É capaz de calcular, eficientemente, uma série de propriedades relevantes para sistemas biológicos: área e volume por molécula, espessura de membranas e vesículas, raio de giro e forma de vesículas e micelas, perfis de densidade, parâmetros de ordem de curvatura, e curvaturas Gaussianas. A exatidão da metodologia numérica implementada no SuAVE para avaliar as propriedades mencionadas foi testada e validada através da análise estrutural de quatro bicamadas de diferentes quimiotipos de Lipídio A, apresentando morfologias distintas e de uma vesícula de Lipídio A. O resultado dessas análises foi comparado com o obtido através de metodologias convencionais que não levam em consideração a curvatura das interfaces químicas. Para o caso das superfícies abertas, as bicamadas, foi possível verificar que os resultados apresentados pelo SuAVE guardam elevado nível de semelhança com os obtidos pelas metodologias convencionais, quando os sistemas analisados exibem uma conformação plana. Entretanto, para os sistemas apresentando regiões

altamente curvadas em sua morfologia, os resultados foram sensivelmente diferentes, alertando para a influência da conformação das membranas lipídicas sobre suas propriedades estruturais. Na avaliação estrutural da vesícula, as análises realizadas mostraram como a metodologia implementada no SuAVE é capaz de auxiliar o correto entendimento acerca das mudanças morfológicas que esta estrutura sofre ao longo da simulação. Portanto, por ser capaz de levar em consideração a morfologia das interfaces químicas em estudo, o SuAVE demonstrou maior versatilidade e acurácia para lidar com uma ampla variedade de análises estruturais para qualquer tipo de superfície ou interface química.

O pesquisador responsável por este trabalho é o Dr. Roberto Dias Lins, sua equipe e colaboradores.

### g) Engenharia de proteínas imunorreativas para detecção e neutralização viral

Segundo o planejamento do último relatório, utilizamos técnicas de engenharia computacional de proteínas para desenvolver um marcador, contendo um epítipo da proteína NS2B do vírus Zika, capaz de discriminar formas grave de leve de infecções por Zika, a partir de amostras de soro de pacientes grávidas com 4 ou mais semanas de gestação (Figura g1). O trabalho foi publicado na revista RSC Medicinal Chemistry (RSC Med. Chem., 2021, 12, 1525; DOI: 10.1039/d1md00124h), o qual foi capa principal da mesma (Figura g2). Adicionalmente, a proteína também pode ser utilizada em ensaios de ELISA para discriminar infecções leves causadas pelos vírus Dengue e Zika, com performance superior aos testes comercialmente disponíveis baseados em IgG (Figura g3 e Tabela g1). A patente descrevendo a invenção foi depositada sob o número de registro BR1020220042713, e título: "Polipeptídeo recombinante, composição, uso do polipeptídeo da composição ou da estrutura tridimensional ou topologia do polipeptídeo, kit de diagnóstico para diferenciar infecções de formas graves e não graves de zika ou para diferenciar Zika e Dengue, e, método de diagnóstico para diferenciar infecções de formas graves e não graves de Zika ou para diferenciar Zika e Dengue.

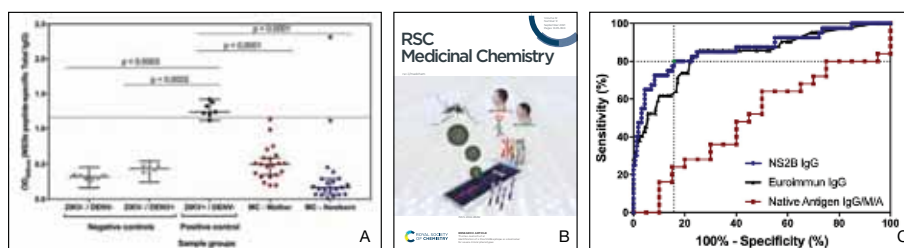


Figura g1: Resultados de diagnóstico diferencial entre Zika e Dengue através do desenvolvimento de a proteína recombinante. Figura g1a) Ensaio de ELISA demonstrando a capacidade de discriminação entre a forma grave de leve da doença, a partir de soros de pacientes (incluindo neonatais portadores de microcefalia). Pacientes Zika soropositivos portadores da forma grave da doença não respondem (apresentam resultado negativo) ao antígeno desenvolvido. Figura g2b) Capa da revista RSC Medicinal Chemistry referente ao artigo publicado (DOI: 10.1039/d1md00124h). Figura g2c) Curvas ROC da comparação da performance diagnóstica discriminatória de

infecções entre Zika e Dengue em portadores da forma leve da doença, utilizando o antígeno artificial e kits comercialmente disponíveis no país.

Tabela g1: Comparação das sensibilidades e especificidades obtidas dos ensaios de ELISA utilizando a proteína quimérica (desenvolvida computacionalmente) carregando o epítipo de NS2B de ZIKV e dois kits comercialmente disponíveis, baseados em IgG, frente a um painel de 198 amostras de soros de pacientes.

Ensaio	Sensibilidade (%)	IC* 95%	Especificidade (%)	IC* 95%
Anti-ZIKV NS2B IgG	<b>80.00</b>	64.35 - 90.95	<b>84.18</b>	77.53 - 89.49
Native Antigen Anti-ZIKV IgG/M/A	<b>48.00</b>	27.8 - 68.69	<b>60.00</b>	36.05 - 80.88
EuroImmuno Anti-ZIKV NS1 IgG	<b>85.71</b>	71.46 - 94.57	<b>68.69</b>	61.73 - 75.07

\*IC = intervalo de confiança.

Com a finalidade de desenvolver uma molécula com potencial terapêutico contra flaviviruses, utilizamos técnicas de engenharia computacional de proteínas para desenhar uma proteína artificial capaz de se ligar ao epítipo de anticorpo neutralizante na alça de fusão da proteína de envelope do vírus Zika. É importante salientar que a alça de fusão é um epítipo conservado entre flavivírus. Ensaios de termoforese em microescala confirmaram que a proteína é capaz de se ligar ao seu alvo, *i.e.*, a proteína E do vírus Zika isolada e no contexto do vírus inteiro com afinidade similar (Figura g2a). Desta forma, realizamos ensaios de microneutralização utilizando os vírus Zika, e dois sorotipos do vírus Dengue (DENV-2 e DENV2). Os resultados mostraram que a proteína, denominada de ZVPA3, é capaz de neutralizar a infecção dos vírus Zika e Dengue *in vitro* (Figura g2b) com ECs 50 em unidades de  $\mu\text{M}$ .

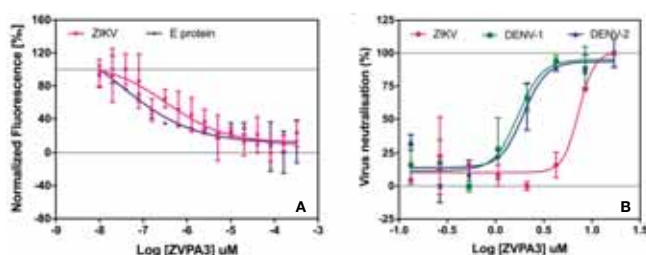


Figura g2. Ensaios de ligação (A) e avaliação da capacidade de neutralização *in vitro* (B) dos vírus ZIKV, DENV-1 e DENV-2 pela proteína sintética (computacionalmente desenvolvida).



O pesquisador responsável por este trabalho é o Dr. Raul Maranhão, com colaboradores e estudantes.

#### h) Tratamento de cânceres com LDE (emulsões lipídicas)

Consolidamos, em estudos clínicos envolvendo pacientes com cânceres sólidos as observações que o uso do nosso sistema de “drug delivery”, baseado em nanopartículas lipídicas, proporciona diminuição muito acentuada da toxicidade das drogas anti-câncer. Isto proporciona a administração de quimioterapia segura e confortável para os pacientes oncológicos e também possibilita o tratamento quimioterápico de pacientes muito idosos ou debilitados que, de outra forma, só teriam opção dos tratamentos paliativos.

Observamos que a realização da quimioterapia de preparo para o transplante de medula óssea (TMO), em pacientes com leucemias agudas, realizada com o fármaco etoposídeo veiculado em nanopartículas lipídicas torna o TMO mais eficiente, diminui a toxicidade e aumenta consideravelmente a sobrevida dos pacientes.

Mostramos que, em pacientes com doença arterial periférica aterosclerótica, a transferência de colesterol para a fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) está diminuída, o que pode ter importantes implicações na fisiopatologia da doença e, eventualmente, criar um novo alvo terapêutico, já que as HDL têm provável ação anti-aterosclerótica.

O pesquisador responsável por este trabalho é o Dr. Alex Cortez Campos, com colaboradores e estudantes (i – l).

#### i) Efeito do ácido cítrico nas propriedades morfoestruturais e magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro ultrapequenas

Foram estudadas as propriedades estruturais e magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro obtidas pela coprecipitação de íons de ferro na presença de diferentes quantidades de ácido cítrico. O ácido cítrico atua como agente de recobrimento e proporciona controle do tamanho das partículas a serem obtidas. A dependência do tamanho das propriedades magnéticas foi investigada comparando os resultados para partículas de ~2, 4, 6 e 8 nm. Com a diminuição do tamanho das partículas, observou-se uma redução da magnetização de saturação (de ~84 para 33 Am<sup>2</sup>/kg) e um aumento da coercividade (de ~32 para ~100 mT), devido ao papel crescente da superfície desordenada. O comportamento das curvas de magnetização de campo zero resfriado/campo resfriado indica um congelamento *superspin-glass* para amostras de partículas de 2 nm e 4 nm. (Figura i1). Experimentos de memória abaixo da temperatura de congelamento na amostra de partículas de 2 nm fornecem evidência adicional de um estado magnético vítreo. A observação do viés de troca, devido ao acoplamento de troca de interface núcleo/casca, para amostras de partículas de 2 nm e 4 nm fornece evidências de um congelamento do tipo *spin-glass* da superfície, o que contribui para as propriedades vítreas observadas.

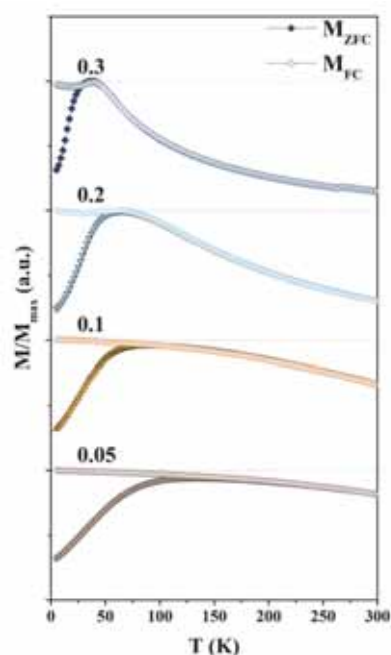


Figura 11: Magnetizações ZFC (símbolos cheios) e FC (símbolos vazios) para todas as amostras. As curvas ZFC-FC foram medidas com um campo magnético aplicado de 25 mT.

j) Produção de nanofolhas de nitreto de carbono decoradas magneticamente com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por precipitação homogênea: desempenho de adsorção-fotocatalítica de corantes e avaliação de toxicidade aguda

Nitreto de carbono grafítico ( $\text{g-C}_3\text{N}_4$ ) foi decorado com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  usando um método alternativo, simples e ambientalmente amigável de precipitação homogênea com ureia. O nanocompósito magnético foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de fotoelétrons de raios X, Brunauer – Emmett – Teller isotermas, Zetametria, magnetometria de amostra vibrante, espectroscopia de absorção UV – vis e espectroscopia de fotoluminescência. Os efeitos toxicológicos agudos dos nanomateriais foram avaliados em embriões/larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*). O desempenho do nanocompósito para remoção de azul de metileno (MB), como poluente modelo, da água em diferentes condições de pH foi comparado ao do  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  puro e de um compósito magnético elaborado por coprecipitação convencional com  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Os resultados mostraram que o nanocompósito sintetizado com a nova abordagem apresentou o melhor desempenho, correspondendo a uma taxa de remoção de azul de metileno (MB) de 91,7% em meio ácido e 98,3% em meio alcalino (Figura j2). A maior taxa total em meio básico pode ser atribuída a maior capacidade de adsorção e atividade fotocatalítica nesta faixa pH. Por um lado, a amostra apresenta valores de potencial zeta mais negativos em pH 10,6, o que pode aumentar a eficiência de adsorção. Além disso, apresenta um *red-shift* maior e uma *band gap* mais estreita, aumentando o desempenho fotocatalítico sob luz visível. Estudos de regeneração mostraram que o nanocompósito proposto pode ser facilmente

recuperado por auxílio magnético e pode ser reutilizado, mantendo uma boa eficiência de remoção. Os resultados toxicológicos mostraram que os nanomateriais, puros e decorados, não apresentaram efeitos toxicológicos agudos em peixe-zebra nas concentrações recomendadas pela OCDE 236.

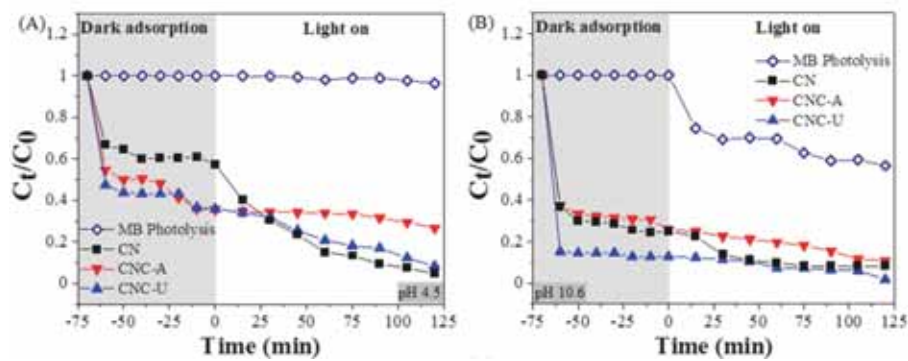


Figura j2. (A) e (B) Adsorção na fase escura e degradação fotocatalítica de MB para todas as amostras.

k) Estudo da influência da distribuição de tamanho de nanopartículas e efeitos de superfície na dependência térmica da anisotropia magnética

Investigamos experimentalmente a dependência térmica da coercividade para amostras de nanopartículas de ferrita de cobalto sintetizadas por diferentes métodos, em uma ampla faixa de diâmetros de nanopartículas, resultando em amostras com diferente estrutura interna, rugosidade de superfície e distribuição de tamanho. Nossa análise consistiu em contabilizar a distribuição de tamanho e dependência térmica das variáveis relevantes, permitindo acessar a constante de anisotropia em função da temperatura. Os resultados indicam que a superfície desempenha um papel importante nas constantes de anisotropia determinadas em campo, com a dependência térmica apontando para uma combinação de tipos/fontes de anisotropia afetando a coercividade. Enquanto a anisotropia magnetocristalina cúbica domina para nanopartículas com maior diâmetro, a influência da contribuição da superfície aumenta substancialmente para tamanhos menores. O estado da superfície se mostra fundamental para determinar a principal fonte de anisotropia.

l) Estudo da influência da temperatura no comportamento coloidal de ferrofluidos aquosos à base de nanopartículas *core@shell*, utilizando espalhamento de luz dinâmico e zetametria

Este estudo buscou investigar os efeitos da temperatura no comportamento coloidal de ferrofluidos aquosos, como base para possíveis aplicações tecnológicas em dispositivos termoeletrônicos. Para isso, foram elaboradas amostras de ferrofluidos à base de NP's *core@shell* do tipo  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@g\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , via co-precipitação hidrotérmica, sendo uma estabilizada em meio ácido ( $\text{R}_2\text{D}_2$ ) e outra em meio fracamente alcalino após processo de citratação ( $\text{R}_2\text{D}_2\text{Cit}$ ). As amostras foram caracterizadas em termos de estrutura, morfologia e composição por meio das técnicas de DRX, MET e EAA. O comportamento magnético foi investigado por magnetometria SQUID. O estudo do efeito da temperatura no comportamento coloidal, na faixa de 25 a 60°C, foi

realizado via Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta ( $\zeta$ ), investigando-se os efeitos de força iônica, natureza do co-íon ( $\text{Na}^+$  e  $\text{TMA}^+$ ) e pH. Os diâmetros hidrodinâmicos obtidos revelaram que todas as amostras são compostas de agregados de NP's. O aumento da força iônica ocasionou em geral um aumento do tamanho dos agregados, enquanto a temperatura não impactou significativamente. A amostra R2D2 com co-íon  $\text{TMA}^+$  mostrou-se mais estável nas condições do estudo. Foi verificada para todas as amostras uma redução do  $\zeta$  com a temperatura, comportamento dominado pela redução de viscosidade do dispersante (Figura 11). A amostra com o co-íon  $\text{Na}^+$  exibiu maior tanto maior valor absoluto quanto maior variação de  $\zeta$  com a temperatura, associado a seu menor raio hidrodinâmico e maior mobilidade iônica, respectivamente. O aumento do pH diminuiu (aumentou) o módulo de  $\zeta$  da amostra R<sub>2</sub>D<sub>2</sub> em meio ácido (básico) (Figura 12). Por fim, os resultados obtidos fornecem importantes informações que permitem compreender o efeito da temperatura no comportamento coloidal de ferrofluidos para futuras aplicações em termoeletricidade.

Figura 11: Potencial zeta em função da temperatura da amostra R<sub>2</sub>D<sub>2</sub> estabilizada com  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{TMANO}_3$  e da amostra R<sub>2</sub>D<sub>2</sub>Cit em diferentes forças iônicas.

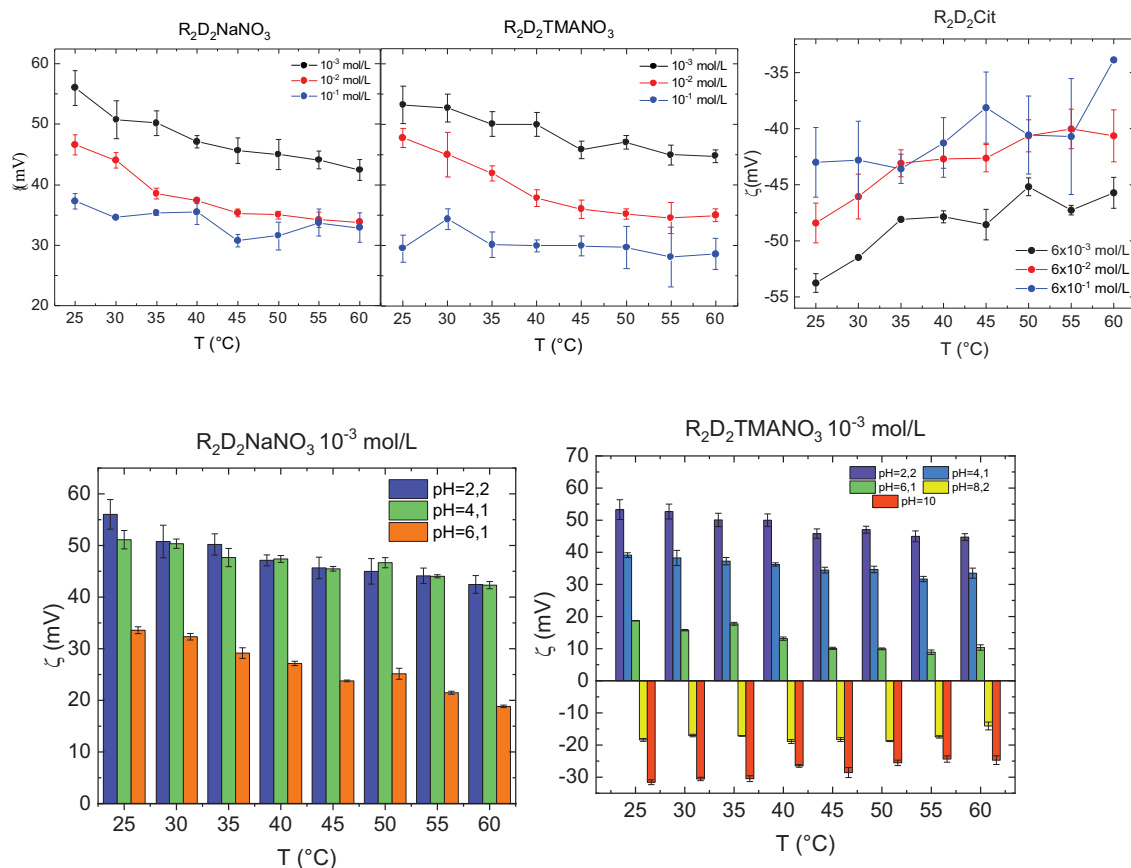


Figura 12: Potencial zeta em função da temperatura da amostra R<sub>2</sub>D<sub>2</sub> estabilizada com NaNO<sub>3</sub> e TMANO<sub>3</sub> em diferentes pH's.

A Dra. Nágila Damasceno, seu grupo e colaboradores são os responsáveis pela pesquisa relatada a seguir.

#### m) Frutose e risco cardiometabólico em indivíduos com preservação da cultura germânica: Estudo SHIP-BRASIL

Nas últimas décadas, países, como o Brasil, têm apresentado uma curva ascendente na incidência de excesso de peso e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Dentre as DCNT, se destacam as doenças cardiovasculares (DCV), que representam cerca de 30% das mortes totais e 72% da mortalidade por DCNT no Brasil. Apesar de sua complexidade, a dieta é o principal fator de risco modificável diretamente relacionada ao desenvolvimento das DCV. O atual padrão alimentar brasileiro é caracterizado pelo elevado consumo de alimentos industrializados, com alta densidade calórica e rico em açúcares de adição, onde se destaca o elevado consumo de sacarose e, conseqüentemente, de glicose e frutose. A frutose pode ser encontrada naturalmente em frutas e vegetais, tendo efeitos cardioprotetores, mas também está presente em diversos alimentos industrializados, sendo seu excessivo consumo potencial promotor de múltiplos efeitos negativos à saúde, como dislipidemias, hiperuricemia e resistência à insulina, levando às complicações cardiometabólicas. Embora múltiplos fatores culturais e socioeconômicos possam explicar o elevado consumo de frutose, pouco tem sido descrito sobre o perfil de consumo em grupos culturais específicos como entre os germânicos. O objetivo do estudo foi analisar a frutose dietética e plasmática como potencial fator de risco cardiometabólico em indivíduos que preservam a cultura germânica. Trata-se de um estudo com dados primários do momento basal da Coorte “Vida e Saúde em Pomerode (SHIP-BRASIL)” baseado na aferição direta de dados socioeconômicos, culturais, clínicos e dietéticos (Questionário de frequência alimentar). A partir do sangue coletado foram analisados o perfil lipídico (colesterol total - CT, HDL-c, LDL-c, VLDL, Não- HDL, triglicerídeos - TG), enzimas hepáticas (gama-glutamyltransferase - GGT, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT), glicose e frutose plasmática. Todos os testes estatísticos foram analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS) versão 20.0, sendo o nível de significância de  $p < 0,05$ . A maioria dos indivíduos incluídos foram do sexo feminino [56,6% (n=426) versus 43,4% (n=327)], e predominantemente adultos [67,6% (n=506) versus 32,8% (n=247)]. As doenças mais prevalentes em ambos os sexos foram a obesidade (40,0%), hipertensão arterial (32,5%) e as dislipidemias (30,1%), sendo a obesidade mais prevalente na população idosa (42,9% versus 38,5%). Verificou-se que o grupo Germânico apresentou uma maior prevalência de obesidade, circunferência da cintura e adiposidade corporal, estimada pela massa gorda superior ao grupo Não germânico. Em relação ao perfil lipídico e hepático, os homens apresentaram valores significativamente superiores às mulheres para VLDL (27,7±18,5 mg/dL versus 23,5±11,5 mg/dL;  $p < 0,001$ ), TG (138,4±92,4 mg/dL versus 117,7±57,3 mg/dL;  $p < 0,001$ ), AST (22,8±7,9 U/L versus 19,2±7,3 U/L;  $p < 0,001$ ), ALT (15,9±9,2 U/L versus 11,1±6,2 U/L;  $p < 0,001$ ), GGT (33,9±34,4 U/L versus 21,4±24,0 U/L;  $p < 0,001$ ). Não houve diferenças significativas no perfil bioquímico quanto ao grupo, com exceção

da frutose plasmática, que foi superior nos indivíduos do grupo Germânico. A frutose plasmática se correlacionou positivamente com o IMC ( $p=0,001$ ), perfil lipídico (CT, VLDL, Não-HDL e TG,  $p<0,001$  para todos) e enzimas hepáticas (GGT,  $p<0,001$  e ALT,  $p=0,007$ ), enquanto observou-se correlação negativa com o HDL-c ( $p<0,001$ ). Frutose dietética não se correlacionou com a frutose plasmática ( $p=0,556$ ). A frutose plasmática elevada se associou com um perfil lipídico mais aterogênico e com alterações hepática, que podem favorecer do desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcóolica. Esse perfil foi parcialmente explicado pelo maior perfil de excesso de peso observado no grupo Germânico. Um sumário desses resultados está na Fig. m1.

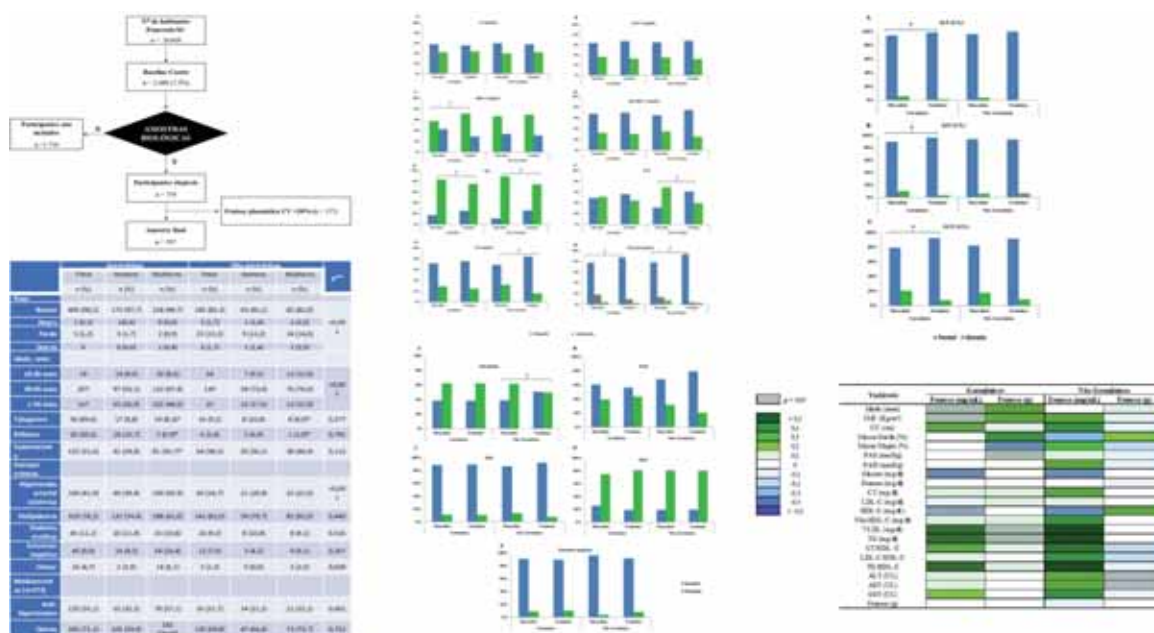


Figura m1: Sumário dos resultados.

A Dra. Luciana Andrade, seu grupo e colaboradores, Dra. Aline B. Silva, do Departamento de Engenharia de matérias do CEFET-MG, Dra. Irena Levitan da *University of Chicago at Illinois*, Dr. Lionel Gamarra do Instituto Albert Einstein e o Dr. Estevam Estevam Lascasas da escola de Engenharia da UFMG, são os responsáveis pela pesquisa relatada a seguir (n – p).

n) Efeitos biomecânicos e alterações de atividade migratória em macrófagos expostos à oxLDL.e suas implicações para o desenvolvimento da placa aterosclerótica



Dados anteriores do nosso grupo mostraram que o sequestro de colesterol da membrana plasmática induz a ruptura do empacotamento lipídico, causando reorganização e polimerização do citoesqueleto de actina, aumentando a rigidez celular e induzindo excitose lisossomal em fagócitos não profissionais, tais como células endoteliais. Da mesma forma, a forma oxidada da lipoproteína de baixa densidade (oxLDL) também demonstrou interromper a organização e o empacotamento lipídico nas células endoteliais, levando a alterações biomecânicas que interferem na lesão e reparo da membrana. Para macrófagos sabe-se que a exposição à oxLDL leva a ativação celular, produção de citocinas e formação de células espumosas, todas essas contribuindo para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. No entanto, pouco se sabia sobre o impacto da exposição de macrófagos à oxLDL na organização de domínios estruturados de membrana, ricos em colesterol, e as consequências desses eventos para a biomecânica dessa célula. Assim, realizamos a exposição de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) com oxLDL e observamos que o tratamento não apenas alterou a estrutura da membrana e potencialmente a distribuição de domínios ricos em colesterol, mas também induziu rearranjo de actina, distribuição difusa de integrina e encolhimento celular, semelhante ao observado no tratamento dessas células com M $\beta$ CD (uma droga capaz de sequestrar o colesterol de membrana e desorganizar balsas lipídicas, ricas em colesterol). Essas alterações levaram à diminuição da eficiência de migração dos macrófagos. Para ambos os tratamentos, observou-se maior colocalização do citoesqueleto de actina e GM1, indicando um mecanismo de ação semelhante envolvendo a dinâmica de balsas de membrana. Por último, como o tratamento com M $\beta$ CD, oxLDL também induziu a disseminação lisossomal em BMDM. Dessa forma, nossos resultados indicam que a reorganização induzida por OxLDL do complexo membrana/citoesqueleto em macrófagos pode ser atribuída à desorganização de balsas de membrana ricas em colesterol. Demostramos ainda que esse efeito se deve à inserção de oxisteróis na membrana, que leva a mudanças na organização lipídica e ruptura da estrutura da membrana, semelhante ao efeito da depleção do colesterol por MbCD. Esses resultados indicam que a oxLDL pode induzir alterações físicas no complexo membrana/citoesqueleto dos macrófagos, levando a alterações biomecânicas significativas que comprometem o comportamento celular. Essas alterações, por sua vez, têm implicações importantes no desenvolvimento da aterosclerose, pois contribuem para a fixação dos macrófagos na parede do vaso, potencializando o processo inflamatório para o desenvolvimento da placa de ateroma. Dados representativos são mostrados na Fig. n1, n2, n3 e n4.

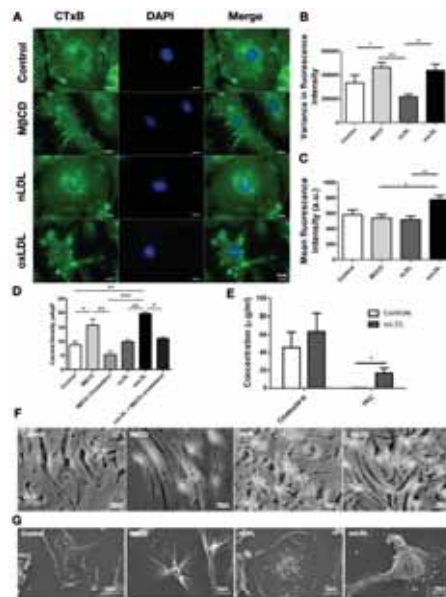


Figura n1: OxLDL and M $\beta$ CD treatments alter membrane ordered domains on macrophage membranes and induce changes in morphology. (A) GM1 labelling (green) indicating membrane ordered domains of BMDM, previously exposed to serum free DMEM containing 5mM M $\beta$ CD for 40 minutes or 50 $\mu$ g/mL of nLDL or oxLDL for 24h. Nuclei are stained with DAPI (blue). (B) Quantification of variance of fluorescence intensity distribution and (C) mean cell fluorescence intensity. (D) Whole cell Kir2.1 current densities in BMDMs exposed to M $\beta$ CD (10mM) for 40min or oxLDL (50 $\mu$ g/ml) for 1h. Rescue of oxLDL-induced increase of Kir2.1 currents by M $\beta$ CD-cholesterol (5mM) is also demonstrated. (E) Mass spectroscopy analysis of cholesterol and 7-ketocholesterol content in membranes of BMDM's treated or not with oxLDL. The analysis used 6 samples for each condition from 3 different animals. (F) bright field and (G) scanning electron microscopy of BMDMs exposed to assigned treatments. One-way ANOVA and Tukey post-test analysis was done in figures 1 B, C and D, and Student's T test in figure 1E  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

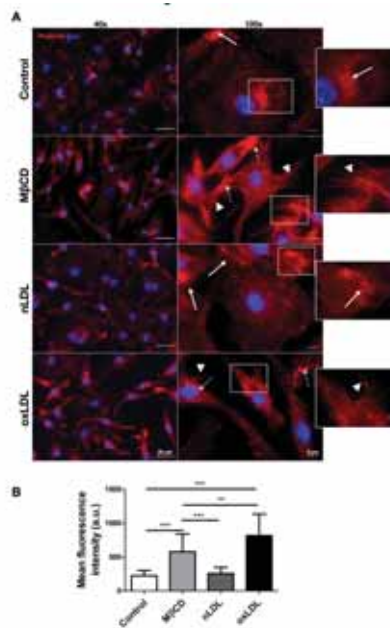


Figura n2: OxLDL and MβCD treatments induce strong actin reorganization. (A) BMDMs were exposed to serum free DMEM containing 5mM MβCD for 40 minutes or 50μg/mL of nLDL or oxLDL for 24h. Cells were then labeled with Alexa Fluor 546- phalloidin (red) to reveal the actin cytoskeleton and DAPI (blue) to reveal cell nuclei. Images were taken in 40x (left) and 100x(right) magnification. Details of the 100x images for each condition are shown on the side. Arrows indicate membrane ruffling; dashed arrows indicate actin clusters and arrowheads indicate retraction fibers. (B) Quantification of mean fluorescence intensity of cells from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences (One-way ANOVA and Tukey post-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

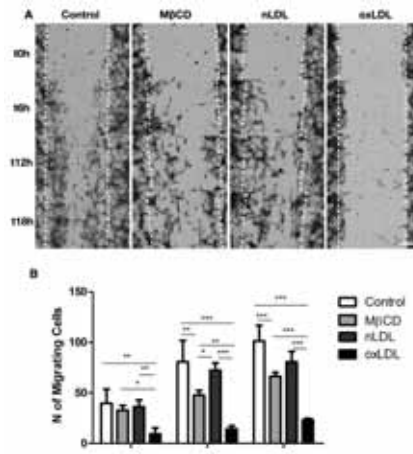


Figura n3: OxLDL and MβCD treated cells show defective migration. (A) Wound healing assay with panels showing bright field representative images of BMDM in 0, 6, 12 and 18h after wound. Cell monolayers were pretreated for 40 minutes with 5mM of MβCD or 24h with 50μg/mL of nLDL or oxLDL, submitted to wound and then imaged during 24 hours in 2% FBS. (B) Quantification of cells that migrated into the wound gap in different conditions (control non-treated, MβCD, nLDL or oxLDL). Asterisks indicate statistically significant differences (Two-way ANOVA \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

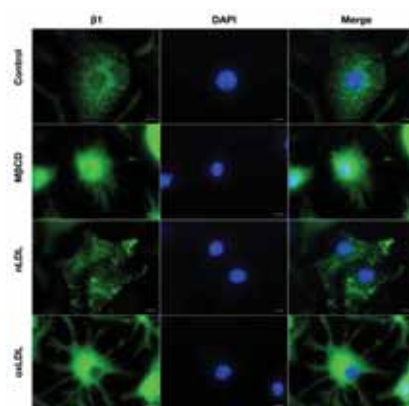


Figura n4: OxLDL and M $\beta$ CD treatments alter  $\beta$ -1 integrin disposition on macrophages.  $\beta$ -1 integrin immunostaining (green) and cell nuclei labeled with DAPI (blue) of BMDM treated or not with 5mM M $\beta$ CD for 40 minutes or 50 $\mu$ g/mL of nLDL or oxLDL for 24h. Scale bars indicate 5 $\mu$ m.

- o) Ajustes de modelos para construção de dispositivo de microfluídica para desenvolvimento de modelo de vaso sanguíneo baseado na tecnologia “organ-on-a-chip” para estudo da aterosclerose

Sistemas de microfluídica apresentam alto potencial para superar as limitações dos modelos animais e dos sistemas de cultura de células bidimensional (2D), permitindo redução do tempo, da quantidade de reagentes e dos custos na pesquisa biológica, alta reprodutibilidade, avaliação dos processos em tempo real, uso de células humanas, além de permitir o controle preciso do microambiente celular. O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos biomiméticos, “organ-on-a-chip”, permite o estudo de diversos processos biológicos (fisiológicos ou patológicos) *in vitro*, que não são possíveis nas culturas em monocamada ou nos modelos animais. Esses microdispositivos possibilitam a obtenção de melhores respostas em ensaios que carecem de uma correlação biológica mais próxima do *in vivo*. Nesse contexto, a criação de dispositivos que reproduzam a parede de um vaso pode auxiliar na melhor compreensão dos fatores envolvidos na formação da placa aterosclerótica. Em estudos anteriores fizemos diversas modelagens para o design de um dispositivo que pudesse reproduzir o microambiente arterial e as forças hemodinâmicas resultantes do fluxo sanguíneo em tempo real. No entanto, novos ajustes tiveram que ser realizados para alcançarmos esses objetivos frente a limitações do material a ser usado no dispositivo, como interface para o plaqueamento celular e reprodução da parede dos vasos. Sendo assim, novas modelagens foram realizadas para melhor recapitular, de forma adequada, as condições que ocorrem no microambiente vascular *in vivo*. Paralelamente vimos otimizando o crescimento das células endoteliais sobre as nanofibras de acetato de celulose, as quais serão usadas no dispositivo.

-Novo design do dispositivo microfluídico:

Nesse novo design foram alteradas a geometria do dispositivo, sendo modificados espessura e formato do canal para ajuste do fluxo e para melhor representar as forças de cisalhamento reais, comparadas àquelas de vasos saudáveis ou predispostos a formação de placa, usando-se modelos de carótida murino do grupo de pesquisa da Profa. Luciana Andrade em colaboração com o grupo do

Professor Stergiopoulos – EPFL, Suíça. No primeiro design, ajustes na morfologia do canal haviam sido realizados com o intuito de se adequar as forças de cisalhamento. No entanto, esse design se distanciava do modelo original murino, o qual seria utilizado para comparação. Sendo assim, foram realizados ajustes no comprimento, altura e espessura do canal, para se obter fluxos capazes de reproduzir as forças de cisalhamento geradas em um foranto mais próximo do modelo murino. Para tal, novamente modelos de análise numérica foram implementados, utilizando-se o software COMSOL, em parceria com o Departamento de Estruturas da UFMG e a FioCruz-Minas para acesso ao software.

Dados deste novo design são apresentados a seguir.

-Modelo computacional

1) Geometria

Comprimento de entrada

$$L_{h,laminar} = 0,05 \times Re \times D = 0,05 \times Re \times (4A/P)$$

$$\text{Para } Re = 0,4, A = (100 \times 500) \mu\text{m}^2, P = (500 + 500 + 100 + 100) \mu\text{m}$$

$$L_{h,laminar} = 0,05 \times 0,4 \times (200000/1200) \mu\text{m} = 3,33 \mu\text{m}$$

Sendo assim, um comprimento de canal com 3,33  $\mu\text{m}$  ou mais de comprimento já garante uma condição de escoamento completamente desenvolvido. Considerando as dimensões da lamínula utilizada para a vedação (24 mm x 24 mm) eu um punch de biópsia com 1 mm de diâmetro externo, a geometria do dispositivo foi projetada como se segue (Fig. o1, o2, o3 e o4):

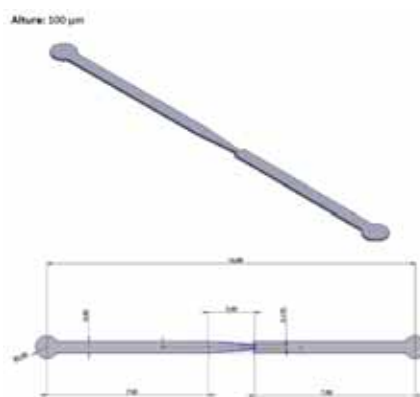


Figura o1: Geometria e dimensões do dispositivo (em mm)

2) Simulação:

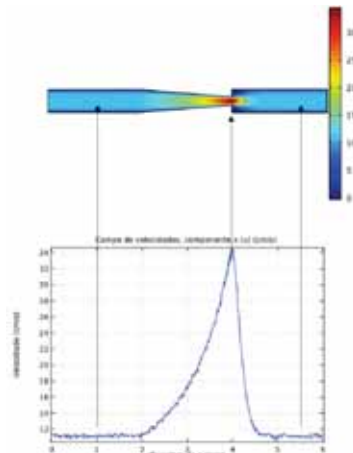


Figura 02. Distribuição das velocidades (Cima) e Velocidades em uma linha de simetria (plano médio - y constante) (Baixo)

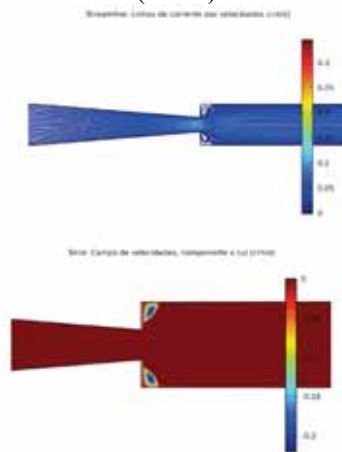


Figura 03. Linhas de correntes do escoamento (Cima) e velocidades nas regiões de vórtice (Baixo).

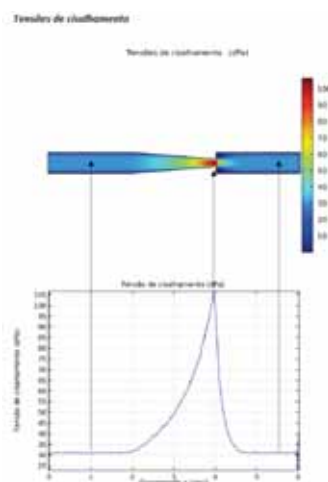


Figura 04. Distribuição das tensões de cisalhamento (Cima) e Tensões de cisalhamento em uma linha de simetria (plano médio - y constante) (Baixo).



p) Caracterização e otimização de culturas 3D de células musculares em substratos formados por nanofibras de acetato de celulose, para fins de desenvolvimento de fonte de proteína alternativa em indústria de alimentos

A carne cultivada é um ramo promissor e emergente da engenharia de tecidos que visa produzir carne em laboratório. A carne cultivada pode ser gerada pelo crescimento de células animais em *scaffolds*, biomateriais capazes de mimetizar a matriz extracelular (MEC). Atualmente, a carne produzida por técnicas da engenharia de tecidos não possui a morfologia, a ultraestrutura e o nível de diferenciação encontrados no músculo nativo. Além disso, para uma experiência completa de sabor e textura, a carne cultivada deve ter gordura. A mimetização dessas propriedades exigiria a co-cultura de mioblastos com adipócitos. No entanto, a co-cultura de vários tipos de células é tecnicamente desafiadora, uma vez que cada tipo de célula cresce e se diferencia em meios específicos. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é produzir cortes inteiros de carne, por meio da combinação da carne cultivada e de técnicas de produção de alimentos à base vegetal. Um *scaffold* híbrido, feito de nanofibras de acetato de celulose e de micropartículas de alginato incorporados com óleo de canola, está sendo produzido e otimizado para o crescimento de mioblastos de linhagem. As micropartículas contendo óleo de canola irão fornecer a gordura da carne, trazendo sabor e textura semelhantes à gordura animal, com o benefício adicional de serem mais saudáveis, e sem a necessidade de co-cultivo celular. O óleo de canola já é usado em análogos à base de plantas para simular os sabores da carne. Nosso *scaffold* de estrutura híbrida será utilizado para produzir fatias de células musculares e gordura, que serão empilhadas para obter um corte grosso de carne, uma solução simples para a obtenção de cortes inteiros de carne com experiência de sabor e textura. Enquanto os *scaffolds* contendo óleo de canola está sendo produzido, estamos estudando o comportamento dos miócitos apenas nas nanofibras de acetato de celulose. Para tal, foram realizados ensaios de viabilidade e diferenciação no substrato em questão, bem como o comportamento das células após o empilhamento das nanofibras para obtenção de um corte (Figs. p1, p2 e p3).

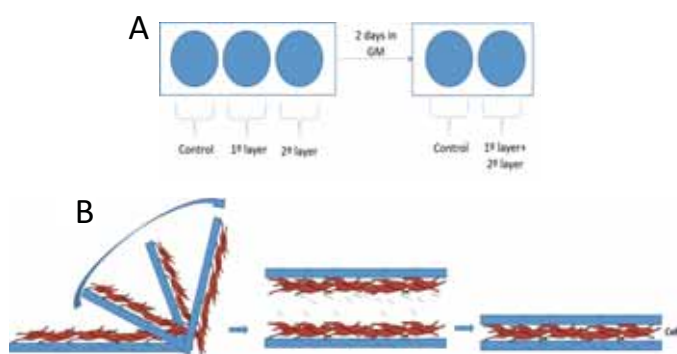


Figura p1: (A)  $5 \times 10^5$  cells were plated in the nanofiber (24-well plate). After 2 days in growth medium, the cells in the nanofibers were stacked as shown in (B). The nanofibers were stacked so the surface with more cells was in contact with the surface with more cells of the other nanofiber.

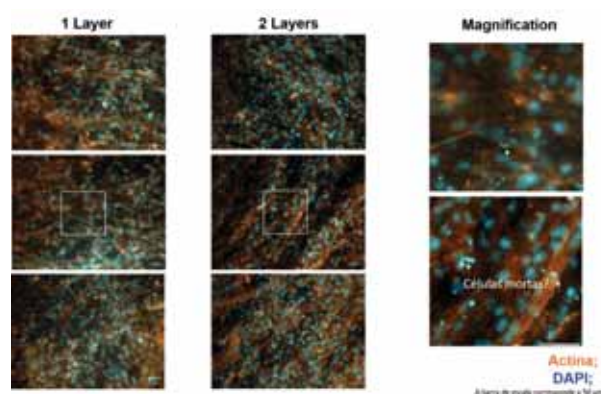


Figura p2: Fluorescence images of of rat cardiomyoblasts (H9c2) cells on cellulose acetate nanofibras after stacking. The nuclei were stained with DAPI (blue) and F-actin filaments were stained with Alexa Fluor® 546 Phalloidin (orange). 10X magnification for the first and second rows and 40X magnification for the third row.

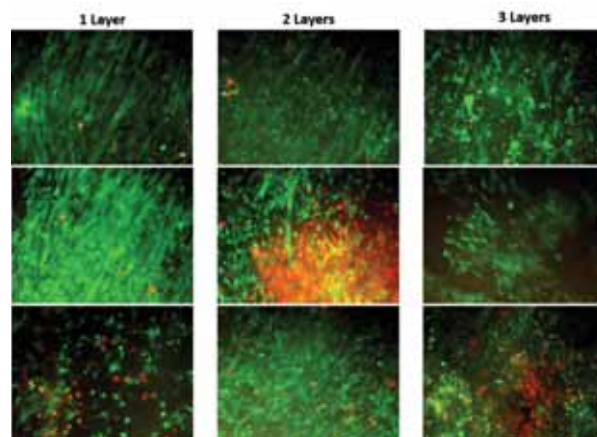


Figura p3: LIVE/DEAD first layer of the groups: the first column refers to one layer, the second column to two layers, and the third column refers to three layers of nanofiber and cell. Live cells in green and dead cells in red. 10X magnification.

A Dra. Débora Levy, seu grupo e colaboradores, são os responsáveis pelas pesquisas relacionadas a seguir.

q) **Modulação do fenótipo de resistência a múltiplas drogas por lipídeos, lipoproteínas e oxisteróis**

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (MDR) na terapêutica do câncer é um importante obstáculo para o tratamento efetivo. Os mecanismos MDR ocasionam a redução intracelular de agentes quimioterápicos e, por consequência, estão envolvidos no fracasso no tratamento do câncer. Estudos sugerem que o colesterol pode estar envolvido diretamente com o

fenômeno de resistência a múltiplas drogas, e que os lipídeos podem influenciar várias e complexas funções no MDR, por afetarem o transporte de drogas através da membrana plasmática [ENREF\\_1](#). Além disso, células tumorais tem maior necessidade de colesterol devido a uma taxa de multiplicação mais elevada que as células normais. Pretende-se estudar a expressão dos genes de resistência das múltiplas drogas em diferentes linhagens tumorais e em células tronco mesenquimais na presença de lipídeos, lipoproteínas e oxisteróis.

### Expressão da proteína ABC-A1 e ABC-G1 em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com LMA (CTM-D)

Baseado nas escolhas das proteínas ABCs foi realizado imunofluorescência indireta das proteínas ABC-A1 e ABC-G1 nas CTM-D tratadas com Triol por 24 horas. Foi observado que o tratamento com 30  $\mu\text{M}$  aumenta a concentração da proteína ABC-A1 quando comparado ao controle ( $p = 0,0370$ ), figura q1A. Referente a proteína ABC-G2, pode-se observar uma tendência no aumento da expressão da proteína de acordo com as concentrações de Triol, entretanto não foi significativo ( $p = 0,0539$ ), figura q1B.

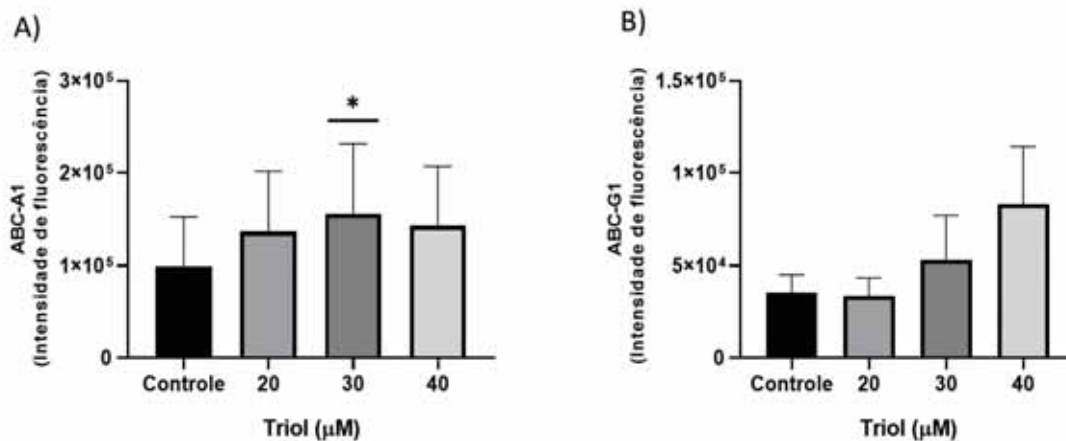


Figura q1: Gráficos representando a expressão proteica das proteínas ABC-A1 e ABC-G1 em CTM-D tratadas com Triol por 24 horas A: Comparação na expressão da proteína ABC-A1 entre as diferentes concentrações de Triol através da análise de variância das médias por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey:  $p = 0,0329$ . B: Comparação na expressão da proteína ABC-G1 entre as diferentes concentrações de Triol através da análise de variância das médias por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey:  $p = 0,0539$ .

### Expressão das proteínas ABC-C1 e ABC-C2 em CTM-D e células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de de indivíduo saudável (CTM-S)

Após o tratamento com Triol e 7-KC nas CTMs por 24 horas, foi avaliado a expressão das proteínas ABC-C1 e ABC-C2 por imunofluorescência indireta, entretanto, apenas uma linhagem CTM-D expressou a proteína. As imunofluorescências indiretas foram realizadas em 10 linhagens de CTMs. Foi observado que menos de 1% das células-tronco mesenquimais expressavam ABC-C1 e ABC-C2. Dessa forma, não foi possível realizar a análise de dados. Portanto, optamos por não trabalhar com essas duas proteínas

### Expressão da proteína ABC-D4 em CTM-D e CTM-S

A proteína ABC-D4 está associada ao transporte de cobalamina intracelular, diretamente relacionado a síntese de DNA. Inicialmente foi analisado se há diferença na expressão da proteína ABC-D4 entre as linhagens CTM-D e CTM-S, figura q2A. Quando foi comparado a intensidade de fluorescência entre as CTMs cultivada em meio basal, foi verificado que a concentração de ABC-D4 foi inferior na linhagem CTM-D em relação a linhagem CTM-S ( $p = 0,008$ ).

Em seguida, foi verificado se o tratamento com Triol e com 7-KC pode alterar a concentração intracelular da proteína ABC-D4. O tratamento com Triol por 24 horas não influenciou na expressão da proteína ABC-D4 ( $p = 0,6940$ ), figura q2B.

Referente ao tratamento com 7-KC, foi observado que as diferentes concentrações de 7-KC alteram a concentração de ABC-D4 ( $p = 0,0297$ ) e que há diferenças entre as linhagens CTM-D e CTM-S ( $p < 0,0001$ ). Na linhagem CTM-D a diferença observada foi entre o controle e o tratamento com  $70 \mu\text{M}$  ( $p = 0,0222$ ). Quanto a linhagem CTM-S a diferença foi entre o controle e o tratamento com  $30 \mu\text{M}$  ( $p = 0,0273$ ), figura 2C.

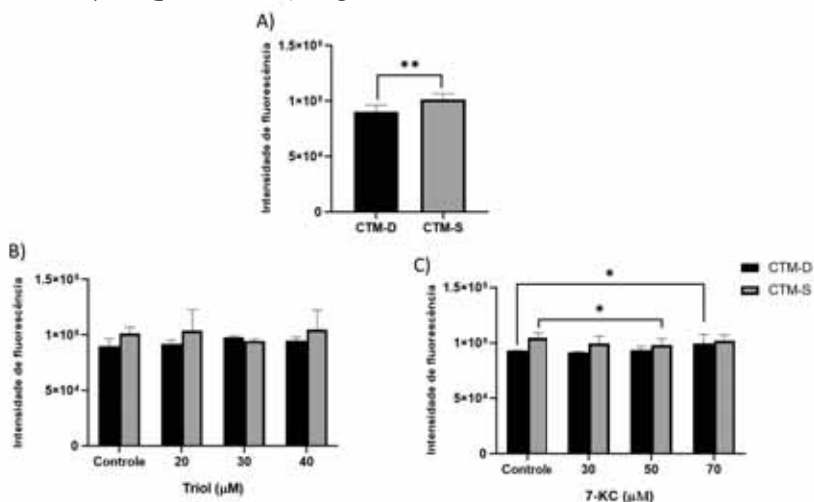


Figura q2: Gráficos representando a concentração da proteína ABC-D4 em CTM-D e CTM-S. **A:** Comparação entre as linhagens CTM-D e CTM-S cultivadas em meio basal por 24 horas através do teste T de Student ( $p = 0,008$ ). **B:** Comparação da concentração de ABC-D4 entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com Triol através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p = 0,6940$ ; fator células:  $p = 0,0098$ ; interação:  $p = 0,1598$ . **C:** Comparação da concentração de ABC-D4 entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p = 0,0297$ ; fator células:  $p < 0,0001$ ; interação:  $p = 0,1249$ .

### Importância dos lipídeos, lipoproteínas e oxisteróis na morte, proliferação e diferenciação de células tronco

#### Análise do tipo de morte celular induzida por Triol em CTM-D Apoptose e necrose

A linhagem CTM-D foi incubada, em concentrações tóxicas de Triol por 24 horas, em seguida, foi avaliado a porcentagem de células em apoptose e necrose. Não foi observado diferença entre o aumento de apoptose nas CTM-D tratadas com 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de Triol ( $p = 0.1156$ ) figura q3A. Entretanto, houve diferença quanto a presença de células necróticas na concentração de 100  $\mu$ M quando comparado as demais concentrações ( $p < 0,0001$ ), figura q3B.

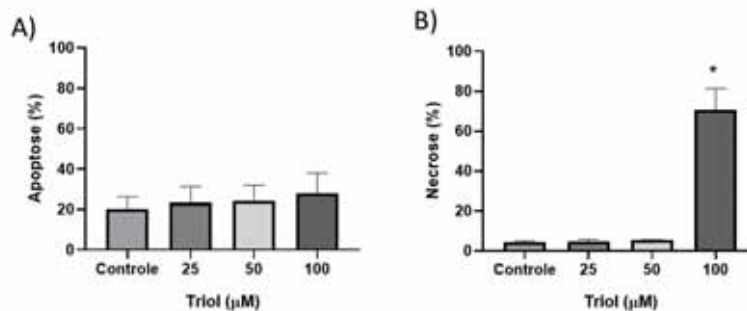


Figura q3: Gráficos representando a porcentagem de células em apoptose (A) e necrose (B) em CTM-D tratadas com diferentes concentrações de Triol por 24 horas. A: Comparação entre as concentrações de Triol quanto a presença de células apoptóticas, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey:  $p = 0.1156$ . B: Comparação entre as concentrações de Triol quanto a presença de células necróticas, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey:  $p < 0,0001$ .

### Inibidores de morte celular

Após avaliar a presença de apoptose e de necrose nas CTM-D tratadas com Triol, foi investigado o tipo de morte induzida por Triol. Para tanto, foi utilizado drogas inibidoras das principais vias de morte, da apoptose (Z-VAD-FMK), da autofagia (3-MA) e da necrose (Necrostatin-1). Devido a concentração de 100  $\mu$ M de Triol diminuir o número de células viáveis para avaliar a ativação e inibição das vias de morte, foi optado por realizar este experimento nas concentrações de 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 75  $\mu$ M de Triol, por um período de 24 horas.

As células cultivadas apenas com Triol, sem incubações com os inibidores de morte, foram utilizadas como controle. A incubação com Z-VAD-FMK não alterou o número de células mortas quando comparado ao tratamento apenas com Triol, em nenhuma das concentrações testadas ( $p = 0,4967$ ), figura q4A. A incubação com 3-MA quando comparado ao tratamento apenas com Triol também não alterou o número de células mortas ( $p = 0,0798$ ), figura q4B. Todavia, foi observado uma diminuição no percentual de células mortas tratadas com Triol e incubadas com necrostatin-1 (22%) quando comparado as células apenas tratadas com Triol (36%) na concentração de 75  $\mu$ M ( $p = 0,0281$ ), figura 4C.

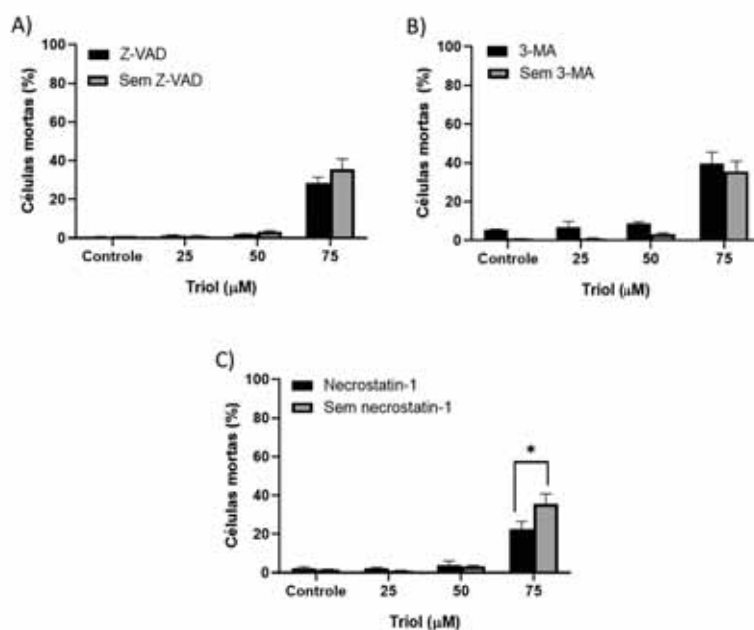


Figura q4: Gráficos representando a porcentagem de células mortas tratadas com Triol e incubadas com ou sem inibidores de morte na linhagem CTM-D. A: Comparação entre tratamento com Z-VAD e sem Z-VAD, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p = 0,0001$ ; fator inibidor:  $p = 0,4967$ ; interação:  $p = 0,6303$ . B: Comparação entre tratamento com 3-MA e sem 3-MA, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p = 0,0081$ ; fator inibidor:  $p = 0,0798$ ; interação:  $p = 0,8777$ . C: Comparação entre tratamento com necrostatin-1 e sem necrostatin-1, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p = 0,0084$ ; fator inibidor:  $p = 0,0884$ ; interação:  $p = 0,0217$ .

Em seguida, foi avaliada a ativação das caspases 3/7 com os inibidores de morte nas CTM-D tratadas com Triol. Não foi observado nenhuma diferença na ativação das caspases 3/7 incubadas com Z-VAD-FMK quando comparado ao tratamento apenas com Triol ( $p = 0,0680$ ), figura q5A. A incubação com 3-MA não alterou a ativação da caspase 3/7 em relação ao tratamento com Triol ( $p = 0,7221$ ), figura q5B. No entanto, foi observado uma diminuição de células positivas para a ativação das caspases 3/7 na concentração de 75 μM de Triol incubadas com necrostatin-1 (13%) quando comparado ao tratamento apenas com Triol (20%) ( $p < 0,0001$ ), figura q5C.



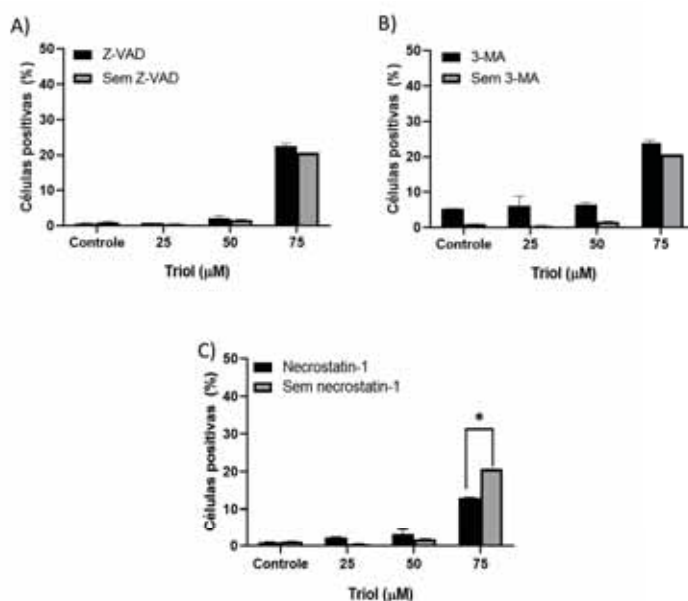


Figura q5: Gráficos representando a porcentagem de células positivas para caspase 3/7 tratadas com Triol e incubadas com ou sem inibidores de morte na linhagem CTM-D. A: Comparação da ativação da caspase 3/7 entre tratamento com Z-VAD e sem Z-VAD, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p < 0,0001$ ; fator inibidor:  $p = 0,0680$ ; interação:  $p = 0,0817$ . B: Comparação entre tratamento com 3-MA e sem 3-MA, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p < 0,0001$ ; fator inibidor:  $p = 0,0003$ ; interação:  $p = 0,7221$ . C: Comparação entre tratamento com necrostatin-1 e sem necrostatin-1, análise realizada com ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento:  $p < 0,0001$ ; fator inibidor:  $p = 0,0070$ ; interação:  $p = < 0,0001$ .

### Estudo do metabolismo lipídico em pacientes portadores de linfoma.

A casuística desse trabalho foi composta por 69 pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B (DLBCL). A tabela q1 apresenta as características clínicas dos pacientes com DLBCL. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento quimioterápico com R-CHOP (uma associação de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona, mais o anticorpo monoclonal rituximabe), influencia nas atividades séricas arilesterase e paraoxonase da enzima paraoxonase-1 (PON-1), bem como em marcadores do perfil lipídico durante as fases do ciclo de quimioterapia. Para tanto, foram coletadas amostras biológicas dos pacientes com DLBCL em três períodos diferentes: ao diagnóstico (T1); durante o período de quimioterapia (T2), tempo médio de 21 dias; e ao término dos ciclos de quimioterapia (T3). Durante o período de acompanhamento houve censura, ou seja, perda de segmento, de 5 pacientes. Esses pacientes foram retirados das análises de comparação de variáveis nos períodos T2 e T3.

Tabela q1: *Clinical characteristics in DLBCL patients (N=69(%)).*

<i>Gender</i>	
<b>Masc</b>	34 (49.3)
<b>Fem</b>	35 (50.7)
<i>Age (years)</i>	
	59 (18-85)
<i>Extranodal sites (≥2)</i>	
	47 (68.1)

<b>Extranodal origin</b>		23 (33.3)
<b>IPI</b>	<i>Low</i>	42 (60.9)
<i>risk</i>	<i>High</i>	27 (39.1)
<i>risk</i>		
<b>Bone marrow</b>		6 (8.7)
<b>Bulky</b>		30 (43.5)
<b>Progression</b>		17 (24.6)
<b>Complete response</b>		58 (85.3)
<b>Death</b>		25 (36.2)
<b>Time in months (OS)</b>		53 (1 – 80)
<b>Time in months (PFS)</b>		14 (4 – 58)

### Influência do tratamento com R-CHOP no perfil lipídico de pacientes com DLBCL

Através da análise de variância foi verificado se o tratamento com R-CHOP apresentava influência no aumento e/ou diminuição dos marcadores do perfil lipídico e nas atividades da enzima PON-1. Dos 13 parâmetros avaliados, foi observado diferença significativa em 9 deles. As diferenças encontradas foram em relação ao período T1 quando comparada aos demais períodos, T2 e T3 ( $p < 0.05$ ). Dessa forma, foi observado aumento da atividade enzimática arilesterase, na concentração sérica de colesterol total, de HDL (e enzimas acessórias), de VLDL, e de triglicérides. Entretanto, foi observado diminuição na concentração sérica na razão entre ApoB:ApoA1 ( $p = 0.016$ ).

### Impacto dos marcadores lipídicos na sobrevida global de pacientes com DLBCL

Foi avaliado o impacto da concentração sérica lipídica na OS (Overall survival) de pacientes com linfoma. As variáveis numéricas foram categorizadas em dois grupos, *Low* e *High*, de acordo com o valor da mediana no tempo T1. Este valor de corte foi utilizado nos demais tempos de acompanhamento, T2 e T3. A tabela q3 apresenta o cálculo da probabilidade de sobrevivência acumulada no período de 60 meses para as variáveis do perfil lipídico. São apresentados os dados de media de tempo de sobrevivência apenas para as variáveis que apresentaram diferença no período T1.

Tabela q3: *Estimate of cumulative global survival by time in months*

Variable	6 months	12 months	24 months	36 months	48 months	60 months	P value
<i>Arylesterase</i> <i>Low</i> (n=55)	0.95	0.89	0.74	0.70	0.62	0.57	0.228
<i>High</i> (n=14)	1.00	0.93	0.78	0.78	0.78	0.78	
<i>Paraoxonase</i> <i>Low</i> (n=33)	0.91	0.82	0.69	0.62	0.52	0.47	<b>0.049</b>
<i>High</i> (n=34)	1.00	0.97	0.79	0.78	0.78	0.72	
<i>ApoA1</i> <i>Low</i> (n=35)	0.91	0.85	0.68	0.65	0.61	0.61	0.450
<i>High</i> (n=34)	0.97	0.94	0.82	0.79	0.67	0.64	
<i>ApoA2</i> <i>Low</i> (n=35)	0.95	0.95	0.73	0.63	0.61	0.58	0.200
<i>High</i> (n=34)	0.97	0.92	0.82	0.82	0.72	0.68	
<i>ApoB</i> <i>Low</i> (n=35)	0.94	0.89	0.86	0.83	0.73	0.70	0.318
<i>High</i> (n=34)	0.97	0.91	0.63	0.60	0.60	0.60	

<i>ApoE</i>	Low (n=35)	0.94	0.91	0.91	0.86	0.82	0.79	<b>0.002</b>
	High (n=34)	0.97	0.88	0.56	0.56	0.49	0.45	
<i>Cholesterol</i>	Low (n=35)	0.94	0.91	0.85	0.82	0.72	0.66	0.472
	High (n=34)	0.97	0.88	0.66	0.60	0.60	0.60	
<i>Triglycerides</i>	Low (n=35)	1.00	1.00	0.94	0.91	0.85	0.81	<b>&lt;0.001</b>
	High (n=34)	0.91	0.80	0.55	0.51	0.44	0.44	
<i>HDL</i>	Low (n=35)	0.91	0.83	0.59	0.56	0.52	0.52	<b>0.016</b>
	High (n=34)	1.00	0.97	0.91	0.88	0.78	0.74	
<i>LDL</i>	Low (n=36)	0.94	0.89	0.83	0.80	0.71	0.64	0.750
	High (n=33)	0.97	0.91	0.65	0.62	0.62	0.62	
<i>VLDL</i>	Low (n=38)	0.97	0.97	0.90	0.86	0.81	0.77	<b>0.001</b>
	High (n=31)	0.94	0.81	0.57	0.53	0.49	0.40	
<i>ApoB:ApoA1</i>	Low (n=35)	1.00	0.97	0.91	0.91	0.82	0.78	<b>0.002</b>
	High (n=34)	0.91	0.82	0.57	0.51	0.47	0.42	
<i>TG: HDL</i>	Low (n=34)	1.00	0.97	0.91	0.88	0.78	0.74	<b>0.012</b>
	High (n=34)	0.91	0.82	0.58	0.55	0.51	0.45	
<i>Q192R PON1</i>	QQ (n=36)	0.97	0.89	0.80	0.74	0.68	0.64	0.275
	QR (n=23)	0.91	0.87	0.61	0.56	0.56	0.56	
	RR (n=9)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	
<i>L55M PON1</i>	LL (n=36)	0.94	0.89	0.75	0.75	0.68	0.68	0.813
	LM (n=24)	0.96	0.92	0.74	0.65	0.59	0.55	
	MM (n=8)	1.00	0.86	0.75	0.75	0.75	0.56	
<i>A148G PON2</i>	AA (n=33)	0.94	0.94	0.79	0.76	0.72	0.63	0.862
	AG (n=31)	0.97	0.84	0.70	0.66	0.61	0.61	
	GG (n=4)	1.00	1.00	0.75	0.50	0.50	0.50	
<i>S311C PON2</i>	SS (n=37)	0.95	0.92	0.78	0.72	0.70	0.61	0.908
	SC (n=24)	0.96	0.83	0.65	0.60	0.60	0.60	
	CC (n=5)	1.00	1.00	0.80	0.80	0.60	0.60	

A Dra. Sarah Alves, seu grupo e colaboradores, são os responsáveis pelas pesquisas relatadas a seguir.

r) **Uso do Z-Scan para determinação do índice ALU em amostras de DNA plasmático de pacientes com câncer de próstata.**

Durante o período desse relatório foi finalizado o estudo de pacientes com câncer de próstata comprovado por exame anatomopatológico e bioquímico de PSA sérico com idade maior do que 18 anos, livres de tratamento quimioterápico ou radioterápico, sem comorbidades de próstata atendidos no Ambulatório de Urologia da Faculdade de Medicina do ABC. Como controle, foram utilizadas amostras de DNA plasmático de homens saudáveis sem alterações prostáticas, com valores de PSA dentro da normalidade (abaixo de 1,5 ng/ mL) e sem histórico de câncer de próstata na família.

Os resultados de Z-Scan foram correlacionados com os seguintes parâmetros: PSA ao longo do tempo, Gleason da Biópsia, Gleason do Anatomo-patológico, Estadiamento Clínico, Estadiamento Patológico, Recidiva Bioquímica, Recidiva Clínica e ALU ao longo do tempo. Os resultados mostraram que a técnica de Z-Scan é sensível a variação do PSA ao longo do tratamento, ao Estadiamento Anatomo-patológico, entretanto não é sensível ao Estadiamento Clínico.

Em relação a Recidiva Clínica e Recidiva Bioquímica, os resultados de Z-Scan mostram que não há diferença significativa ( $p > 0,6$ ) entre pacientes que apresenta Recidiva Bioquímica dos que não apresentam. Já para a Recidiva Clínica os resultados apontam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os pacientes que apresentam Recidiva Clínica dos que não apresentam. Em relação as escalas Gleason da Biópsia e do Anatomo-Patológico, os resultados do Z-Scan mostram que podemos separar os pacientes em dois grupos: valores de Gleason maiores ou menores que 6 para o Gleason da Biópsia e valores maiores ou menores que 7 para o Gleason do Anatomo-Patológico, entretanto não há diferença significativa dentro de cada grupo.

A Dra. Maria Terêsa Machini, seu grupo e colaboradores, envolvendo a Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, Roberto Salinas e Iolanda Cuccovia, são os responsáveis pelas pesquisas relatadas a seguir.

s) **Peptídeos PLA2-1 e Bo-Met1: entendimento e otimização da ação fungicida, análise da possibilidade de desenvolvimento de resistência e outras ações celulares de interesse em saúde humana**

Peptídeos com atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral ou antitumoral têm sido descritos a partir de fontes naturais e sintéticas. Como estes compostos atuam através de mecanismos diversos aos dos antibióticos tradicionais, eles têm sido amplamente estudados, demonstrando ter alto potencial terapêutico e alguns estão sendo aprovados e utilizados para combater infecções bacterianas e fúngicas de humanos e outros mamíferos. Dentre os exemplos estão: o peptídeo linear Gramicidin D<sup>®</sup>, usado no tratamento de infecções dermatológicas e oftálmicas contra bactérias gram-positivas, Daptomycin<sup>®</sup>, um lipopeptídeo cíclico usado no tratamento de infecções sistêmicas causadas, principalmente, por *Staphylococcus aureus*, Anidulafungin<sup>®</sup> e Caspofungin<sup>®</sup>, dois peptídeos usados no tratamento de infecções fúngicas. Dentre os peptídeos com ação antimicrobianos (AMPs), os antibacterianos e bactericidas estão entre os mais estudados e usados em terapêutica. Em contrapartida, há um número limitado de estudos e aplicações envolvendo peptídeos com ação antifúngica, apesar do aumento crescente no número de casos registrados recentemente de infecções causadas por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., por exemplo. Cabe lembrar que: (i) espécies/cepas de *Candida* são responsáveis por infecções orais, genitais e sanguíneas em humanos e de *Aspergillus* causam infecções pulmonares muito graves; (ii) espécies/cepas desses fungos vem desenvolvendo resistência aos antibióticos tradicionais (anfotericina B, fluconazol, equinocandinas, voriconazol, ou posaconazol para *Candidas*/ voriconazol, isavuconazol, posaconazol ou itraconazol para *Aspergillus*); por isso, tais fungos estão incluídos no rol dos responsáveis por infecções sistêmicas malignas em pacientes imunodeprimidos.

Hoje, sabe-se ainda que os AMPs têm sido relacionados à uma menor indução de resistência dos microrganismos, o que permite explorar ainda mais a interação peptídeo-membrana. Também tem sido descrito que muitos AMPs apresentam atividades antitumoral e antiviral, o que os torna ainda mais interessantes sob o ponto de vista científico e valiosos comercialmente, pois ao longo da história o reino animal travou/trava grandes batalhas contra os diferentes tipos de câncer e infecções virais (gripes, dengue e, hoje, a COVID-19, capazes de exterminar rapidamente grande parte dos animais superiores. De fato, AMPs como a melitina, cecropina e magainina, tem apresentado, além de ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, ação contra vários tipos de tumores sólidos e hematológicos, bem como ação contra uma gama de vírus, como por exemplo o HIV, HSV, Papiloma e Influenza.

No período ao qual se refere o presente relatório, nos dedicamos ao *design* de peptídeos análogos a PLA2-1 e Bo-Met1 que teve como principal objetivo otimizar a ação candidacida dos mesmos e avaliar se eles e os possíveis análogos propostos poderiam exibir ação antitumoral e/ou antiviral.

Ao realizar um estudo teórico usando simulação computacional que permitiria prever e analisar propriedades físico-químicas e estruturais importantes para o desenvolvimento de novos fármacos de interesse clínico (agentes antimicrobianos, antitumorais, anti-inflamatórios e/ou antivirais), tais como índice de estabilidade, propensão à formação de agregados, toxicidade, antigenicidade e capacidade de permeabilização celular, capacidade de penetração celular e de atravessar a barreira hematoencefálica (Figura s1), chegamos a resultados inéditos que nos apontaram análogos (A-D; E-J) de PLA2-1 e Bo-Met1 que, em teoria, devem apresentar baixas citotoxicidade e tendência de agregação em solução. Como mostra a Tabela s1, alguns deles exibem alto potencial antitumoral, anti-inflamatório e antiviral, porém baixo potencial para atravessar a barreira hematoencefálica (BBB). As estruturas secundárias previstas para os dois AMPs com ação em estudo e seus análogos estão mostradas na Figura s2. Tais análogos desenhados, portanto, precisarão ser obtidos e examinados experimentalmente com vistas a comprovar os resultados atuais.

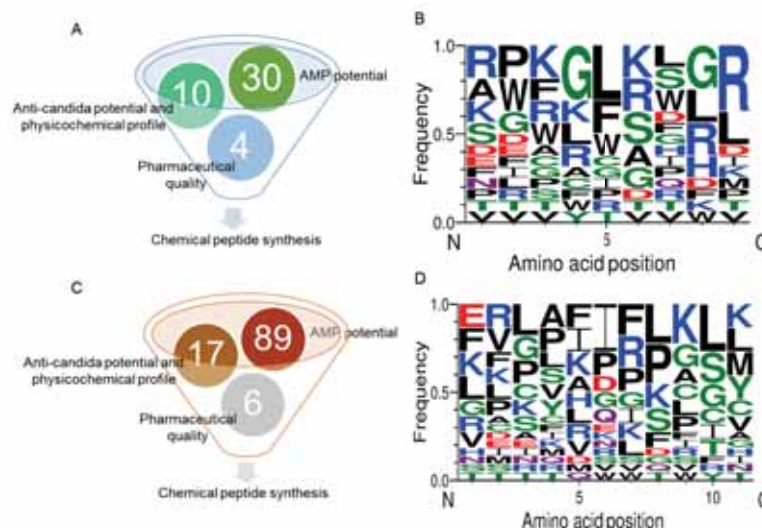


Figura s1: Resumo do estudo realizado para a proposição de análogos de Bo-Met1 (A e B) and PLA2-1 (C e D) que podem ser sintetizados, testados e estudados. A e C resumam o processo de otimização empregado para cada

peptídeo candidacida. B e D mostram a sequência logo obtida da sobreposição dos peptídeos com 9 e 11 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

Table s1: Características físico-químicas dos análogos de Bo-Met1 (A-D) e PLA2-1 (E-J) desenhados com potencial de exibir atividades anti-Candida e candidacida.

Peptides	Sequence	AMP prediction *	Anti-candida	Net charge	Hydrophobicity	Hydrophobic moment	Hydrophobic face
<b>Bo-Met1</b>	LGKIRTKIY	NAMP 0.384	Active	+3	0.392	0.549	None
Bo-Met1.1	A	AMP 0.982	Active	+3	0.464	0.735	None
Bo-Met1.2	B	AMP 0.980	Active	+3	0.476	0.742	None
Bo-Met1.3	C	AMP 0.951	Active	+2	0.692	0.788	None
Bo-Met1.4	D	AMP 0.946	Active	+2	0.681	0.785	None
<b>PLA2-1</b>	KIAKRSGVWFY	AMP 0.815	Not Active	+3	0.482	0.362	None
PLA2-1.1	E	AMP 0.864	Active	+3	0.586	0.475	None
PLA2-1.2	F	AMP 0.831	Active	+3	0.475	0.153	None
PLA2-1.3	G	AMP 0.839	Active	+2	0.852	0.164	None
PLA2-1.4	H	AMP 0.940	Active	+2	0.845	0.216	None
PLA2-1.5	I	AMP 0.858	Active	+2	0.978	0.269	None
PLA2-1.6	J	AMP 0.867	Active	+2	0.839	0.390	None

\*Pontuação obtida a partir do banco de dados *CAMP<sub>R3</sub>* usando o *Support Vector Machine (SVM) classifier*. As propriedades físico-químicas listadas foram obtidas para partir de análises realizadas através do *HeliQuest analysis* (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).



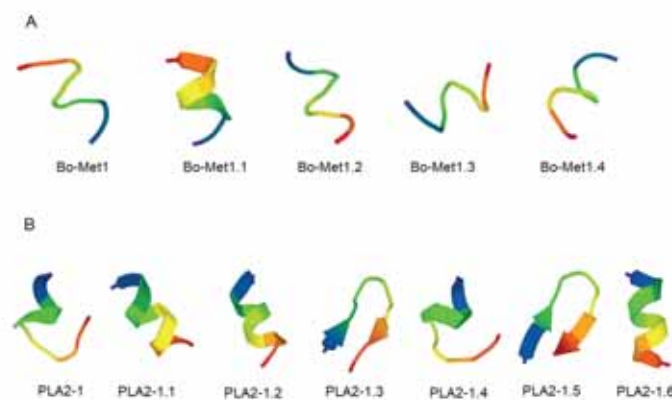


Figura s2: Estruturas propostas para Bo-Met1 (A), PLA2-1 (B) e análogos usando PEP-FOLD3.

A Dra. Lilia Courrol, seu grupo e colaboradores, são os responsáveis pelas pesquisas relatadas a seguir (t – u).

#### t) Teranóstica: Estratégias SARS-COV-2

Um estudo realizado na China com exames bioquímicos de 99 pacientes com pneumonia por coronavírus refletiu o fenômeno anormal relacionado à hemoglobina dos pacientes. Os resultados demonstraram que as contagens de hemoglobina e neutrófilos da maioria dos pacientes diminuíram, e os valores de índice de ferritina sérica, taxa de sedimentação eritrócito, proteína C-reativa, albumina e desidrogenase de lactato de muitos pacientes aumentaram significativamente. Este traço implica que a hemoglobina do paciente diminuiu, o que faz com que o corpo acumule íons de ferro prejudiciais, o que conseqüentemente resulta em inflamação no corpo, o que aumenta a quantidade de proteína C-reativa e albumina. As células reagem ao estresse devido à inflamação, produzindo grandes quantidades de ferritina para ligar íons de ferro livres para reduzir os danos. A hemoglobina consiste em quatro subunidades, 2- $\alpha$  e 2- $\beta$ , e cada subunidade tem uma heme de ferro. A heme é uma componente importante da hemoglobina. É uma porfirina contendo ferro. A estrutura sem ferro é a protoporfirina IX ou PpIX. Quando o ferro é bivalente, a hemoglobina pode liberar dióxido de carbono e capturar átomos de oxigênio em células alveolares, e o ferro é oxidado a trivalente. Quando a hemoglobina é disponibilizada para outras células do corpo através do sangue, ela pode liberar átomos de oxigênio e capturar dióxido de carbono, e o ferro é reduzido a bivalente. Acredita-se que a combinação de proteínas virais e porfirinas cause uma série de reações patológicas humanas, alteração na produção de ALA e diminuição da hemoglobina. A propósito, foi relatado um aumento da concentração de porfirina no soro de 134 pacientes com COVID-19 na fase aguda da doença.

Nossa hipótese é que o SARS-Cov-2 dependa do ferro para se replicar dentro das células hospedeiras vivas e que obtenha este ferro às custas da hemoglobina e da heme, que uma vez interrompidas, liberam a PpIX. Isso nos faz pensar que a administração de ALA/HALNPs

provavelmente induzirá uma grande concentração de NPs nas proximidades dos vírus. A toxicidade das nanopartículas e as terapias fototérmica, fonodinâmica e sonodinâmica poderiam então ser exploradas como agentes de combate ao vírus.

#### u) Estudos espectroscópicos de óleos vegetais

Em razão da alta sensibilidade da técnica de espectroscopia de fluorescência, a composição química diferenciadas resulta em características espectrais e de decaimento fluorescente distintas, que possibilita a determinação de adulteração, mesmo pela adição de um óleo com estrutura química semelhante como foi o caso da presença de óleo de soja convencional em óleo orgânico. Os resultados de fluorescência do estado estacionário (FEE) indicaram que quanto maior a presença de óleo convencional no óleo orgânico maior o valor da razão de intensidades  $I_{530}/I_{620}$ , obtida a partir do espectro de emissão das amostras excitadas em 500 nm. Foi possível também se obter curvas de calibração que permitem a quantificação de frações de óleo convencional no óleo orgânico. Com relação as medidas de fluorescência resolvida no tempo (FRT), observamos várias diferenças no tempo de vida médio dos óleos convencionais e orgânicos que permitem a distinção entre um e outro. Particularmente interessante é a excitação em 340 nm e emissão em 460 que mostra uma mudança temporal de ~19 ns para 10 ns para o óleo convencional e o orgânico, respectivamente. Com relação a análise do avanço da oxidação lipídica de óleos de soja convencionais e orgânicos expostos ao estresse térmico sob diferentes condições, observou-se que após os primeiros 30 minutos de aquecimento a alteração na intensidade de emissão em ~435 nm é mais acentuada, com razão de 1,36 para o óleo orgânico e 1,15 para o convencional. Após os 60 minutos de aquecimento parece haver uma estabilização. Os resultados obtidos das análises de FEE indicaram que embora os óleos convencionais apresentem intensidades de emissão maiores, as alterações provocadas pelo aquecimento resultam em alterações semelhantes aos dos óleos orgânicos. Em relação aos resultados obtidos para a FRT observou-se que o óleo convencional, após o aquecimento, apresentou redução do tempo de vida médio das amostras excitadas em 340 nm, responsável pela excitação de ácidos graxos e produtos de oxidação. Já o óleo orgânico não apresentou uma tendência de aumento ou de redução do decaimento fluorescente em razão do aquecimento. Este resultado pode indicar que estes materiais podem atingir estágios de oxidação distintos sob as mesmas condições de aquecimento. Ainda a técnica de FRT apresenta sensibilidade suficiente para indicar alterações em óleos vegetais decorrentes da oxidação lipídica, mesmo em estágios iniciais. Isso pode ser observado devida a grande alteração no sinal temporal observado nos resultados obtidos para excitação em 450 nm (emissão 700 nm) para os óleos convencionais e excitação em 340 nm (emissão 530 nm ) para óleos orgânicos, apresentado na Figura u1.

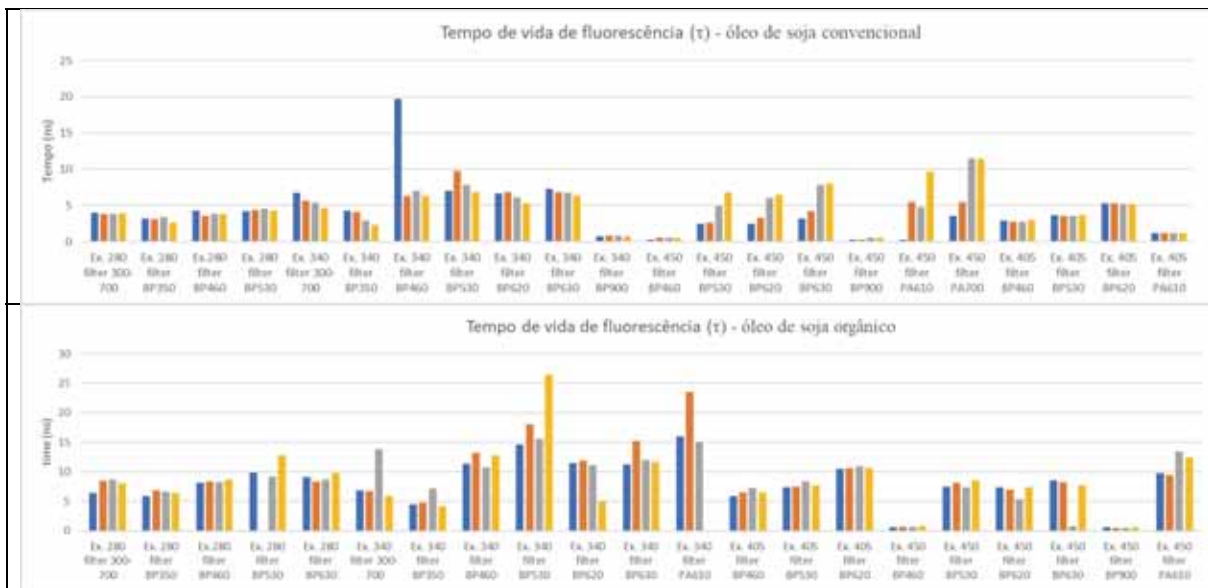


Figura u1: Tempo de vida médio dos óleos de soja antes e após aquecimento.

Os Drs. Nathan Bessa, Bruno Pontes e Paulo Maia, seu grupo e colaboradores, são os responsáveis pelas pesquisas relatadas a seguir (v – w).

### v) Propriedades viscoelásticas de eritrócitos humanos

Em colaboração com o Professor do INCT-FCx Ubirajara Agero Batista (UFMG), desenvolvemos uma metodologia para caracterização das propriedades viscoelásticas de eritrócitos humanos a partir da determinação da forma das células por meio da microscopia de desfocalização e do uso de uma pinça ótica para aplicação de forças e medida das deformações produzidas. A metodologia foi aplicada na caracterização de eritrócitos saudáveis e infectados pelo parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária.

A membrana de eritrócitos pode ser modelada com um material vítreo mole, apresentando uma lei de potência para os módulos elástico e viscoso em função da frequência do estímulo aplicado. De acordo com esse modelo, quando aplicado a eritrócitos, o módulo elástico,  $G'$ , é dado por:

$$G'(\omega) = G_m + G_0 \left( \frac{\omega}{\omega_0} \right)^\alpha, \quad (v1)$$

e o módulo viscoso,  $G''$ , por:

$$G''(\omega) = G_0 \tan(\delta) \left( \frac{\omega}{\omega_0} \right)^\alpha. \quad (v2)$$

Nas Equações v1 e v2,  $\omega_0 = 1\text{rad/s}$  é uma frequência de referência;  $G_m$  é o módulo de cisalhamento independente da frequência;  $G_0$  é o módulo de cisalhamento para baixas frequências;  $\tan(\delta)$  corresponde à razão entre as partes dependentes da frequência, do módulo viscoso e módulo elástico e  $\alpha$  é o expoente que caracteriza a lei de potência de materiais vítreos moles. O valor de  $\alpha$  situa-se entre 0 e a unidade. Para  $\alpha = 1$  o material tem comportamento de líquido, para  $\alpha = 0$  o material tem comportamento de sólido. Dizemos que o material tem comportamento tipo-sólido para  $0 < \alpha \leq 0,5$  e tipo-líquido para  $0,5 < \alpha < 1$ . Eritrócitos saudáveis apresentam comportamento tipo-líquido, com  $\alpha \approx 0.65$  devido a necessidade desse tipo de célula se deslocar por capilares de dimensões menores que as suas. Células aderidas, como fibroblastos, apresentam  $\alpha \approx 0,2$ , indicando comportamento tipo-sólido.

A membrana de um eritrócito saudável apresenta o módulo de elasticidade de um plástico muito macio e a viscosidade do mel. Na Figura v1 são apresentadas imagens de células deformadas e não deformadas e as respectivas reconstruções 3D, obtidas por meio da microscopia de desfocalização, para caracterização da forma. Na Figura v2, os módulos elástico e viscoso de células saudáveis são apresentados.

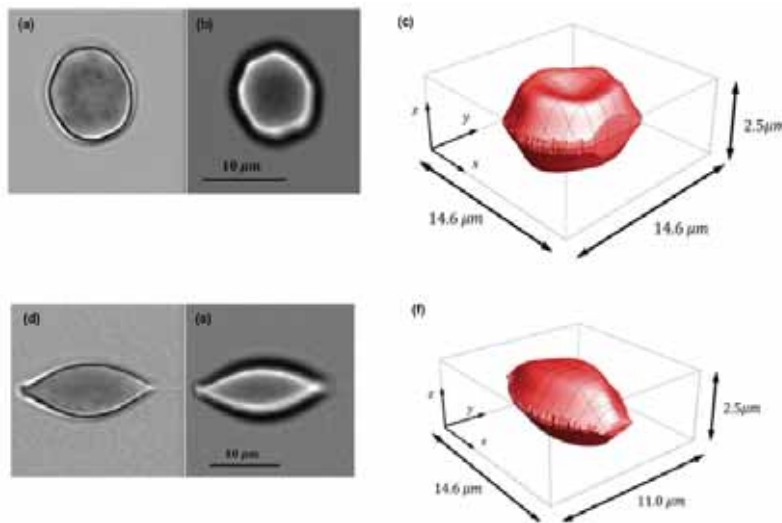


Figura v1: Imagens de eritrócitos saudáveis e reconstrução 3D obtida utilizando microscopia de desfocalização. Célula não deformada em (a), (b) e (c). Célula deformada utilizando uma pinça ótica em (d), (e) e (f).

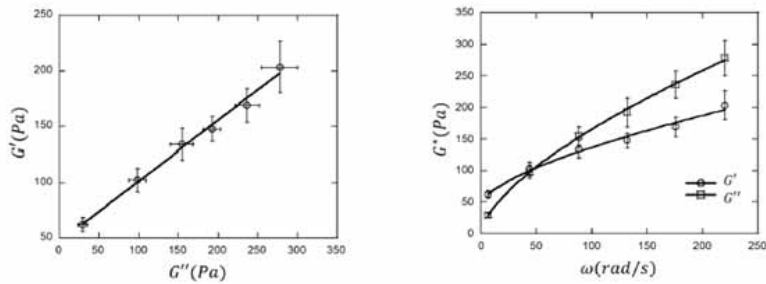


Figura v2: Módulos elástico e viscoso da membrana do eritrócito saudável em função da frequência do estímulo mecânico aplicado ajustados com as Equações 1 e 2.  $G^* = G' + iG''$ .

Quando infectados pelo parasita da malária a membrana do eritrócito enrijece e passa a apresentar um comportamento tipo-sólido em comparação à célula saudável à medida que a fase da infecção avança. Na Figura v3 são apresentadas construções 3D da célula infectada nas fases anel (A, B e C), trofozoíto (D, E e F) e esquizonte (G, H e I), em ordem crescente de severidade da infecção.

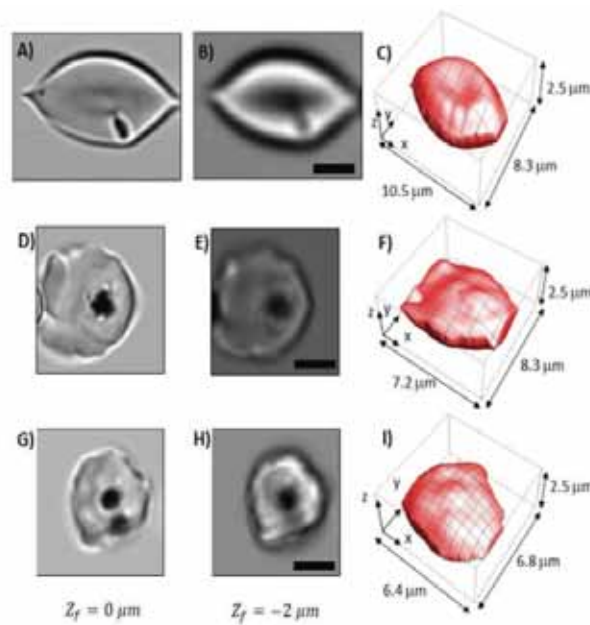


Figura v3: Reconstrução 3D de eritrócitos humanos infectados pelo parasita *Plasmodium falciparum*. Fase anel (A, B, C), fase trofozoíto (D, E e F) e fase esquizonte (G, H e I). Barra de escala  $3\mu\text{m}$ .

Os parâmetros viscoelásticos obtidos para eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum* usando o modelo de materiais vítreos moles estão resumidos na Tabela v1.

Tabela v1: Parâmetros viscoelásticos de eritrócitos humanos infectados pelo parasita *Plasmodium falciparum*.

Condição	$G_m(Pa)$	$G_0(Pa)$	$\alpha$
Saudável	$49 \pm 5$	$5 \pm 1$	$0,65 \pm 9,03$

Anel	$60 \pm 3$	$13 \pm 1$	$0,52 \pm 0,02$
Trofozoíto	$44 \pm 4$	$17 \pm 3$	$0,45 \pm 0,03$
Esquizonte	$58 \pm 8$	$33 \pm 3$	$0,39 \pm 0,02$

Com o desenvolvimento da infecção os parâmetros viscoelásticos  $G_0$  e  $\alpha$  indicam o enrijecimento da célula que passa a apresentar comportamento tipo-sólido, o que diminui a capacidade dela de se deformar para realizar a função de troca de gases no sistema circulatório.

#### w) Teoria não-paraxial da imagem de objetos esféricos no microscópio ótico

Em um trabalho recente a teoria de espalhamento Mie e a propagação dos campos elétricos de iluminação e espalhado foram utilizadas para descrever imagens de objetos esféricos num microscópio ótico convencional. Na Figura v4 o resultado encontrado para uma esfera de poliestireno de raio  $a = (1,47 \pm 0.02)\mu m$  é apresentado. Por meio de um ajuste do contraste observado na imagem com o contraste modelado, foram determinados o raio, o índice de refração e a posição da esfera em relação ao plano focal da objetiva do microscópio. As medidas do raio da esfera e de sua posição em relação ao plano focal foram realizadas com incertezas de  $10nm$ .



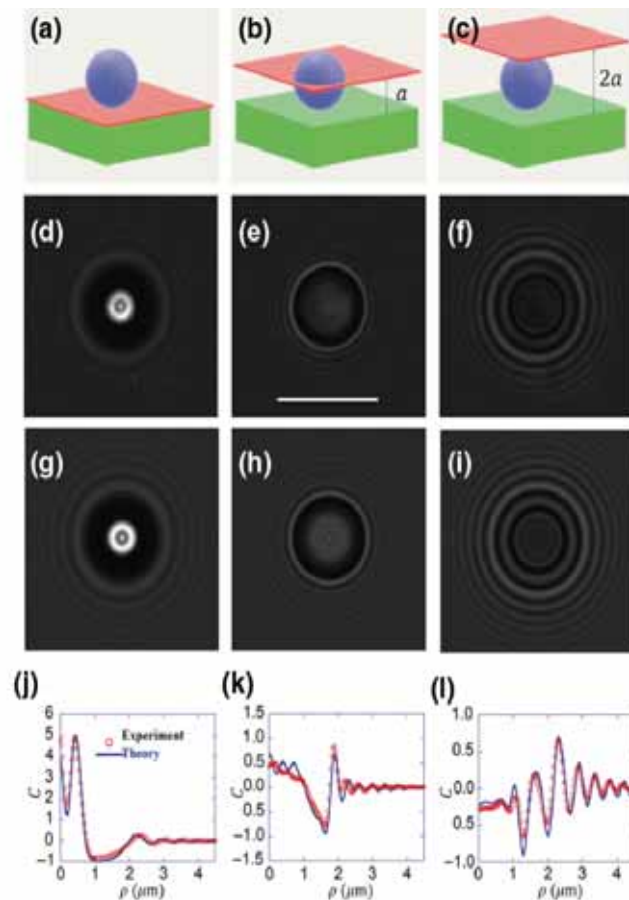


Figura v4: Da esquerda para a direita são apresentadas imagens de uma esfera de poliestireno em contato com uma interface água-vidro à medida que a posição focal do microscópio é alterada, como ilustrado nos painéis de (a) a (c). As imagens correspondentes, experimentais e simuladas, são apresentadas nos painéis de (d)-(e)-(f) e (g)-(h)-(i), respectivamente. Gráficos dos contrastes teórico (linha) e experimental (círculos) em função da distância  $\rho$ , são mostrados nos painéis de (j)-(k)-(l). A barra de escala é a mesma em todas as imagens e é dada por  $5\mu\text{m}$ , como indicado no painel (e).

A imagem da microesfera pode ser usada como um sensor de posição, com sensibilidade para medir deslocamentos axiais com precisão da ordem de  $10\text{nm}$ . Há várias possibilidades para aplicação desse sensor de posição. A medida de efeitos de reverberação ótica na interface vidro-água de um sistema de pinças óticas, envolvendo a medida da constante elástica axial por meio de flutuações brownianas é um exemplo. A caracterização de forças coloidais (Casimir e dupla camada) na geometria plano-esfera através da medida da constante elástica axial de uma pinça ótica, uma vez caracterizados os efeitos óticos, é outra possibilidade. A medida da carga elétrica de partículas coloidais por meio da construção de um capacitor com eletrodos transparentes contendo amostras de esferas em água, na geometria de placas planas, utilizando a microesfera aprisionada na pinça ótica como sensor de força e de posição, é outra opção interessante para determinação direta da carga da partícula coloidal. Outra aplicação vislumbrada é a medida de variações de relevo, de forma similar a um microscópio de força atômica, utilizando

deslocamentos axiais na pinça ótica. A determinação do raio de amarras de membrana ( $\sim 50nm$ ), por exemplo, poderia ser feita sem a necessidade de microscopia eletrônica, utilizando a própria imagem da microesfera usada na pinça ótica para gerar a amarra e para medir o raio da mesma, o que traria dinamicidade e economia de recursos na aplicação de pinças óticas na caracterização de propriedades físicas de membranas celulares.

A Dra. Karin Riske e Kátia Perez, seu grupo e colaboradores, são os responsáveis pelas pesquisas descritas a seguir.

#### x) Interação dos peptídeos antimicrobianos ocelatina com membranas modelo

A interação de ocelatina-Pep2-W2 com membranas biomiméticas (lipossomos) foi estudada por DSC, ITC, fluorescência e espalhamento de luz. O peptídeo ocelatina-Pep2-W2 foi desenhado com base na sequência primária de ocelatina PT7, um peptídeo antimicrobiano purificado a partir da secreção da pele de um sapo (*Leptodactylus pustulatus*). O peptídeo possui a sequência primária VWDIIKGAGKRLIA, massa molecular de 1.539,88 Da, carga +2 e hidrofobicidade de 57%. Além disso, ocelatina-Pep2-W2 apresentou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, na concentração de 1,5  $\mu g/mL$  (1  $\mu M$ ). O peptídeo foi capaz de inibir o crescimento dos parasitas em  $59,31 \pm 4,62\%$ , após 48 h de incubação. Uma vez que o peptídeo apresentou uma promissora atividade leishmanicida faz-se necessário novos estudos que permitam compreender com mais detalhes de que forma ocelatina-Pep2-W2 interage com membranas lipídicas. Portanto, afim de estudar o modo de ação de ocelatina-Pep2-W2, algumas técnicas biofísicas foram aplicadas, dentre elas está a calorimetria diferencial de varredura realizada no equipamento MicroCal VP-DSC. O equipamento é capaz de medir o calor específico associado às mudanças físicas ou conformacionais de uma amostra, portanto, ele pode ser usado para verificar se a interação entre o peptídeo e membranas lipídicas provoca alterações nas propriedades de transição de fase dos lipossomos. O termograma obtido para membranas de DPPG na ausência e na presença de ocelatina-Pep2-W2 está esquematizado na figura x1. Na ausência do peptídeo foi observado apenas um único pico de calor com uma temperatura de *melting* da transição de fase de  $40,1^\circ C$  e  $\Delta H = 11,6$  kcal/mol. A adição de ocelatina-Pep2-W2 provocou uma redução na altura dos picos e o deslocamento dos picos para a esquerda, conforme verificado na figura x1, indicando que houve diminuição na quantidade de lipídeos e redução da fluidez da membrana, respectivamente. Esse efeito foi mais evidenciado especialmente nas razões molares [Lip/Pep] 30, 70, e 100. O peptídeo não ocasionou alterações significativas no  $\Delta H$  e na temperatura de *melting* da transição de fase das membranas de DPPG.

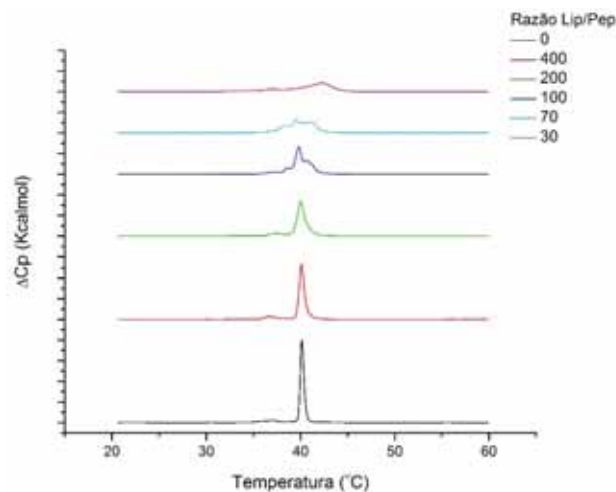


Figura x1: Termograma da calorimetria diferencial de varredura (DSC) de 1 mM de DPPG com ocelatina-Pep2-W2 nas razões molares [Lip/Pep] de 0, 400, 200, 100, 70 e 30. A temperatura da cela variou de 20 a 60°C, com uma velocidade de 20°C/h.

A transição de fase das membranas de DPPC:DPPG na ausência do peptídeo ocorreu em uma temperatura de *melting* de 41,1°C e com  $\Delta H = 9,8$  kcal/mol (figura x2). O aumento na concentração de ocelatina-Pep2-W2 foi acompanhado por uma redução na altura do pico de transição de fase das membranas de DPPC:DPPG, esse efeito foi mais forte nas razões molares [Lip/Pep] 10 e 20. A redução na altura do pico de transição dos lipídeos das membranas na presença de ocelatina-Pep2-W2 é um forte indicativo que o peptídeo pode ter provocado uma redução na quantidade de bicamadas disponíveis para transitar de fase, esse efeito pode ser provocado pela agregação ou destruição das membranas. O peptídeo não ocasionou alterações significativas no  $\Delta H$  e na temperatura de *melting* da transição de fase das membranas de DPPC:DPPG.

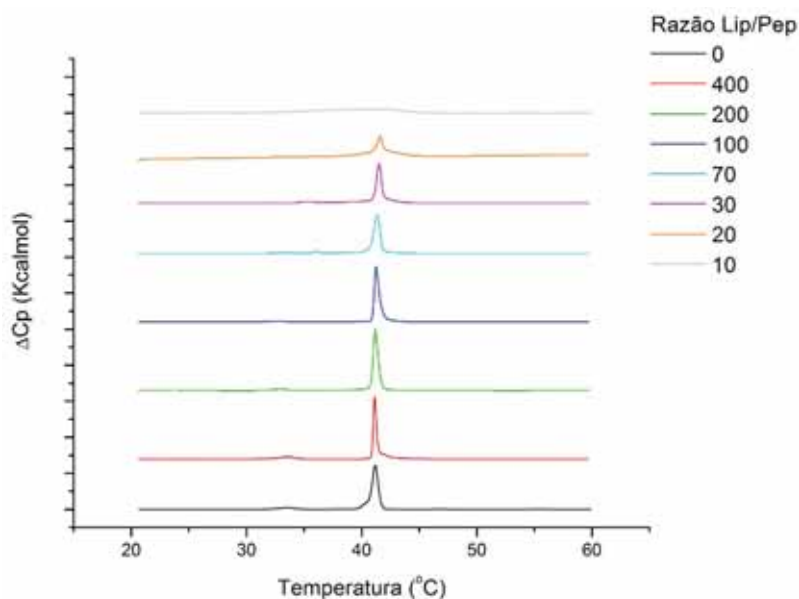


Figura x2: Termograma da calorimetria diferencial de varredura (DSC) de 1 mM de DPPC:DPPG (1:1) com ocelatina-Pep2-W2 nas razões molares [Lip/Pep] de 0, 400, 200, 100, 70, 30, 20 e 10. A temperatura da cela variou de 20 a 60°C, com uma velocidade de 20°C/h.

O peptídeo ocelatina-Pep2-W2 não provocou nenhuma alteração no termograma obtido para membranas de DPPC (figura x3). Não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros termodinâmicos (temperatura de *melting* de transição de fase e  $\Delta H$ ) assim como na altura e disposição dos picos de transição de fase.

A técnica de fluorescência foi usada para medir a porcentagem de vazamento de uma sonda fluorescente auto-suprimida induzida pela ação do peptídeo. Os resultados obtidos para lipossomos de POPC, POPC:POPG e POPG estão mostrados na Figura x3. O peptídeo não é capaz de permeabilizar membranas de POPC, e é muito eficaz em permeabilizar membranas de POPG e POPC:POPG, sendo que para a mistura é necessária uma maior concentração de peptídeo.

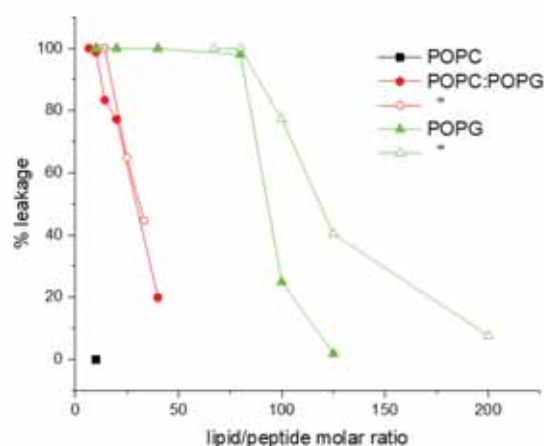


Figura x3: Porcentagem de vazamento induzido pelo peptídeo ocelatina-Pep2-W2 em LUVs de POPC, POPG e POPC:POPG em função da razão molar lipídio/peptídeo.

Em seguida, dados combinados de ITC, fluorescência do Triptofano e espalhamento de luz foram feitos para LUVs de POPC, POPG e POPC:POPG. A interação do peptídeo com POPC foi praticamente nula, enquanto que mostrou se primariamente uma interação exotérmica com membranas contendo POPG, acompanhada de inserção do triptofano na membrana. Uma componente endotérmica foi observada ao final da titulação, principalmente refletindo aumento de turbidez da amostra, provavelmente oriunda de processos de agregação induzidas pelo peptídeo. Os resultados conjuntos das três técnicas estão apresentados na Figura x4 para as composições POPC:POPG e POPG.

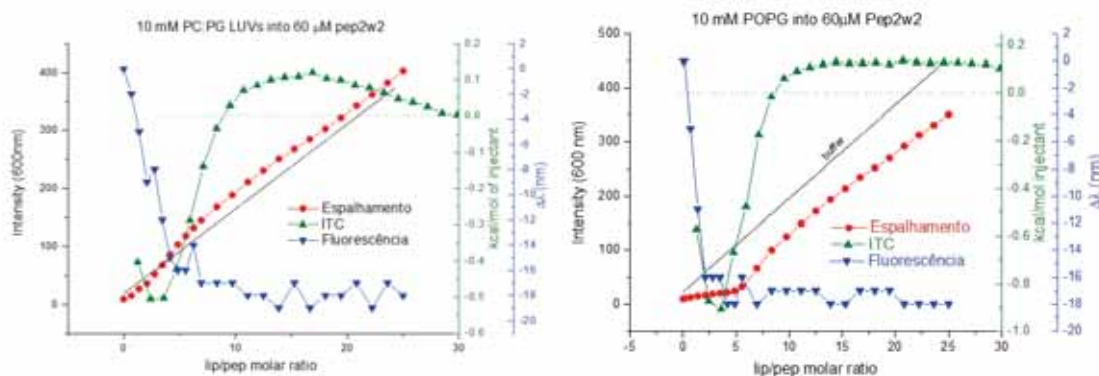


Figura x4: Espalhamento de luz, ITC e blue shift da fluorescência do Triptofano obtidas ao longo da titulação do peptídeo ocelatina-Pep2-W2 com LUVs de POPG e POPC:POPG.

A seguir, os resultados obtidos pela equipe da Universidade Federal de Alagoas na investigação de temas correlatos ao Projeto INCT de Fluidos Complexos. O núcleo da UFAL é composto pelos professores Italo Nunes de Oliveira, Marcelo Leite Lyra, Maria Socorro Seixas Pereira e Sérgio Henrique Albuquerque Lira (y – aa).

#### y) Efeitos de campo elétrico sobre as transições de fase de compostos que apresentam a fase esmética-C

Foram estudadas as transições de fase em sistemas líquido -cristalinos que apresentam a fase esmética C (Sm-C). Este trabalho foi coordenado pelos professores Italo Nunes de Oliveira e Maria Socorro Seixas Pereira da UFAL, sendo realizado em colaboração com o professor Luiz Roberto Evangelista da UEM. Usando um modelo microscópico de campo médio, foram analisados os efeitos de um campo elétrico externo sobre os parâmetros de ordem de uma amostra líquido-cristalina, formada por moléculas calamíticas com um pequeno dipolo elétrico transversal. Em particular, foram estudados os parâmetros de ordem orientacional da fase nemática,  $s$ , de estratificação molecular em camadas da fase esmética,  $\sigma$ , e de orientação biaxial da fase esmética-C,  $\eta$ . Mais especificamente, foram usados os parâmetros típicos do composto DOBHOP.

Na Fig. y1, mostramos a dependência térmica dos parâmetros de ordem  $s$ ,  $\sigma$  e  $\eta$ , para diferentes valores do campo elétrico aplicado. Na ausência do campo, vemos que os parâmetros de ordem,  $\sigma$  e  $\eta$  apresentam comportamento típico de transição de fase esmética-C – esmética-A de segunda ordem, com  $\sigma$  e  $\eta$  indo a zero de forma contínua quando a temperatura do sistema é aumentada, como mostra a Fig. y1(a). À medida que a temperatura é aumentada, vemos que uma sequência de transições de fase de primeira ordem, esmética-A – nemática e nemática – isotrópica, com  $\sigma$  e  $s$  indo a zero de forma descontínua nas respectivas transições. Um cenário distinto é observado quando o campo elétrico é aplicado na direção perpendicular ao plano das camadas. Para campos baixos, vemos um pequeno aumento na temperatura de transição esmética-C –

esmética-A e uma redução da temperatura de transição nemática – isotrópica, como mostra a Fig. y1(b). Além disso, vemos que há o surgimento de uma fase nemática residual, induzida pelo campo, que substitui a fase isotrópica. Esta fase nemática residual é caracterizada por um parâmetro de ordem  $s < 0$ , indicando um alinhamento molecular perpendicular ao campo aplicado. Este comportamento está associado com a polarizabilidade negativa do composto DOBHOP, usado como padrão de comparação para teoria de campo médio molecular. A fase nemática residual se torna mais evidente à medida que o campo externo é aumentado, como mostra a Fig. y1(c). Vê-se ainda que o campo externo suprime as transições esmética-A – nemática e nemática – isotrópica, dando origem a uma transição esmética-A – nemática residual de primeira ordem. Para campos muito fortes, observa-se apenas uma transição de fase esmética-C – nemática residual de primeira ordem, como mostra a Fig. y1(d).

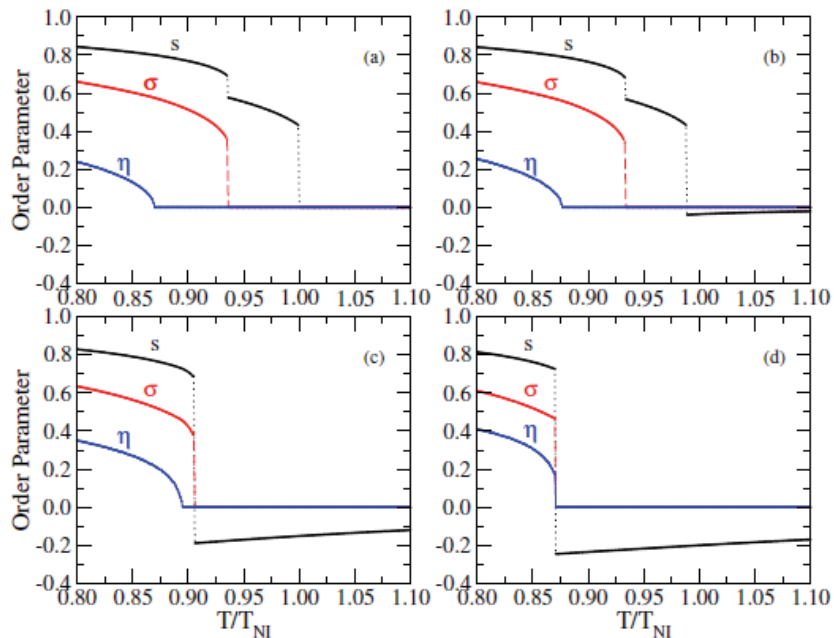


Figura y1: Variação dos parâmetros de ordem  $s$ , de estratificação em camadas  $\sigma$ , e biaxial  $\eta$  como função da temperatura reduzida, para diferentes valores do campo elétrico aplicado: (a)  $E = 0$  kV/cm, (b)  $E = 4$  kV/cm, (c)  $E = 12$  kV/cm, e (d)  $E = 16$  kV/cm. Aqui, foi analisado um sistema líquido cristalino com polarizabilidade elétrica negativa.

Os resultados acima podem ser resumidos no diagrama de fases para a teoria de campo médio molecular, usando o conjunto de parâmetros do composto DOBHOP como padrão. Como é possível notar, o campo elétrico externo afeta drasticamente a sequência de fases originalmente observadas para o modelo a campo nulo. Em particular, vemos que a temperatura de transição esmética-C-esmética-A apresenta um comportamento não monotônico quando o campo elétrico é



aplicado. Embora a fase esmética-C seja favorecida para campos baixos, há uma redução significativa no intervalo de temperaturas em que esta fase esmética-C é estável (Fig. y2).

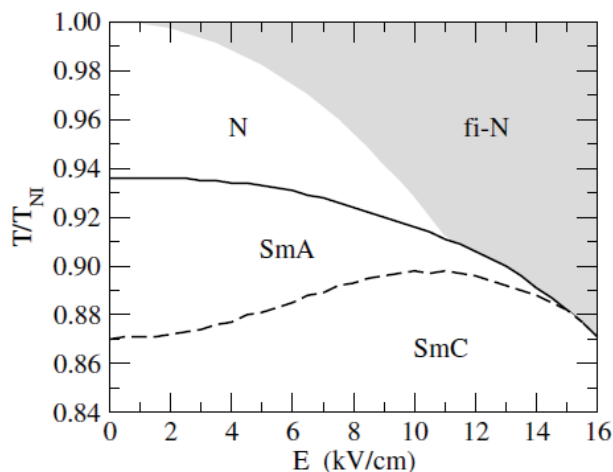


Figura y2: Diagrama de fases da temperatura reduzida em função do campo elétrico aplicado, para compostos anisotropia na polarizabilidade negativa. Para campos baixos é possível notar uma transição de fase esmética-C–esmética-A de segunda ordem. À medida que o campo aplicado aumenta, a fase esmética-A é suprimida. Além disso, introduzimos uma linha de transição entre as fases nemática convencional e nemática reorientada.

### z) Síntese de pontos quânticos de carbono com alta eficiência para geração de oxigênio reativo

A contaminação da água com eluentes industriais contendo azocorantes tem sido uma preocupação constante da comunidade científica, uma vez que estes compostos orgânicos representam um risco à saúde humana e animal por suas características genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Em particular, os azocorantes são amplamente utilizados como pigmentos em diversas aplicações devido à sua grande estabilidade. Como consequência, vários esforços têm sido feitos para desenvolver estratégias que reduzam o impacto ambiental destes materiais, com ênfase no menor custo e no reaproveitamento dos materiais usados. Recentemente, vários trabalhos têm mostrado que é possível produzir nanomateriais por meio do processo de síntese hidrotérmica usando biomassa como material precursor.

Em linhas gerais, pontos quânticos de carbono são nanopartículas fluorescentes que exibem um formato quase esférico, com um diâmetro médio inferior a 10 nm. Do ponto de vista morfológico, essas nanopartículas possuem um núcleo grafítico, recoberto por uma casca amorfa. A superfície dos pontos quânticos de carbono é constituída por grupos funcionais e fragmentos moleculares remanescentes do precursor usado na síntese. A presença de grupos carboxílicos e aminas na superfície dos pontos quânticos de carbono faz com que eles apresentem uma excelente solubilidade e baixa toxicidade. Além disso, estes nanomateriais tendem a exibir uma

fluorescência num amplo intervalo de comprimentos de onda, que pode se estender por todo espectro visível. Uma característica marcante é que estas nanopartículas apresentam uma fluorescência dependente. Uma vez caracterizadas as propriedades fotoluminescentes das nanopartículas, foi realizada a investigação da geração de oxigênio reativo por parte das nanopartículas sob fotoexcitação. Mais especificamente será usado o composto 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF) como sonda de oxigênio singleto. Este composto apresenta uma banda de absorção característica, centrada em 415 nm, que é usada para identificar a decomposição deste composto ao reagir com o oxigênio singleto gerado por fotosensibilizadores. Um dos objetivos do projeto foi exatamente identificar pontos quânticos de carbono capazes de gerar oxigênio singleto de maneira eficiente, permitindo a utilização destes nanomateriais como agentes antimicrobianos. Para isso, foi realizada a síntese pontos quânticos de carbono. Nossos resultados mostram que os pontos quânticos de carbono sintetizados a partir do vermelho de metila geram nanopartículas com a emissão dependente da excitação. Além disso, medidas de excitação na região do verde revelaram uma emissão na região do vermelho, o que pode favorecer a aplicação destes materiais em imageamento e tratamento de doenças (Fig. z1).

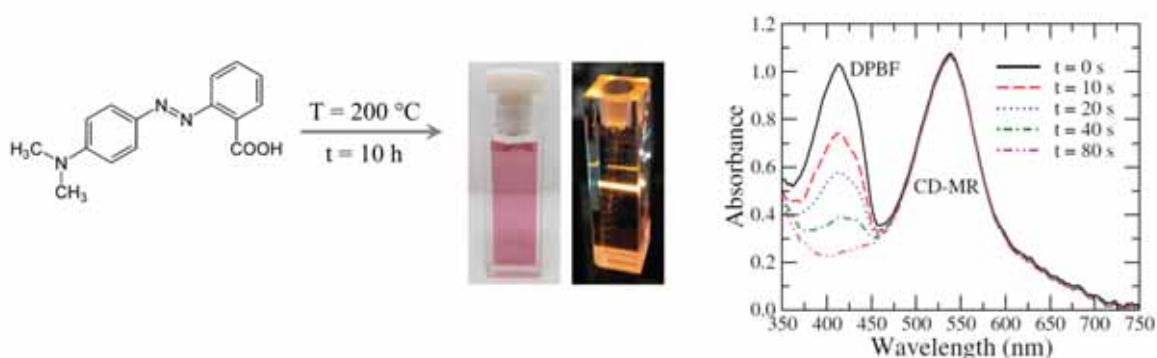


Figura z1: (a) Diagrama de sínteses das nanopartículas de carbono. (b) Caracterização das nanopartículas usando vermelho de metila como precursor, (c) Medida de degradação do DPBF. Aqui vemos uma redução sistemática do pico do DPBF.

### aa) Efeitos de curvatura e campo externo sobre a formação de defeitos topológicos em cristais líquidos confinados em cascas nanoscópicas

Outro problema investigado pelos docentes que compõem o núcleo de pesquisadores da UFAL, diz respeito à formação de defeitos topológicos em cascas na fase nemática. Neste trabalho, estudamos a formação de defeitos topológicos em cascas nemáticas do tipo haltere, usando simulações de Dinâmica Molecular. A geometria do haltere é caracterizada pela presença de regiões com curvaturas positivas e negativas, correspondendo a regiões esféricas conectadas por um hiperbolóide central. Considerando cascas nemáticas com condições de ancoragem planar degeneradas, o número de valência, a carga e as posições dos defeitos topológicos foram

investigados, analisando os efeitos associados a um campo elétrico externo. Para temperaturas onde a fase nemática está bem estabelecida, nossos resultados revelaram que as moléculas de cristal líquido exibem um alinhamento azimutal na ausência de um campo externo, com um par de defeitos de  $+1/2$  em cada polo esférico. Este comportamento contrasta com relatos anteriores para cascas nemáticas com forma anisotrópica, tais como geometrias esféricilíndricas e elipsoidais prolatas, onde o alinhamento molecular é ao longo dos meridianos (Fig. aa1).

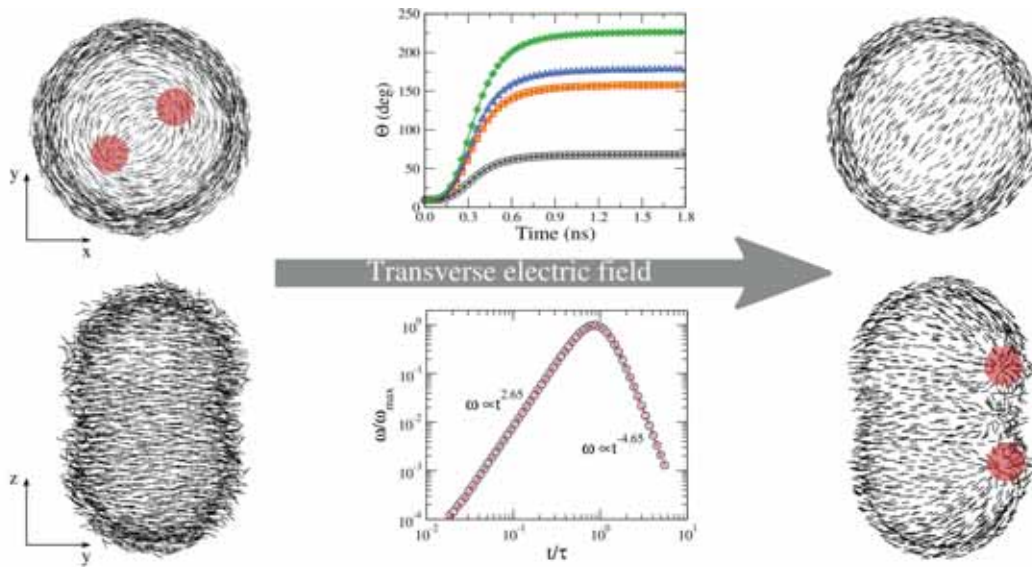


Figura aa1: Projeções dos planos XY and YZ para a configuração de equilíbrio do alinhamento molecular nas cascas nemáticas em formato de haltere. Foram considerados diferentes valores para o campo elétrico transversal aplicado: (painel esquerdo)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 0.0$  e (painel direito)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 4.0$ . Os painéis centrais mostram a evolução temporal da separação angular e da velocidade angular dos defeitos quando o campo elétrico é aplicado ( $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 4.0$ ).

Quando um campo elétrico transversal é aplicado, verificamos que a configuração tipo vórtice é substituída por um alinhamento molecular ao longo da direção do campo. Os defeitos topológicos  $+1/2$  são empurrados para a borda entre as regiões com curvaturas positivas e negativas. A partir da evolução temporal da ordem orientacional, observou-se que a separação angular dos defeitos topológicos aumenta monotonamente até atingir o valor estacionário, com a velocidade angular e a separação angular assintótica exibindo uma dependência pronunciada com a intensidade do campo aplicado. O rearranjo dos defeitos obedece a uma dinâmica não linear, com uma escala de tempo característica independente do campo, mas que delimita os regimes de evolução de curto e longo tempo. No regime de campos transversais fortes, os defeitos topológicos  $+1/2$  tendem a evitar a região com curvatura gaussiana negativa, se situando na linha circular que delimita a região com curvatura gaussiana positiva e negativa (Fig. aa2).

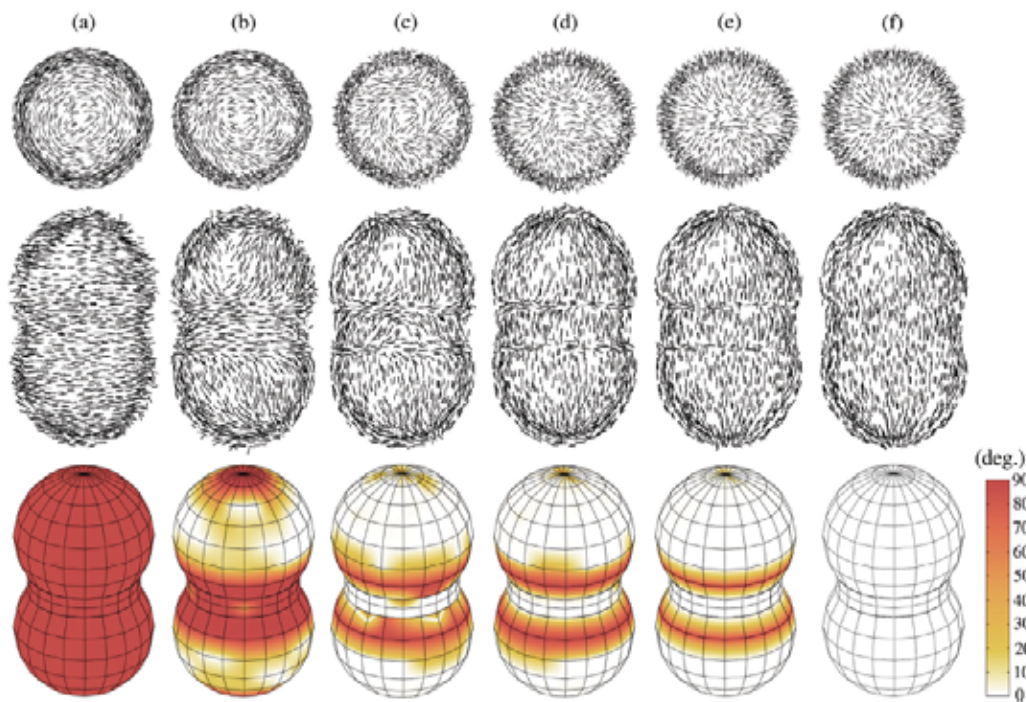


Figura aa2: Projeções dos planos XY and YZ para a configuração de equilíbrio do alinhamento molécula nas cascas nemáticas em formato de haltere. Foram considerados diferentes valores para o campo elétrico longitudinal aplicado: (a)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 0.0$ , (b)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 0.5$ , (c)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 1.0$ , (d)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 2.0$ , (e)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 4.0$ , e (f)  $\Delta\alpha E^2/\epsilon_{iso} = 8.0$ . Os painéis inferiores mostram o gráfico de densidade do ângulo relativo médio entre o vetor diretor local e os meridianos.

Com relação aos efeitos associados a um campo externo longitudinal, nossas simulações mostraram que linhas de declinação e alguns pares de defeitos  $1/2$  podem surgir nas regiões com curvatura positiva, pois as moléculas de cristal líquido na região hiperbólica são reorientadas pelo campo externo. Considerando o estado atual dos experimentos, esperamos que o presente trabalho estimule esforços futuros no controle de centros de valência em conchas nemáticas anisotrópicas usando um campo externo. Embora a realização de conchas tipo haltere seja uma tarefa desafiadora, o encapsulamento de nanopartículas de haltere em gotículas nemáticas pode ser um procedimento viável para investigar conchas de cristal líquido com curvatura negativa.

A seguir, os resultados obtidos pelos doutores Paulo Ricardo Garcia Fernandes, Breno Ferraz de Oliveira e Hatsumi Mukai, seus colaboradores e equipe.

### bb) Indução de birrefringência por luz pulsada na fase isotrópica da mistura KL-DeOH-água

Foi estudada a ordem induzida ocorre em amostras com concentrações molares  $C = \frac{[KL]}{DeOH}$  entre 2.61 e 2.63 quando estabilizadas em temperaturas entre 36.0°C e 48.0°C.

As frequências de ressonância foram obtidas por meio da Transformada Discreta de Fourier (TDF) aplicada à média aritmética simples de 10 medidas independentes da Transmitância Ótica,  $\langle TO \rangle$ , da amostra em função da temperatura. As medidas foram realizadas entre 24°C e 35°C. A Figura bb1 (a) ilustra o comportamento da  $\langle TO \rangle$  em função da temperatura. A Figura bb1(b) corresponde à TDF da amostra isotrópica com 26,61m% de KL; 6,76m% de DeOH e 66,63m% de água em função da temperatura. Observamos um pico de  $|F(\omega)|$  em torno de 28 Hz independentemente da temperatura. A origem dessa frequência detectada por meio da TDF está sendo associada às frequências de ressonância de Schumann na região de Maringá.

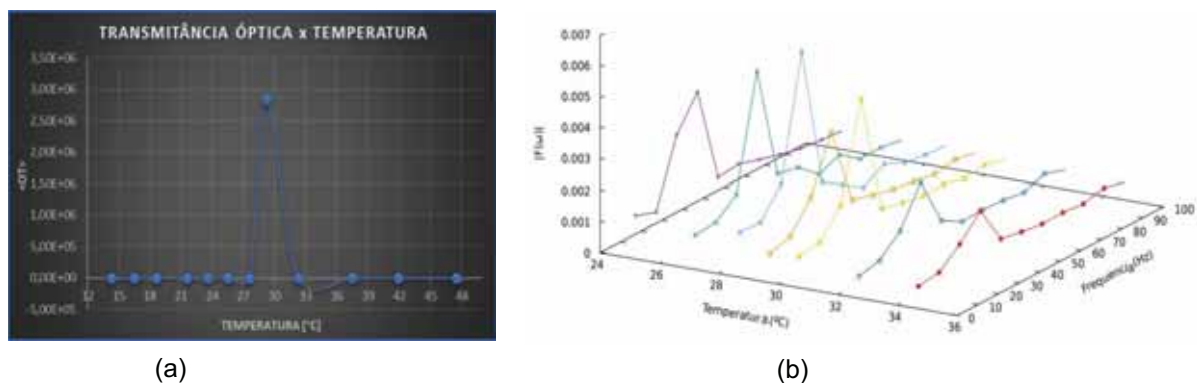


Figura bb1: (a) valor médio da transmitância óptica  $\langle OT \rangle$  em função da temperatura  $T(^{\circ}C)$  da amostra com 26,61m% de KL; 6,76m% de DeOH; 66,63m% de água; (b) Transformada Discreta de Fourier (TDF) da  $\langle OT \rangle$  em função da temperatura  $T(^{\circ}C)$  e frequência  $f(Hz)$ .

Os pesquisadores envolvidos nestas pesquisas são os doutores Rozane F. Truchiello e Sergio L Gómez, suas equipes e colaboradores (cc – ee).

### cc) Estudo da refração óptica nonlinear de nanopartículas de ouro recobertas com PVP por meio da automodulação espacial de fase

Nesse estudo nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich foram recobertas com PVP e a resposta óptica não-linear de origem térmica foi estudada por meio da técnica denominada automodulação espacial de fase. A técnica permite obter o módulo do denominado índice de refração não-linear  $n_2$  de uma forma simples e direta. Os resultados mostram boa concordância dos valores com os obtidos por meio da técnica denominada Z-scan. Também foi vista uma correlação entre o valor de  $n_2$  e a concentração de nanopartículas (Fig. cc1).



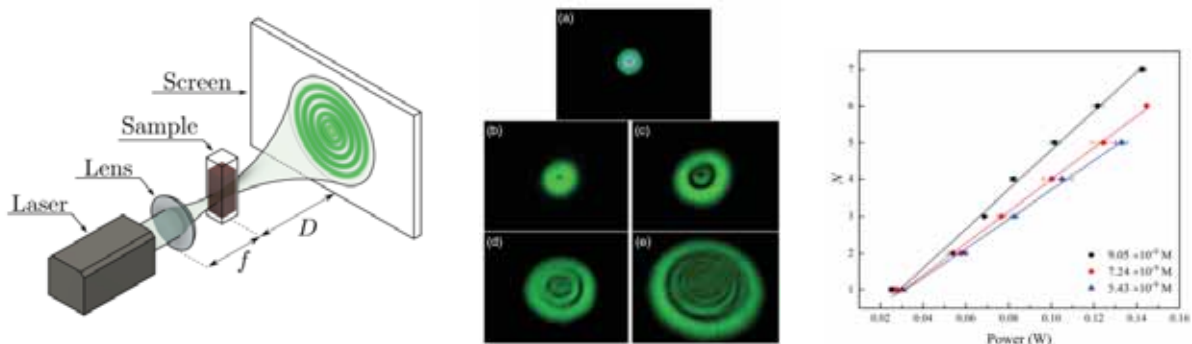


Figura cc1: Esquerda - Arranjo experimental da automodulação espacial de fase. Centro: imagens dos anéis observados para diferentes potências incidentes. Direita: número de anéis em função da potência para diferentes concentrações.

#### dd) Síntese de nanopartículas metálicas (Au e Ag) por meio da luz de LEDs na região do visível e do uv

Nesta linha de pesquisa avaliamos a síntese de nanopartículas de ouro e prata mediante a utilização da luz de lâmpadas LEDs com comprimentos de onda no visível (azul, verde e vermelho) e no uv, todas com potências de 50W. A fotoredução é conhecida, mas pode ser efetuada num número muito grande de condições, sendo que não todas foram exploradas. No nosso caso utilizamos um sistema de baixo custo, utilizando LEDs comerciais, citrato com redutor e polivinil pirrolidona (PVP) como estabilizante. A avaliação é em relação ao tamanho e formato das nanopartículas e a estabilidade do coloide. No caso das nanopartículas de ouro, a luz visível é efetiva na fotoredução dos íons de ouro, embora a efetividade diminua em função do aumento do comprimento de onda. Os resultados mostram que as espécies reativas necessárias são produzidas na interação do citrato com os fótons. Com relação à prata, a luz visível se mostra menos efetivas. Em relação à estabilidade, as soluções permaneceram estáveis, sem a formação de depósitos visíveis nem de pequenos agregados, como evidenciado pela técnica de espectroscopia uv-vis, por vários meses.

#### ee) Estudo por meio da constringencia da transição de fase brine-halite num eletrólito formado por sal e água

O índice de refração de uma solução pode ser usado para determinar sua composição. No caso de uma solução aquosa de sal, sua composição pode ser ajustada para coincidir com o índice reativo de instrumentos ópticos. Neste trabalho, é apresentado um estudo do índice de refração e o poder dispersivo de uma solução aquosa de NaCl em uma ampla faixa de concentração e temperatura, obtendo-se o número de Abbe ou constringência da amostra que é uma medida aproximada de sua dispersão cromática. O índice de refração mostra uma dependência linear tanto da concentração quanto da temperatura nas faixas medidas. Também, a constringência exibe um comportamento distinto na região próxima à transição de fase entre uma salmoura pura e a fase contendo salmoura+halita. A variação deste parâmetro como uma função de concentração

apresentou um caráter bimodal classificado como exponencial e linear. A parte exponencial, em baixas concentrações, permaneceu constante com a variação de concentração e temperatura, embora a parte linear, em altas concentrações, aumenta a taxa de variação em função da temperatura. Simulação de dinâmica molecular a 35 °C indicam a existência de formação de halita abaixo da saturação conhecida curva. A medida da constringência por refratometria mostrou-se sensível à alterações na nucleação e crescimento de cristais de NaCl em salmoura. As simulações concordam com as medições experimentais indicam o crescimento do cristal na região insaturada (Fig. ee1).

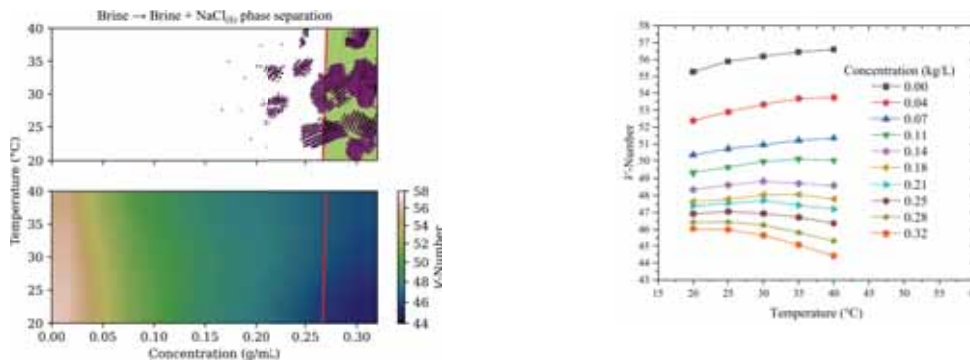


Figura ee1: Esquerda: A metade superior Representação do digrama de fase representa a estrutura do eletrólito, onde a linha vermelha representa a separação de fase suposta até agora. A metade inferior mostra a constringência em termos da composição. Direita: Constringência em termos da composição e temperatura

O Dr. Jean-Jacques Bonvent, sua equipe e colaboradores são os responsáveis por estas pesquisas (ff – gg).

#### ff) Sínteses por rota sonoquímica de magnetita e ferritas de manganês para hipertermia

Foram propostas sínteses por rota sonoquímica de nanopartículas magnéticas, visando uma otimização da perda específica de potência (SLP), para aplicações em hipertermia. A varredura dos parâmetros da síntese sonoquímica, como a concentração de base e de sal, permitiu a obtenção de núcleos magnéticos com diferentes perfis morfológicos e um controle maior da dispersão de tamanho com a diminuição da concentração do precursor. Além do mais, os núcleos magnéticos podem ser modificados pela adição de manganês na rede cristalina (formação de ferrita de manganês) o que reforça seu potencial de uso na área de hipertermia.

A figura ff1 mostra imagens de TEM das quatro amostras sintetizadas, por método sonoquímico, variando a concentração do precursor FeSO<sub>4</sub>. Observa-se que o tamanho das nanopartículas diminui com a diminuição da concentração do precursor, passando de 58 ± 8 nm, com 43,1 mM (M1) para 20 ± 3 nm, com 5 mM (M4).



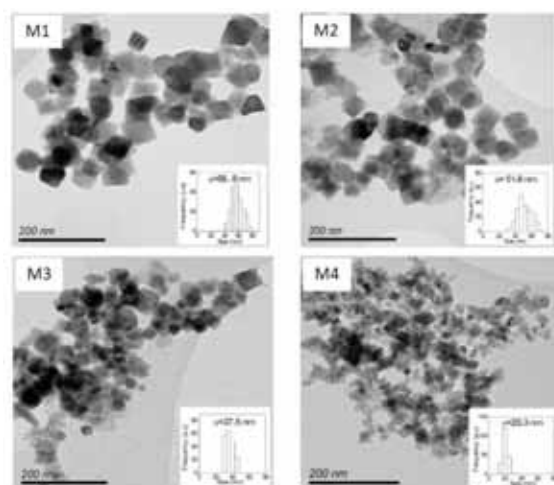


Figura ff1: Imagens por TEM de nanopartículas de magnetita pelo método sonoquímico: para M1 (43,1 mM), M2 (21,7 mM), c) M3 (10 mM) e d) M4 (5 mM) de FeSO<sub>4</sub>.

A amostra M4 foi escolhida para avaliar o efeito da alteração da síntese pela adição do precursor MnSO<sub>4</sub>. A figura ff2 mostra a morfologia das nanopartículas por TEM, com diferentes proporções de FeSO<sub>4</sub>/MnSO<sub>4</sub> (porcentagem da concentração total de 5 mM). O menor tamanho de NPs foi obtida para a amostra FMn3 (FeSO<sub>4</sub>/MnSO<sub>4</sub> 2:1), 10 ± 4 nm.

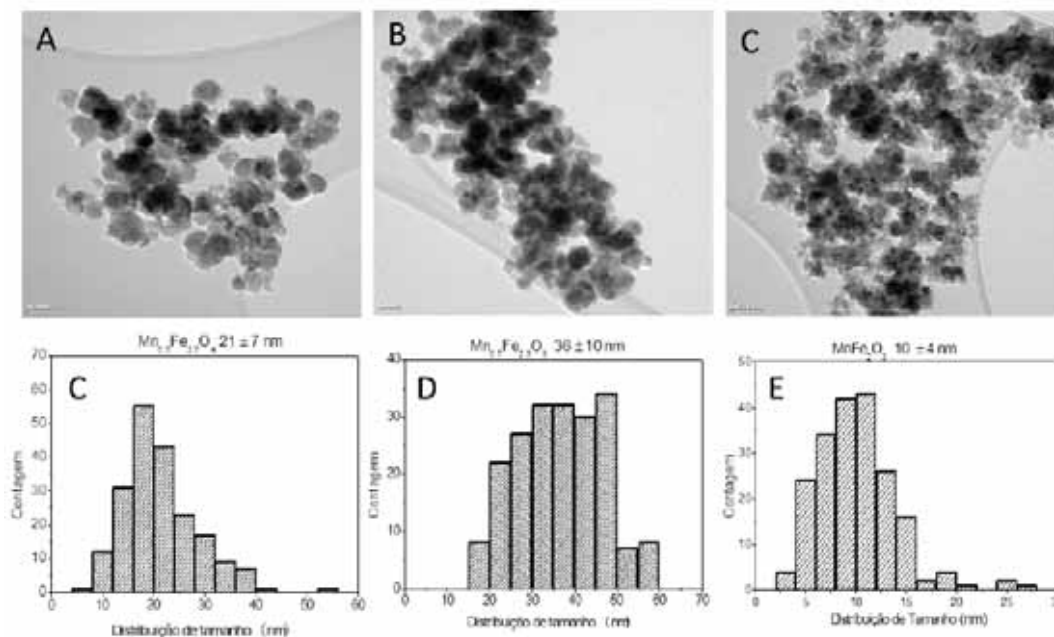


Figura ff2: Micrografia por TEM (escala da barra medida em cada imagem: 50 nm) de Mn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> sintetizadas em diferentes proporções de sais à base de ferro e manganês. Em **A)** FMn1 (x= 0,3), **B)** FMn2 (x = 0,7) e em **C)** FMn3 (x = 1). Em **D)**, **E)** e **F)** mostram a distribuição de tamanhos de cada amostra.

Na figura ff3 são apresentadas curvas de histerese magnética das nanopartículas magnéticas, com a dopagem de manganês na rede. A inserção do Mn diminui a magnetização de saturação, passando de 69 emu/g (na ausência de Mn) para 62 emu/g para as amostras FMn2 e FMn3. O campo coercitivo ( $H_c$ ) das ferritas também diminui com a adição de manganês na rede.  $H_c$  passa de 91 Oe no caso de FMn1 para 51 Oe para FMn3. Esta diminuição do valor de  $H_c$  é consistente com a tendência de presença de monodomínio nas nanopartículas de ferritas de manganês, consideradas superparamagnéticas, com campo coercitivo nulo.

A variação da perda específica de potência (SLP) das NPs magnéticas em função da inserção de Mn na rede cristalina, é mostrada na figura ff3C. O maior valor ( $451 \pm 13$  W/g) é obtido para amostra FMn3, com maior dopagem de Mn, que corresponde quase o dobro em comparação com a magnetita pura.

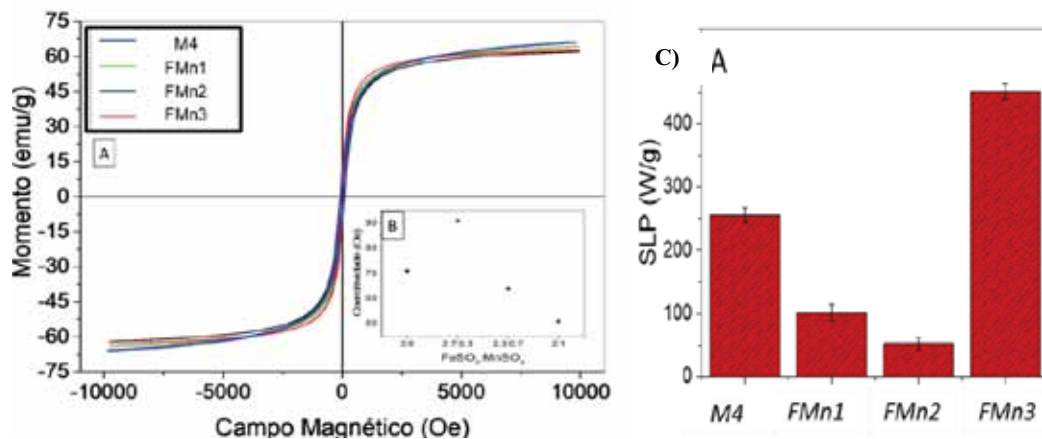


Figura ff3: A) MxH das nanopartículas sintetizadas pelo método sonoquímico, (B) variação do campo coercitivo ( $H_c$ ); C) SLP das nanopartículas magnéticas em função da adição de íons Mn.

### gg) Núcleos magnéticos recobertos por sílica mesoporosa via sínteses sonoquímica e agitação mecânica. Abordagens estratégicas para aplicação como carreadores de drogas e drug target delivery

Trata-se de um sistema de liberação core@shell magnético a base de NPs magnéticas e sílica mesoporosa (MNP@mSiO<sub>2</sub>), acionado por pH, obtido por uma síntese rápida assistida por ultrassom. A caracterização realizada mostra núcleos magnéticos de Fe<sub>2.9</sub>Mn<sub>0.104</sub> ( $38 \pm 6$  nm), com valores de energia de perda específica adequados para hipertermia (463 W/g), recobertas por uma camada de sílica mesoporosa ( $10 \pm 2$  nm) com grande área de superfície ( $269 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) funcionalizada com grupos hidroxílicos (-OH). Os sistemas MNP@mSiO<sub>2</sub> carregados com a doxorrubicina (DOX) permitem que a liberação seja chaveada em ambientes com pH ácidos. A cinética de liberação do fármaco em pH 5.5, 6.6 e 7.4 foi determinada mediante o modelo de gompertz, onde a única variável fortemente dependente do pH é a porcentagem de DOX liberada. A porcentagem de DOX liberada foi ~20% em pH 6,6 ou 7,4, enquanto até 80 wt% é liberado em

pH 5.5. Os ensaios biológicos destacam o efeito hemolítico não significativo e citocompatibilidade do sistema nanoestruturado  $MNP@mSiO_2$ , apontando o uso potencial deste sistema como um sistema de entrega de drogas guiado por campo magnético com liberação controlada por pH. A figura gg1 mostra um esquema da estratégia adotada para obtenção do sistema.

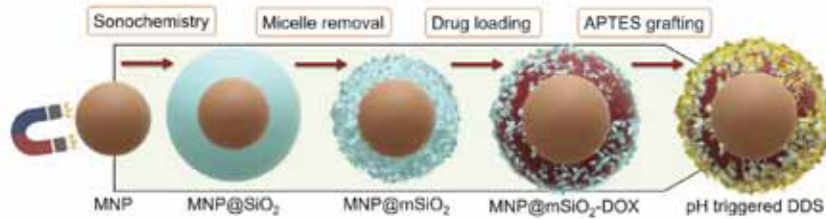


Figura gg1: Estratégia sintética para a fabricação de DDS.

Usando métodos de sonoquímica, as nanopartículas magnéticas (MNP) obtidas foram, em seguida, revestidas com sílica ( $MNP@SiO_2$ ) e micelas catiônicas. A remoção das micelas foi assistida por ultrassom a fim de obter uma camada de sílica mesoporosa ( $MNP@mSiO_2$ ), que foi carregada com o fármaco doxorrubicina (DX); a superfície das NPs foi então funcionalizada com APTES, a fim de permitir o chaveamento da liberação pelo pH do meio (Fig. gg2, gg3, gg4, gg5).

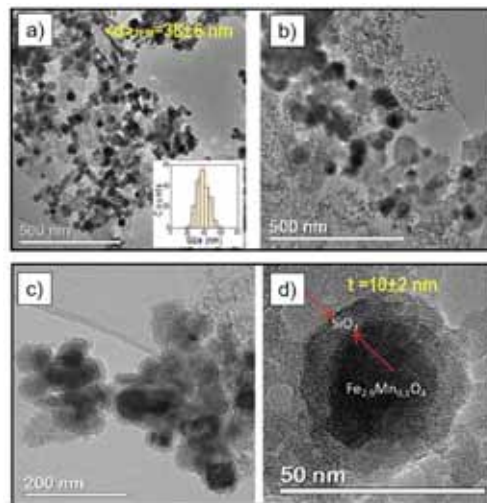


Figura gg2: Imagens de TEM mostrando a morfologia dos núcleos magnéticos e o recobrimento pela sílica mesoporosa ( $MNP@mSiO_2$ ).

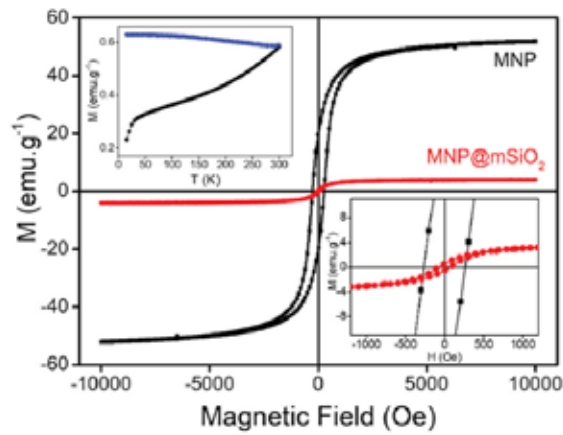


Figura gg3: Curvas de histerese M vs H dos núcleos magnéticos (MNP) e das nanopartículas revestidas de sílica (MNP@mSiO<sub>2</sub>). Visão ampliada das regiões de campo. Curvas de ZFC/FC para as NPs MNP@mSiO<sub>2</sub>.

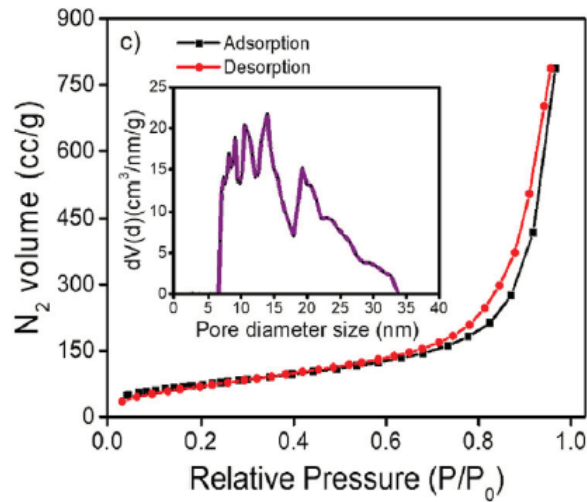


Figura gg4. Análise BET (adsorção/dessorção) das isotermas e distribuição do diâmetro dos poros calculado pelo método NLDFT.

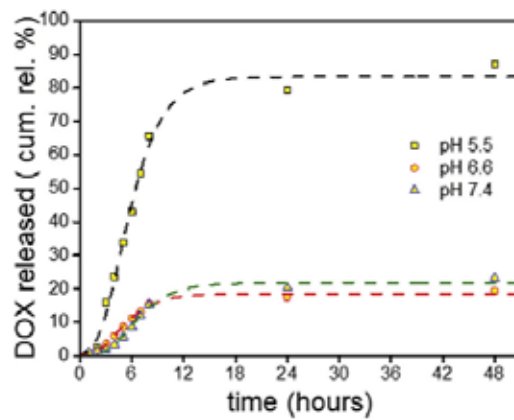


Figura gg5: Curvas de liberação da DOX cumulativa das NPs MNP@mSiO<sub>2</sub>-DOX em pH 7,4, 6,6 e 5,5. As linhas pontilhadas correspondem aos melhores ajustes obtidos usando o modelo Gompertz.

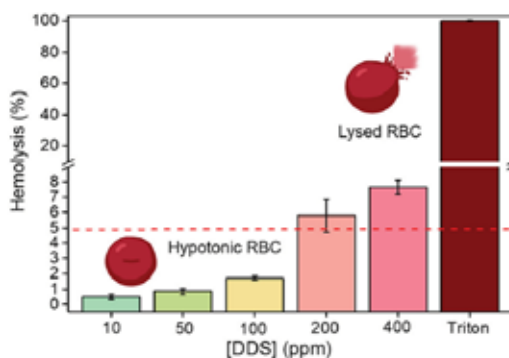


Figura gg6: Análise dos efeitos hemolíticos de diferentes concentrações de MNP@mSiO<sub>2</sub> nanopartículas incubadas com glóbulos vermelhos por 3h.

Danos não significativos aos glóbulos vermelhos foram evidenciados até a concentração de 100 ppm. Possivelmente, em concentrações relativamente altas, a deposição de agregados na superfície da RBC pode causar danos à membrana e liberação adicional de hemoglobina citoplasmática.

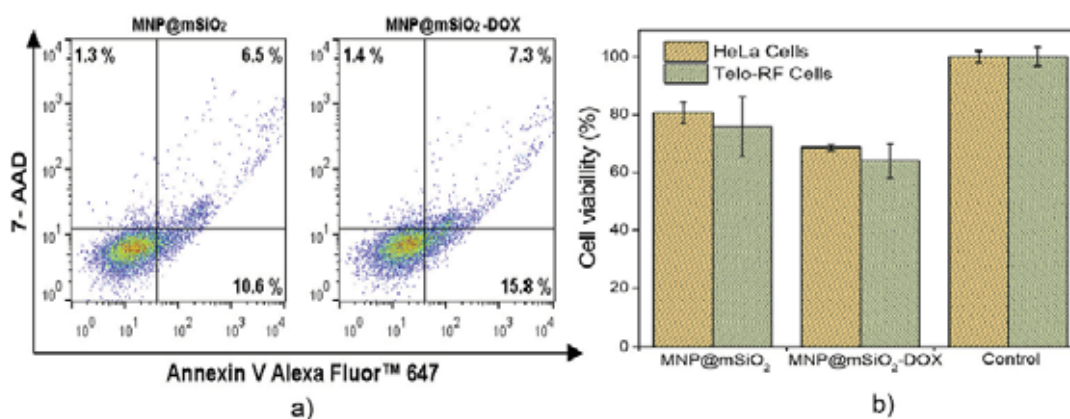


Figura gg7: Avaliação biológica. a) determinação de células HeLa vivas, apoptóticas e necróticas expostas às nanopartículas. b) Viabilidade das células Telo-RF e HeLa em contato com MNP@mSiO<sub>2</sub> e MNP@mSiO<sub>2</sub>-DOX a 100 ppm por 24 h.

A porcentagem de células apoptóticas aumenta para MNP@mSiO<sub>2</sub>-DOX em comparação com MNP@mSiO<sub>2</sub>, confirmando assim Dano do DOX através de um processo apoptótico. Assim, o fármaco DOX carregado nas nanopartículas pode ter a sua liberação estimulada pela acidez tumoral. O sistema híbrido nanoestruturado desenvolvido pode ser potencialmente conduzido através de um sítio específico a ser tratado, pela aplicação de um campo magnético, a fim de obter uma liberação acionada do fármaco pelo pH ácido, como nos tecidos tumorais, minimizando os

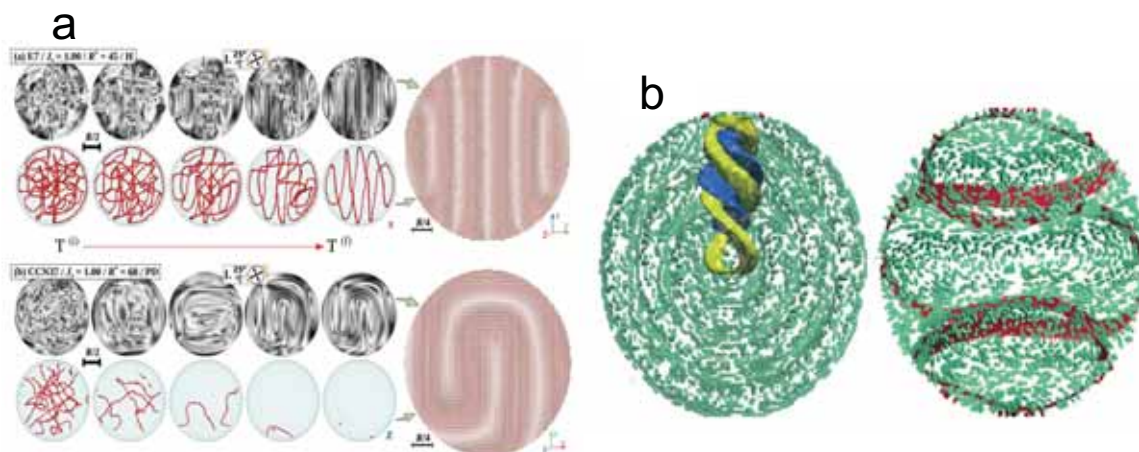
efeitos colaterais indesejados em torno de tecidos saudáveis. Além disso, o processo pode ser conduzido pela exposição dos locais tumorais a temperaturas mais altas do que a temperatura corporal normal através de hipertermia magnética, auxiliando assim a morte celular danificada por apoptose (Figs. gg6, gg7).

Os Drs. Rafael Zola, Luiz Roberto Evangelista, colaboradores e equipes, são os responsáveis por estes resultados.

### hh) Caracterização e modelagem de fluídos complexos

Nesta fase do projeto, prosseguimos com o estudo de fluidos complexos limitados, incluindo o efeito de geometrias distintas, interação com superfícies limitantes, fenômenos difusivos e caracterizações em geral. Demos continuidades aos estudos computacionais da formação de padrões em cristais líquidos nemáticos e nemáticos quirais em geometrias esféricas, focando em “quenches” térmicos e “coarsening” de defeitos, além do estudo de defeitos estáveis. Com o método de Monte-Carlo, demonstramos a possibilidade de estabilização de defeitos e as rotas de “coarsening” para diversas configurações diferentes (planar e homeotrópica), (figura hh1-a). Também demos continuidade à formulação de um código aberto capaz de simular cristais líquidos em várias geometrias, que fosse versátil com relação ao uso de parâmetros, condições iniciais, integradores e geração de resultados. Marlics foi escrito em C++ na formulação de Landau—de Gennes e conta com várias ferramentas para uso na simulação de displays e outras geometrias de interesse, além de integradores com dinâmica temporal ou para busca de estados estáveis. A figura hh1-b mostra dois exemplos de nemáticos quirais em configurações diferentes (planar e homeotrópica) de alta quiralidade, encontradas pelo ‘software’ Marlics. Ainda relacionado a cristais líquidos, estudamos a estabilidade de defeitos em “slabs” nemáticos com ancoramento planar periódico, ou seja, onde o eixo-fácil azimuthal oscila periodicamente nas superfícies. Em um artigo experimental, foi constatado que, nessa configuração, linhas de defeito são estabilizadas, mas a estrutura e o mecanismo de organização molecular não foram elucidados. Agora, por simulações computacionais no grupo, conseguimos estudar as configurações de equilíbrio e determinar os períodos, espessuras e “pretilts” responsáveis pela estrutura de defeitos estabilizados. Demos sequências também aos estudos aplicando técnicas de “Machine Learning” para identificação de texturas experimentais de cristais líquidos. Utilizando uma nova técnica de entropia de permutação e redes ordinais, combinada ao aprendizado de máquina, estudamos várias amostras nemáticas, nemáticas quirais e esmélicas, bem como suas transições de fase. Mostramos que a técnica consegue identificar transições de primeira e segunda ordem, determinar a temperatura de uma dada amostra apenas com a imagem, e o passo de uma amostra colestérica através da imagem, facilitando consideravelmente a análise, visto que a determinação do passo em geral envolve técnicas experimentais relativamente complicadas.





Figur hh1: a) Quench térmico de duas gotas nemáticas quirais, mostrando o complicado arranjo de defeitos estabilizados. Na imagem superior, uma gota com ancoramento homeotrópico, enquanto que na inferior, uma gota planar. b) Imagens produzidas pelo software Marlics para gota planar (esquerda) e homeotrópica (direita) com alta quiralidade.

Estudamos um sistema heterogêneo em contato com uma superfície que adsorve/dessorve partículas do meio. Mostramos que tanto os parâmetros de superfície como os da morfologia do meio alteram como a difusão ocorre, o que é importante especialmente para processos de separação. Em um trabalho subsequente, resolvemos analiticamente as equações fundamentais e confrontamos os resultados com simulações computacionais relevantes para a descrição da dinâmica difusiva de um sistema em 3D em contato com superfícies que podem adsorver as partículas e, ao mesmo tempo, que permitem que ocorra a difusão superficial dessas mesmas partículas. Essa categoria de modelo é mais fidedigna para o uso em situações experimentais do que a dos tradicionais modelos 1D. Mostramos o comportamento difusivo anômalo que ocorre tanto na difusão de volume quanto na difusão superficial e mostramos situações relacionadas à catálise heterogênea em que o modelo pode ser aplicado. Por fim, modelamos uma célula eletrolítica na abordagem PNP anômala com aproximação Gouy-Chapman para o eletrodo e confrontamos com resultados experimentais de uma solução aquosa de KCl. Nossos resultados mostram que o espectro de impedância calculado se ajusta melhor aos dados experimentais do que o de circuitos análogos ou o PNP convencional, o que é consequência dos efeitos de difusão anômala presentes no sistema. O modelo também proporcionou a investigação de outros cenários que vão além dos investigados experimentalmente. Em todos esses cenários, a difusão anômala mostrou-se importante para uma descrição mais completa do comportamento dos sistemas, sobretudo no intervalo de baixa frequência, no qual o papel dos íons é, usualmente, de extrema importância.



O Dr. Hubert Stassen, equipe e colaboradores são os responsáveis pelos resultados a seguir (ii – II).

### ii) Mordenitas funcionalizadas para a captura e estocagem de gases

Utilizando cálculos DFT/ONION desenhou-se várias mordenitas funcionalizadas com cátions imidazólicos, conseguiu-se mostrar que a energia de adsorção dos gases CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S tornam-se experimentalmente interessantes para substituições aminas e hidroxilas, respectivamente, nos cátions. Figura ii1.

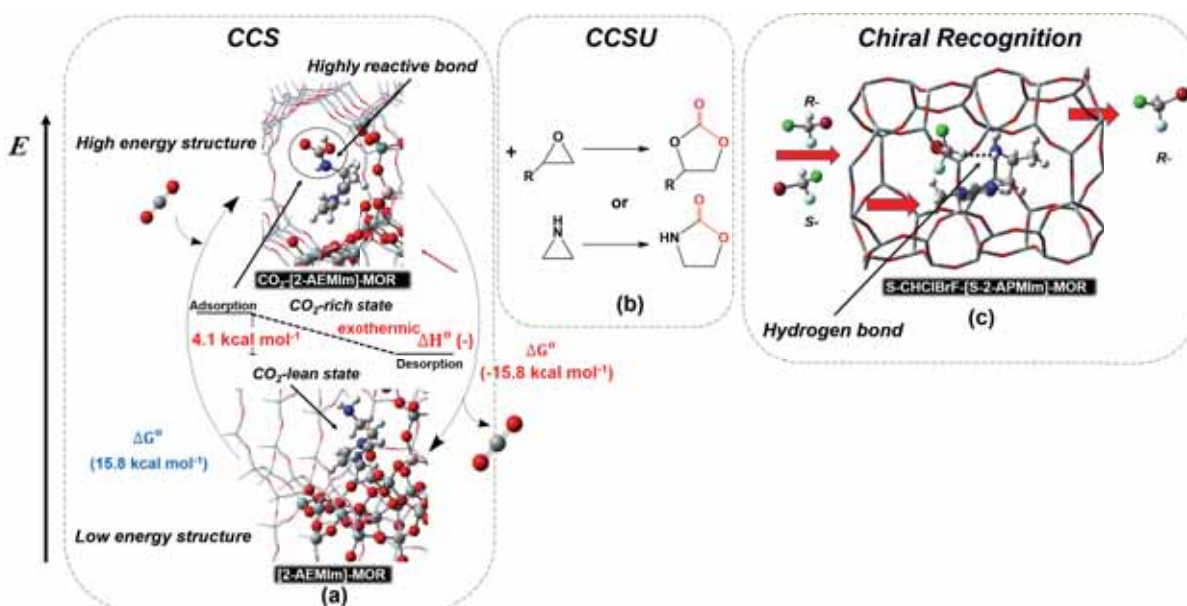


Figura ii1: Mordenitas funcionalizadas.

### jj) Desenho computacional de Ligantes para o Ru(II)

Em uma colaboração experimental/computacional com membros do INCT Catálise, desenhou-se vários ligantes bivalentes envolvendo cátions imidazólicos para reações catalíticas envolvendo o Ru(II). Desenvolveu-se cálculos quânticos dos ligantes com o objetivo de obter a distribuição eletrônica, a geometria otimizada, e a localização de orbitais moleculares de fronteira.

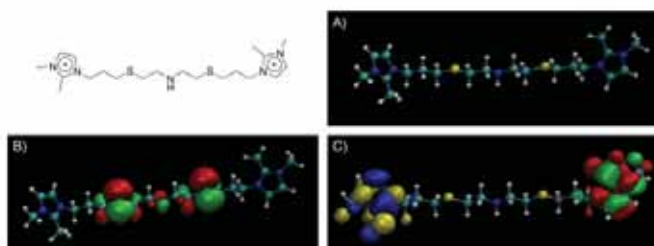


Figura jj1: Ru(II)

### kk) Comportamento associativo de cátions imidazólicos em água

Os 1-alkil-3-metil-imidazóis representam cátions anfifílicos com grupos alquilas prolongados. Com o objetivo de auxiliar nos mecanismos antifúngico e antimicrobiano desses cátions, iniciou-se investigações visando o seu comportamento auto-associativo em água. Corroborou-se que o cátion 1-butil-3-metil-imidazole apresenta solvatação nesse solvente. No outro lado, cátions 1-hexadecil-3-metil-imidazole formam agregados em água. Detalhes desses estudos, bem como cátions contendo grupos alquilas octil e dodecanil, estão em fase avaliação.

Utiliza-se a metodologia da simulação por dinâmica molecular com campo de força desenvolvido por nosso grupo de pesquisa.

### ll) Polipéptidos e proteínas em líquidos iônicos

Visando aplicações em farmácia e biocatálise, começou-se estudos computacionais via simulação por dinâmica molecular de várias proteínas em líquidos iônicos: i) A melitina é um polipéptido com 26 aminoácidos em forma alfa-helical apresentando propriedades antimicrobianas. Utiliza-se misturas de diversas concentrações do líquido iônico acetato do 1-butil-3-metil-imidazole em água para investigar o efeito do líquido iônico na estruturas secundária da melitina. Resultados preliminares demonstram que a melitina não apresenta modificações estruturais na presença do líquido iônico. ii) O príon é uma proteína responsável por várias doenças, tais como vaca louca e Jakob-Kreutzfeld, através de uma conversão estrutural. Estudou-se essa proteína em misturas do acetato de 1-butil-3-metil-imidazole com água em diversas concentrações. Não se observou a conversão estrutural em estudos preliminares. iii) A lipase CALB está sendo utilizada em biocatálise, particularmente na produção de bio-diesel. Observou-se experimentalmente uma atividade excelente dessa lipase em temperaturas elevadas e ambientes contendo líquidos iônicos hidrofóbicos. Iniciou-se estudos de simulação da CALB em líquidos iônicos ‘apolares’ sob temperaturas elevadas para entender detalhes da estabilidade dessa lipase nessas condições extremas.

O Dr. Mário Tamashiro, equipe e colaboradores são os responsáveis pelos resultados a seguir.

### mm) Transições de fase em monocamadas fosfolipídicas

O modelo DLG (*Doniach lattice gas*) representa um modelo estatístico simplificado para descrever transições de fase em monocamadas fosfolipídicas e em filmes de Langmuir de sistemas modelo constituídos de um único tipo de molécula anfifílica. No relatório anterior havíamos apresentado resultados do modelo DLG na aproximação de campo médio obtidos. Em comparação ao diagrama  $k \times l$  (associados a parâmetros do hamiltoniano do modelo DLG) de estados/topologias do modelo apresentado no período anterior, tivemos de introduzir mais duas sub-regiões na Figura mm1, (c1) e (a1c1). Além disso, obtivemos a real fronteira entre as regiões (e0)-(c0) e (f1)-(d1), pois havíamos apresentado apenas a linha tracejada aproximada, obtida

através de modelos de Ising em limites assintóticos. A fronteira (f1)-(f1f0) foi também obtida nesse período. Todos esses resultados numéricos dependeram crucialmente de cálculos analíticos trabalhosos, mas que não iremos apresentar aqui por serem extremamente técnicos e complexos.

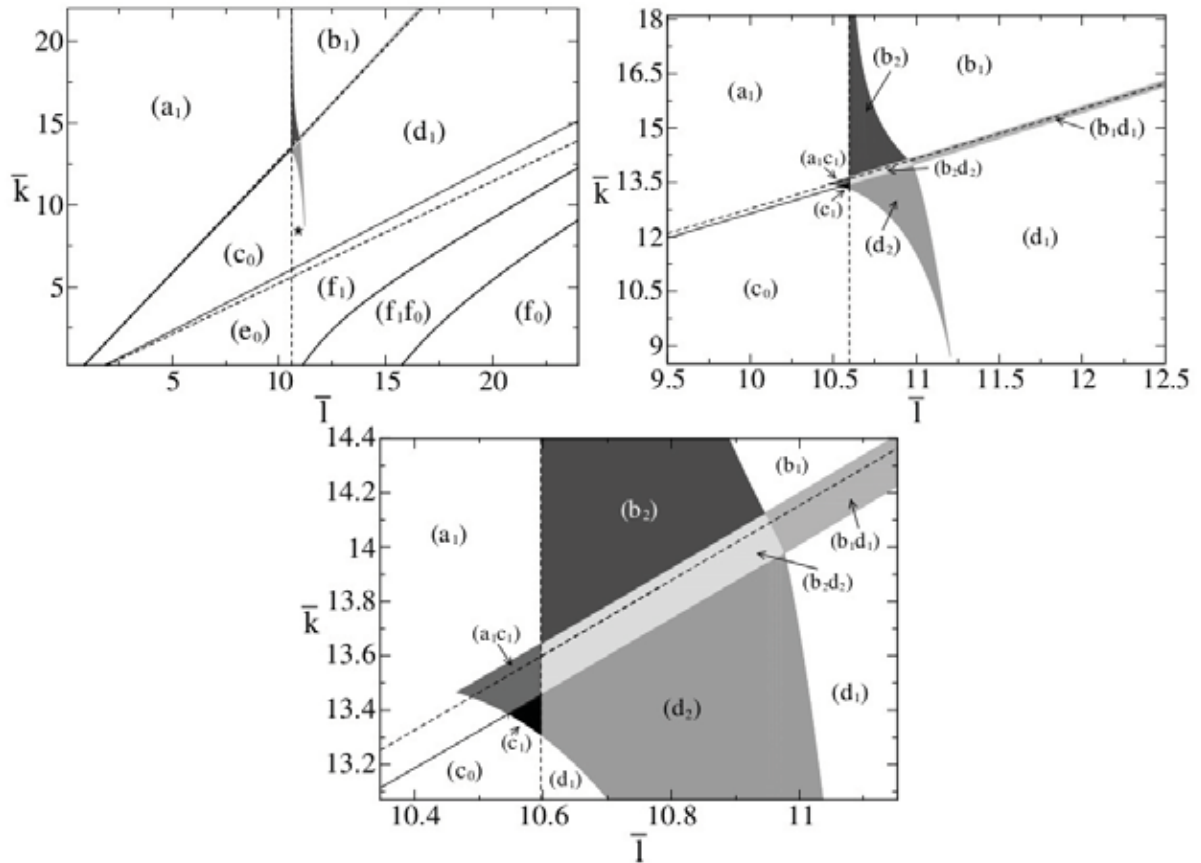


Figura mm1: Reconfiguração do diagrama  $k \times l$  de topologias dos diagramas de fase do modelo DLG na aproximação de campo médio para os parâmetros  $h=0$  e  $w=4 \times 10^4$ . As várias figuras representam ampliações sucessivas do diagrama global  $k \times l$ , no qual se nota que as regiões sombreadas, associadas a essas topologias inéditas dos diagramas de fases, ocupam uma área relativamente pequena do espaço de parâmetros. As linhas tracejadas são obtidas a partir de modelos de Ising assintóticos e as linhas sólidas, bem como as fronteiras das regiões sombreadas, representam as reais fronteiras de cada sub-região. O símbolo (H) indica os parâmetros associados ao ajuste teórico de dados experimentais do DMPC para a pressão lateral de coexistência.

Em comparação com os diagramas de fases típicos apresentados no relatório anterior, que continham também os limites de estabilidade (linhas espinodais) das fases termodinâmicas, decidimos simplificá-los apresentando apenas as transições de fase termodinâmicas (Figura mm2). As linhas tracejadas representam linhas de transições descontínuas (de primeira ordem) entre as fases líquido-expandido (LE), líquido-condensado (LC) e gás (G), além de duas fases líquido-expandido distintas (LE1 e LE2), para alguns casos. As linhas contínuas representam linhas de transições contínuas (de segunda ordem) entre a fase alternada (Stg: *staggered*) e as

outras fases. Para o diagrama típico da região (b1), denotamos a fase líquida apenas por (L), tendo em vista a inexistência de distinção entre as possíveis fases LE (a altas temperaturas) e LC (a baixas temperaturas).

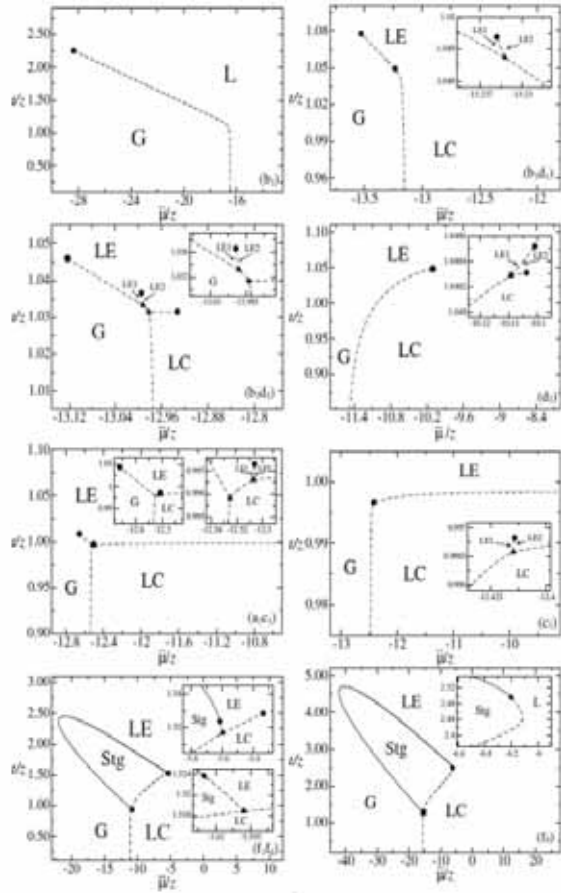


Figura mm2: Diagramas de fases típicos para as topologias inéditas, no plano temperatura adimensional  $t \times$  potencial químico adimensional  $\mu$ , previstos pelo modelo DLG na aproximação de campo médio para os parâmetros  $h=0$  e  $w=4 \times 10^4$ . Os pontos especiais dos diagramas de fases são representados por símbolos sólidos: ponto crítico (l), ponto triplo (s), ponto crítico terminal ( $\square$ ), ponto tricrítico ( $\square$ ).

Para encontrar as linhas adicionais na Figura mm1 que não haviam sido ainda obtidas foram necessários cálculos analíticos não-triviais, em particular:

(1) A linha sólida, fronteira entre as regiões (e0)-(c0) e (f1)-(d1), tornou necessária a obtenção da condição em que os dois pontos críticos terminais ( $\square$ ), associados à transição Stg-LC, colapsam em um único ponto, deixando a fase Stg de existir após ultrapassada essa condição – na verdade, a fase Stg se torna então metaestável, localizada abaixo da linha de transição LE-LC no diagrama  $t \times \mu$ ;

(2) A linha sólida, fronteira entre as regiões (f1)-(f1f0), tornou necessária a obtenção da condição do ponto tricrítico ( $\square$ ) envolvendo a fase alternada Stg.

Investigamos o modelo DLG na aproximação de pares na estrutura hierárquica chamada cacto de Husimi (Figura mm3), cuja geometria subjacente é mais próxima à rede triangular associada à ordem da fase LC observada experimentalmente a baixas temperaturas. No entanto, não obtivemos ainda resultados a serem divulgados. Mantemos também colaboração com a prof. Vera Bohomoletz Henriques, que tem investigado o modelo DLG através de técnicas exatas em uma dimensão, buscando possíveis reminiscências das transições de fase que podem ocorrer em dimensões superiores.

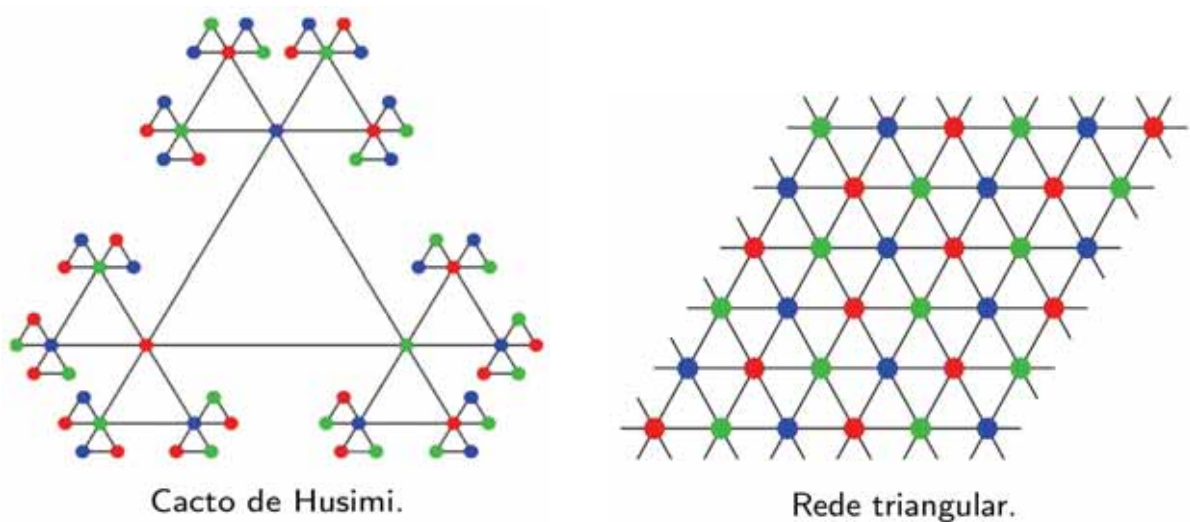


Figura mm3: Cacto de Husimi e rede triangular, ambos de coordenação local  $z=6$ . As redes podem ser subdivididas em três sub-redes interpenetrantes, representadas pelos sítios em cores distintas (vermelho, verde e azul).

### **Sumário dos resultados obtidos**

- a) No último ano foram consolidadas estas interações, permitindo avanços no conhecimento das modificações da qualidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) decorrentes do tratamento do infarto agudo do miocárdio. O infarto agudo do miocárdio é a principal causa de morte em nosso país e apresenta alta taxa de re-hospitalizações, principalmente no primeiro ano. Esta recorrência nos eventos coronários se deve a instabilidade de placas ateromatosas em decorrência de colonização por linfócitos que são mobilizados por várias semanas após o evento agudo. Reduzir o colesterol auxilia na menor recorrência destes eventos, mas em nosso INCT-FCx investigamos se a escolha do hipolipemiante de mesma potência redutora do LDL-colesterol influencia o padrão de subfrações de lipoproteínas.

Por meio de interface entre o projeto infarto agudo do miocárdio da Escola Paulista de Medicina e a Faculdade de Saúde Pública, pudemos examinar as subfrações e descrever as diferenças entre os lipoproteínas. A seguir, por interface entre a área Biológica e Química examinamos por espectroscopia as diferenças entre os tratamentos lipoproteínicos em centenas de lipídios. De forma interessante, importantes diferenças em lisofosfatidil colinas, fosfatidil colinas, triacilgliceróis e particularmente entre ceramidas foram identificadas. As ceramidas são lipídios presentes nas LDLs e tem sido relacionadas como preditoras de morte cardiovascular e diabetes melito.

- b) Outro grande avanço contou com a interface da Física com a área Biológica, mostrando que a escolha do antiplaquetário influencia a qualidade das LDLs, avaliadas por diversas metodologias (SAXS, DLS, Z-Scan, espectroscopia, além de eletroforese).
- c) Finalmente, em outra interface com a área Biológica com a imunologia e Física, pudemos descrever a associação entre a aterosclerose em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar, inflamação, oxidação de LDL, descrevendo papel de interleucinas, subtipos de linfócitos e anticorpos com a gravidade da aterosclerose. Com estes estudos mostramos que a escolha do tratamento do infarto agudo do miocárdio influencia a qualidade das LDLs e estas informações originais, poderão contribuir para menor taxa de complicações das placas ateroscleróticas. Hoje tem sido proposto o acompanhamento da evolução da aterosclerose por métodos de imagem como a angiotomografia, próxima etapa que pretendemos examinar na avaliação da efetividade terapêutica de pacientes de alto risco cardiovascular.
- d) Propusemos um novo nanocompósito feito de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) dispersas em uma matriz de vidro bioativo derivado de sol-gel, que não necessita de nenhum tratamento térmico para cristalização das fases magnéticas. A bioatividade e as caracterizações *in vitro* mostram que tais nanocompósitos apresentam propriedades formadoras de apatita semelhantes ao vidro original altamente bioativo, além de serem osteoindutivos. Esta metodologia é uma nova alternativa para produzir materiais bioativos magnéticos para os quais as propriedades magnéticas dependem apenas da qualidade das SPIONs utilizadas na síntese. Com isso, esses nanocompósitos podem ser reconhecidos como uma nova classe de materiais bioativos para aplicações no tratamento de câncer ósseo por hipertermia, além de evidenciar interações intermagnéticas de nanopartículas dentro do nanocompósito.
- e) A viabilidade de células-tronco mesenquimais (MSC) foi demonstrada usando um ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio (MTT) e imagem bioluminescente (BLI) após transdução lentiviral e marcação de nanopartículas magnéticas. A terapia local de MSC combinada com atividade física resultou em melhores resultados no alívio da disfunção motora, principalmente durante o período agudo. Quando se trata de neuroreabilitação, essa terapia alternativa pode ser adequada



- f) Foi desenvolvido o programa SuAVE (Surface Assessment Via grid Evaluation), que é escrito em Fortran 90, que faculta a análise de propriedades geométricas de superfícies e interfaces químicas, considerando a morfologia estrutural destes sistemas.
- g) Realizamos ensaios de microneutralização utilizando os vírus Zika, e dois sorotipos do vírus Dengue (DENV-2 e DENV2). Os resultados mostraram que a proteína, denominada de ZVPA3, é capaz de neutralizar a infecção dos vírus Zika e Dengue *in vitro* com ECs 50 em unidades de  $\mu\text{M}$ .
- h) Mostramos que, em pacientes com doença arterial periférica aterosclerótica, a transferência de colesterol para a fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) está diminuída, o que pode ter importantes implicações na fisiopatologia da doença e, eventualmente, criar um novo alvo terapêutico, já que as HDL têm provável ação anti-aterosclerótica.
- i) Foram estudadas as propriedades estruturais e magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro obtidas pela coprecipitação de íons de ferro na presença de diferentes quantidades de ácido cítrico. O ácido cítrico atua como agente de recobrimento e proporciona controle do tamanho das partículas a serem obtidas.
- j) Produção de nanofolhas de nitreto de carbono. Os resultados toxicológicos mostraram que os nanomateriais, puros e decorados, não apresentaram efeitos toxicológicos agudos em peixe-zebra nas concentrações recomendadas pela OCDE 236.
- k) Estudo da frutose e risco cardiovascular em grupo de cultura germânica: Frutose dietética não se correlacionou com a frutose plasmática ( $p=0,556$ ). A frutose plasmática elevada se associou com um perfil lipídico mais aterogênico e com alterações hepática, que podem favorecer do desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcóolica. Esse perfil foi parcialmente explicado pelo maior perfil de excesso de peso observado no grupo Germânico.
- l) Mostramos que a reorganização induzida por OxLDL do complexo membrana/citoesqueleto em macrófagos pode ser atribuída à desorganização de balsas de membrana ricas em colesterol. Demostramos ainda que esse efeito se deve à inserção de oxisteróis na membrana, que leva a mudanças na organização lipídica e ruptura da estrutura da membrana, semelhante ao efeito da depleção do colesterol por MbCD. Esses resultados indicam que a oxLDL pode induzir alterações físicas no complexo membrana/citoesqueleto dos macrófagos, levando a alterações biomecânicas significativas que comprometem o comportamento celular. Essas alterações, por sua vez, têm implicações importantes no desenvolvimento da aterosclerose, pois contribuem para a fixação dos macrófagos na parede do vaso, potencializando o processo inflamatório para o desenvolvimento da placa de ateroma.



- m) Analisamos as propriedades físico-químicas e estruturais importantes para o desenvolvimento de novos fármacos de interesse clínico (agentes antimicrobianos, antitumorais, antiinflamatórios e/ou antivirais), tais como índice de estabilidade, propensão à formação de agregados, toxicidade, antigenicidade e capacidade de permeabilização celular, capacidade de penetração celular e de atravessar a barreira hematoencefálica. Chegamos a resultados inéditos que nos apontaram análogos (A-D; E-J) de PLA2-1 e Bo-Met1 que, em teoria, devem apresentar baixas citotoxicidade e tendência de agregação em solução. Alguns deles exibem alto potencial antitumoral, antiinflamatório e antiviral, porém baixo potencial para atravessar a barreira hematoencefálica (BBB).
- n) Observou-se que o óleo convencional, após o aquecimento, apresentou redução do tempo de vida médio das amostras excitadas em 340 nm, responsável pela excitação de ácidos graxos e produtos de oxidação. Já o óleo orgânico não apresentou uma tendência de aumento ou de redução do decaimento fluorescente em razão do aquecimento. Este resultado pode indicar que estes materiais podem atingir estágios de oxidação distintos sob as mesmas condições de aquecimento. Ainda a técnica de FRT apresenta sensibilidade suficiente para indicar alterações em óleos vegetais decorrentes da oxidação lipídica, mesmo em estágios iniciais. Isso pode ser observado devida a grande alteração no sinal temporal observado nos resultados obtidos para excitação em 450 nm (emissão 700 nm) para os óleos convencionais e excitação em 340 nm (emissão 530 nm) para óleos orgânicos.
- o) Quando infectados pelo parasita da malária a membrana do eritrócito enrijece e passa a apresentar um comportamento tipo-sólido em comparação à célula saudável à medida que a fase da infecção avança. Com o desenvolvimento da infecção os parâmetros viscoelásticos  $G_0$  e  $\alpha$  indicam o enrijecimento da célula que passa a apresentar comportamento tipo-sólido, o que diminui a capacidade dela de se deformar para realizar a função de troca de gases no sistema circulatório.
- p) A determinação do raio de amarras de membrana ( $\sim 50nm$ ), por exemplo, pode ser feita sem a necessidade de microscopia eletrônica, utilizando a própria imagem da microesfera usada na pinça ótica para gerar a amarra e para medir o raio da mesma, o que traria dinamicidade e economia de recursos na aplicação de pinças óticas na caracterização de propriedades físicas de membranas celulares.
- q) A interação do peptídeo com POPC foi praticamente nula, enquanto que mostrou-se primariamente uma interação exotérmica com membranas contendo POPG, acompanhada de inserção do triptofano na membrana. Uma componente endotérmica foi observada ao final da titulação, principalmente refletindo aumento de turbidez da amostra, provavelmente oriunda de processos de agregação induzidas pelo peptídeo.
- r) No diagrama de fases para a teoria de campo médio molecular, usando o conjunto de parâmetros do composto DOBHOP como padrão, é possível notar, o campo elétrico externo afeta drasticamente a sequência de fases originalmente observadas para o modelo

a campo nulo. Em particular, vemos que a temperatura de transição esmética-C-esmética-A apresenta um comportamento não monotônico quando o campo elétrico é aplicado. Embora a fase esmética-C seja favorecida para campos baixos, há uma redução significativa no intervalo de temperaturas em que esta fase esmética-C é estável.

- s) Foram propostas sínteses por rota sonoquímica de nanopartículas magnéticas, visando uma otimização da perda específica de potência (SLP), para aplicações em hipertermia. A varredura dos parâmetros da síntese sonoquímica, como a concentração de base e de sal, permitiu a obtenção de núcleos magnéticos com diferentes perfis morfológicos e um controle maior da dispersão de tamanho com a diminuição da concentração do precursor. Além do mais, os núcleos magnéticos podem ser modificados pela adição de manganês na rede cristalina (formação de ferrita de manganês) o que reforça seu potencial de uso na área de hipertermia.
- t) Usando métodos de sonoquímica, as nanopartículas magnéticas (MNP) obtidas foram, em seguida, revestidas com sílica (MNP@SiO<sub>2</sub>) e micelas catiônicas. A remoção das micelas foi assistida por ultrassom a fim de obter uma camada de sílica mesoporosa (MNP@mSiO<sub>2</sub>), que foi carregada com o fármaco doxorrubicina (DX); a superfície das NPs foi então funcionalizada com APTES, a fim de permitir o chaveamento da liberação pelo pH do meio.
- u) Demonstramos a possibilidade de estabilização de defeitos e as rotas de “coarsening” para diversas configurações diferentes (planar e homeotrópica).
- v) Utilizando cálculos DFT/ONION desenhou-se várias mordenitas funcionalizadas com cátions imidazólicos, conseguiu-se mostrar que a energia de adsorção dos gases CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S tornam-se experimentalmente interessantes para substituições aminas e hidroxilas, respetivamente, nos cátions.

### **Sumário das atividades para o próximo período**

- a) Objetivamos o estudo da qualidade das LDLs em estudos *in vitro*, com plasma oriundo de pacientes normolipidêmicos, em contato com drogas antiplaquetárias, tica e clop.
- b) Estudo da qualidade das LDLs de pacientes infectados pelo SARS-Cov-2 durante a infecção e após a cura, para verificar eventuais sequelas.
- c) Fazer o estudo relatado em b) para pacientes infectados, identificando a cepa do vírus.
- d) Sintetizar novos fluidos magnéticos com geometria de partículas diversas para aplicações tanto na Física dos cristais líquidos como biomédicas.

- e) Investigar o fator de forma de micelas liotrópicas em contato com dopantes quirais.
- f) Investigar os cristais líquidos cromônicos nemáticos e dopados com agentes quirais.
- g) Síntese e caracterização de nanoadsorventes magnéticos à base de nanopartículas core-shell bimagnéticas do tipo  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  funcionalizadas com L-lisina e CTAB, além de nano-híbridos de nitreto de carbono com  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; Estudos de adsorção de Mo, e Cd, e resíduos farmacêuticos e de fotodegradação de corantes empregando nanoadsorventes magnéticos elaborados (influência do pH, tempo de contato, concentração de poluente e tamanho médio dos nanoadsorventes); Estudo da dependência do potencial zeta com a temperatura de fluidos magnéticos do tipo EDL estabilizados em meio básico; Dispersão das nanopartículas magnéticas em diferentes líquidos iônicos variando diversos parâmetros físico-químicos (concentração, tamanho médio das nanopartículas, natureza dos contra-íons, força iônica, proporção líquido iônico/água, etc.) e seu estudo coloidal por meio de técnicas de espalhamento (DLS e SAXS).
- h) Pretendemos iniciar um programa de análise de modelos estatísticos mínimos, de caráter nemático, com a inclusão de interações quirais inspiradas pelo mecanismo de Dzyaloshinskii-Moriya. Embora haja diversos estudos no contexto fenomenológico, inclusive utilizando teorias elásticas, ainda se torna necessária uma investigação de modelos nemáticos com interações quirais, fazendo contato com o comportamento colestérico num grande número de sistemas da física da matéria mole; Dando prosseguimento a seu trabalho de doutoramento, William Carreras está ainda investigando os diagramas de fase de misturas de elementos nematógenos e dipolares, bem como participando de uma colaboração com o Grupo de Fluidos Complexos do IFUSP, visando a modelar o espalhamento de raios-x a baixos ângulos por cristais líquidos nemáticos.
- i) Pretendemos aplicar a metodologia da imagem de microesferas como sensor de posição para caracterização do raio de amarras celulares, além das medidas de constante elástica axial de uma pinça ótica e dos efeitos de reverberação ótica na interface vidro-água e as interações entre partículas coloidais esféricas e a interface; Pretendemos dar continuidade na caracterização das propriedades mecânicas de eritrócitos obtidos de pacientes com anemia falciforme e também de animais que foram submetidos a diferentes dietas baseadas em ácidos graxos, avaliando a influência dos ácidos graxos na flexibilidade da membrana eritrocitária.
- j) Para o próximo período em relação as células tronco mesenquimais (de medula óssea e de medula óssea de portador de leucemia mieloide aguda), espera-se a aprofundar as vias de sinalização de morte celular que os oxisteróis causam tanto nas CTMs com em linhagens tumorais, com ênfase na autofagia; No estudo do metabolismo lipídico pré e pós-tratamento em pacientes com linfoma não-Hodgking, nos pacientes com imunodeficiência tanto primária e adquirida (AIDS); No estudo do efeito do oxisterol 7-cetocolesterol como agente de indução osteogênica no reparo ósseo de defeito crítico em calota.

- k) Pretendemos dar continuidade de estudo de materiais teranósticos com o desenvolvimento de novos materiais, é o caso de nanopartículas (ouro, prata, ouro-ferro, ouro-prata, ferro-prata) de hexa aminolevulinato (HAL) também um promotor de protoporfirina IX (cerca de 4 vezes mais que o ALA), para aplicações teranósticas do câncer e da aterosclerose; Implementação da organ-a-chip e toxicidade utilizando a micorfluidica mediante a tecnologia de soft litografia; Andamento dos projetos para terapia utilizando estimulação magnética trascraneada para para tratamento de depressão, enxaqueca e doença de Alzheimer utilizando recursos nanobiotecnologicos; Implementação do laboratório comportamental no modelo animal direcionado a doenças degenerativas; Continuar desenvolvendo projetos com empresas na área de inovação para desenvolvimentos no novos produtos; Abordagens de terapia celular para acidente vascular cerebral focal e global utilizando terapias combinadas como exercícios e terapia celular; Estudo da angiogênese e barreira hematoencefálica nos estudos neuro-oncológicos; Avaliação dos processos inflamatórios/infeciosos utilizando recursos de imagem molecular e nanobiotecnologicos.
- l) Estudos com dispositivos de microfluídica para avaliação de alterações biomecâncios celulares no desenvolvimento da placa aterosclerótica: Uma vez finalizado o modelo numérico de design do dispositivo, passaremos a etapa de impressão, utilizando também a introdução de nanofibras de acetato de celulose, a qual fará a interface entre células endoteliais e a matriz de colágeno na reconstrução do vaso sanguíneo, dentro do dispositivo de microfluídica. Uma vez impresso, será realizada a mensuração do fluxo e forças de cisalhamento em colaboração com pesquisadores do Instituto Rene Rachou (Ficoruz – MG), utilizando a metodologia de Micro Particle Imaging Velocimetry ( $\mu$ PIV ou microPIV). Tão logo a simulação seja validada, iniciaremos o plaqueamento das células endoteliais e matriz para a reconstrução de vaso no dispositivo de microfluídica. Ensaio de análises por microscopia ótica e eletrônica serão realizados para verificação da arquitetura da parede do “vaso”. Parceria com Dr. Lionel Gamarra (Instituto Albert Einstein) e Professor Estevam Lascasas (Escola de engenharia UFMG); Caracterização morfológica e de cortes de musculo, a partir de empilhamento de culturas 3D de células musculares em nanofibras de acetato de celulose: Em uma perspectiva biomimética, os tecidos musculares fabricados por engenharia de tecidos devem exibir propriedades estruturais do tipo nativo e, especificamente, conter miofibras densamente compactadas entremeadas por camada de gordura. Assim, pretendemos otimizar a produção das nanofibras contendo óleo de canola e caracterizar melhor as culturas 3D de miócitos nessas nanofibras. Paralelo ao estudo de viabilidade e crescimento dessas células no substrato em questão, pretendemos caracterizar essas células quanto à sua diferenciação morfológica e molecular, concentrando na caraterização da mifibrilas intracelulares e tipo de miosinas expressas, no intuito de otimizar o processo de produção da carne dando textura mais próxima ao real. Parceria com a Dra. Aline Bruno Silva (Departamento Engenharia de Materiais – CEFET/MG).
- m) Interação de antraquinonas com modelos de membranas biológicas; Estudo da interação de diferentes antibióticos da família das levofloxaxinas com modelos de membranas

celulares; Fluoroquinolonas definem uma família de antibióticos sintéticos amplamente utilizados na clínica humana e veterinária; Caracterização estrutural de vesículas catiônicas contendo glicolipídios.

- n) Será dada continuidade aos projetos: “O efeito do oxisterol 7-cetocolesterol (7-kc) como agente de indução osteogênica no reparo ósseo de defeito crítico em calota craniana de ratos” em parceria com a Dra Debora Levi, e também projeto de Fibrina rica em plaquetas injetáveis (i-prf) como sistema de liberação de antimicrobianos na doença periodontal, com a profa Maria Teresa Machini. Será iniciado o projeto “Efeitos de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 vivo e inativado na periodontite experimental em ratos” e o projeto de doutorado direto da “Avaliação do efeito do laser de baixa potência no processo de remodelação óssea na movimentação dentária induzida durante a ativação e reativação da força ortodôntica. Estudo em rato.
- o) Serão avaliados parâmetros genéticos associados ao perfil cardiometabólico e de ancestralidade (GWAS) que permitam cruzar determinantes ambientais com características genéticas que possam melhor explicar o risco cardiometabólico observado por meio de características fenotípicas associadas à cultura germânica.
- p) Na área teórica de cristais líquidos: i) Estudo da dinâmica e dos estados de equilíbrio em cristais líquidos confinados em diferentes geometrias como esférica e em micro-canais; ii) estudar fases nemáticas moduladas via simulações computacionais; iii) o uso de técnicas matemáticas para tratar problemas de contorno em sistemas confinados, incluindo a obtenção de propriedades dielétricas em eletrólitos e espectroscopia de impedância e os efeitos de superfície e difusivos em meios confinados.
- q) Pretendemos continuar os estudos clínicos testando o sistema de nanopartículas lipídicas veiculando quimioterápicos, voltado para o tratamento do infarto agudo de miocárdio e doença arterial coronária crônica.
- r) Pretendemos iniciar estudos clínicos como o sistema de nanopartículas lipídicas veiculando o quimioterápico metotrexato para o tratamento de pacientes com osteoartrose.
- s) Pretendemos continuar as investigações sobre as transferências de colesterol para a HDL, focada agora em hábitos como a prática do exercício físico versus sedentarismo, fumantes versus não-fumantes ou após o abandono do fumo. Além disso, pretendemos estudar o fenômeno das transferências de colesterol em pacientes com hipercolesterolemia familiar.
- t) Desenvolvemos uma vacina de DNA contra o vírus Zika, a qual se mostrou capaz de elicitar respostas celular e humoral in vitro, e que atualmente encontra-se em fase de testes in vivo. A avaliação da vacina, bem como do potencial terapêutico de ZVPA3 em ensaios com modelo murino, constitui uma das atividades para o próximo período. Adicionalmente, também realizamos o desenvolvimento computacional de moléculas potencialmente capazes de neutralizar o vírus SARS-CoV-2 in vitro. Ensaios de

termoforese em microescala demonstraram que essas proteínas se ligam tanto a proteína S da linhagem de referência (L-strain) do SARS-CoV-2, bem como a VPLs (do inglês vírus-like particles). Neste próximo período, realizaremos os ensaios experimentais de microneutralização utilizando pseudo/lentivírus contendo as diferentes proteínas S das variantes de preocupação do vírus descritas até o momento.

- u) Realização de medidas de SLS e de DLS polarizado em amostras de ccfDNA de amostras de pacientes oncológicos, doadores (sem histórico de câncer) e de diferentes linhagens de células tumorais.
- v) Para o próximo ano, a nossa expectativa é implementar funcionalidades no programa SuAVE para o cálculo de propriedades mecânicas em matéria macia. Para isto, além da implementação de novos métodos e algoritmos no código, será necessário validar esta implementação através de experimentos com sistemas modelos. A nossa escolha é usar modelos de membranas bacterianas pois possuímos várias simulações que podem ser utilizadas para as análises.

### **Mudanças nos objetivos propostos**

Não houve mudanças significativas, apenas pequenas adequações como, por exemplo, um dos focos agora passou a ser as sequelas causadas pela infecção pelo SARS-Cov-2. Como parte dos esforços de combate a pandemia, o nosso grupo integrou a Rede de Vigilância Genômica Fiocruz (<http://www.genomahcov.fiocruz.br/>), onde realizou uma série de estudos envolvendo estrutura-atividade para elucidar os mecanismos de evasão do sistema imune por parte das variantes de preocupação do vírus SARS-CoV-2, os quais se encontram fora do escopo dos objetivos para o período, conforme anteriormente proposto.

Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto.

São Paulo, junho de 2022.