



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA**



**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE MICROFLUÍDICA ASSOCIADO A
MÉTODO DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (CRONOAMPEROMETRIA): Uma
técnica alternativa de baixo custo para estudos de bicamadas lipídicas
artificiais**

LUAN TAVARES BATALHA

Maceió-AL

2018

LUAN TAVARES BATALHA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE MICROFLUÍDICA ASSOCIADO A
MÉTODO DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (CRONOAMPEROMETRIA): Uma
técnica alternativa de baixo custo para estudos de bicamadas lipídicas
artificiais**

Monografia apresentada ao corpo docente do curso de Graduação/Licenciatura em Química da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Co-orientador: Prof. Dr. Juan Pablo Zúñiga Hertz

Maceió-AL

2018



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 04 de Julho de 2018

2. Aluno / matrícula: LUAN TAVARES BATALHA / J3J30693

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:

FABIANE CAXICO DE ABREU CALDINO / IAB

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>Fabiane Caxico de Abreu Caldino</u>	(Presidente)	Nota: 10,0
<u>Fronis Soares Gomes</u>	(1º avaliador)	Nota: 10,0
<u>Priscila Figueiredo Machado</u>	(2º avaliador)	Nota: 10,0
	(3º avaliador)	Nota: -

5. Título do Trabalho: DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE MICROFLUÍDICA ASSOCIADO A MÉTODO DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (ERONAMPEROMETRIA): Uma técnica alternativa de baixo custo para estudos de bicamadas lipídicas artificiais

6. Local: SALA DE RAULÓIS DO IAB / UFAL

7. Apresentação: Horário início: 13:04 Horário final: 13:43 /
Arguição: Horário início: 13:45 Horário final: 14:20

8. Nota final: 10,0

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 39 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 35 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)
Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió 24 de Julho de 2018

Presidente: Fabiane Cavaco da Silva Avelino
1º Avaliador: Fernando Soares Gomes
2º Avaliador: _____
3º Avaliador: [Signature]
Candidato: Ruiam Tavares Batalha

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, a quem devo toda honra, glória e louvor, e que me permitiu concluir mais uma etapa importante da vida.

A Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino por todo apoio, incentivo e orientação neste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Sônia Salgueiro Machado, pela amizade, confiança e incentivo e para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Juan Pablo Zúñiga Hertz, idealizador deste projeto, pela amizade, companheirismo, dedicação e coorientação.

Ao Prof. Dr. Vitor Lopes de Abreu Lima, por ter me ajudado a iniciar no mundo científico, e muito mais pela amizade, paciência e incentivos.

Ao Prof. Dr. Francis Soares Gomes, por ter aceitado participar da banca, e muito mais por me servir de exemplo como Professor.

Aos meus tios, Dona Lourdes e Seu Manoel, pela educação que me deram, e pelos valores morais e éticos que me ensinaram.

A minha namorada, amiga e companheira Laís Alves por todo amor e carinho.

Aos meus amigos e a todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia (LBE) por todo o apoio e amizade.

A minha amiga Frankyele Amaral, por todo incentivo e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Aos professores da graduação, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do curso.

Aos meus pais, Damião Vieira Batalha e Rosilene Batalha Tavares (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presentes neste mundo, ainda vivem em minha mente e em meu coração, e são minha força motriz para vencer todas as batalhas da vida.

RESUMO

Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo têm direcionado seus esforços ao estudo de bicamadas lipídicas artificiais. Para tanto, vários protocolos de síntese de bicamadas lipídicas foram desenvolvidos. Tais protocolos permitem a síntese de bicamadas com composições lipídicas variadas, com finalidades diversas de estudo, como a entrega eficiente e segura de fármacos ao interior celular, ou para se compreender melhor como se dão as interações entre nanopartículas e membranas e quais seus possíveis efeitos. Para este fim, tem sido feitas associações entre sistemas microfluídicos e métodos de síntese de bicamadas lipídicas artificiais, todavia, estes sistemas são complexos, requerem de aparelhagem técnica sofisticada e muitas vezes criam bicamadas lipídicas não tão estáveis. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo primordial o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico associado a detecção eletroquímica (cronoamperometria), que apresente as seguintes características: simplicidade e de rápida construção, alta durabilidade, construído a partir de materiais de baixo custo, com alto grau de sensibilidade e funcionalidade e que permita a síntese bicamadas lipídicas artificiais estáveis em seu interior, podendo servir, desta forma, como ferramenta poderosa para estudos envolvendo bicamadas lipídicas. Os resultados cronoamperométricos sugerem, através da queda da corrente basal controle ($\pm 5nA$), que aproximadamente 5 minutos após a inserção de 1 μL da suspensão de fosfolipídios, tem se formado dentro do microcanal central uma bicamada lipídica estável em função do tempo. Assim, estes resultados sugerem que o dispositivo fabricado no contexto deste trabalho pode ser aplicado com eficiência para estudos envolvendo bicamadas lipídicas artificiais.

Palavras-chave: Microfluídica, Bicamadas Lipídicas Artificiais, Cronoamperometria.

ABSTRACT

Many research groups around the world have directed their efforts to the study of artificial lipid bilayers. For this purpose, several lipid bilayer synthesis protocols were developed. These protocols allow the synthesis of bilayers with varied lipid compositions, with different purposes of study, such as the efficient and safe delivery of drugs to the cellular interior, or to better understand how the interactions between nanoparticles and membranes occur and what their possible effects. To this end, associations have been made between microfluidic systems and synthetic lipid bilayer synthesis methods, however, these systems are complex, require sophisticated technical devices and set ups, with the inconvenience of the establishment of unstable lipid bilayers. In this context, the main objective of the present work was the development of a microfluidic device associated with electrochemical detection system (chronoamperometry), with the following characteristics: simplicity and rapid construction, high durability, built from low cost materials, with a high degree of sensitivity and functionality and that allows the synthesis of artificial lipid bilayers stable in its interior, and can thus serve as a powerful tool for studies involving lipid bilayers. The chronoamperometric results suggest, through the control basal current ($\pm 5\text{nA}$), that approximately 5 minutes after the insertion of $1\ \mu\text{L}$ of the phospholipid suspension, a stable lipid bilayer has been formed within the central microchannel as a function of time. Thus, these results suggest that the device manufactured in the context of this work can be applied efficiently for studies involving artificial lipid bilayers.

Key words: Microfluidics, Artificial lipid bilayers, Chronoamperometry.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag: Prata

Au: Ouro

cm: Centímetros

CMC: Concentração Micelar Crítica

Eaux: Eletrodo Auxiliar

ER: Eletrodo de Referência

ET: Eletrodo de Trabalho

GUVs: Vesículas Gigantes Unilamelares

LOC: Lab-On-Chips

mL: Mililitro

MLVs: Vesículas Multilamelares

mm: Milímetros

mV: Milivolts

nA: Nanoampere

μL: Microlitros

μm: Micrometros

PDMS: Polidimetilsiloxano

pL: Picolitros

POC: Point of Care

Pt: Platina

Tc: Temperatura de Transição de Fase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra microfluidics.** Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018. 16
- Figura 2. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra microfluidics devices.** Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018. 17
- Figura 3. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra Lab-on-a-Chips.** Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018. 17
- Figura 4. Imagem de um sistema POC portátil.** 18
- Figura 5. Modelo do mosaico fluido para a membrana plasmática.** É possível ver proteínas inseridas na bicamada lipídica, e esta última delimitando o espaço extra do intracelular. 19
- Figura 6. Esquema de um fosfolipídio de membrana.** 20
- Figura 7. Molécula de colesterol, importante representante da classe dos esteróis.** É possível notar a cadeia carbônica extensa, o que reflete um alto grau de hidrofobicidade para o composto. 20
- Figura 8. Molécula de fosfatidilcolina, um dos lipídeos mais importantes da classe dos glicerofosfolipídios.** 21
- Figura 9. Molécula de esfingomielina, um dos lipídeos mais importantes da classe dos esfingolipídios.** 22
- Figura 10. Estados de transição das membranas lipídicas.** (A) Acima da T_c – Há um aumento na desordem da porção apolar dos fosfolipídios, tornando a membrana mais fluida (cristal líquido). (B) Abaixo da T_c – Há um aumento na ordem da porção apolar dos fosfolipídios, o que aumenta o empacotamento dos mesmos e torna a membrana lipídica mais rígida (gel sólido)23
- Figura 11. Micela.** Observa-se que a geometria do fosfolipídio que deu origem a micela é cônica. Praticamente não há água no interior micelar. 24
- Figura 12. Bicamada lipídica.** Observa-se que a geometria do fosfolipídio que deu origem a bicamada é esférica. 25
- Figura 13. Vesícula.** Quando a bicamada dobra sobre si mesma, produz uma vesícula com um interior aquoso (lipossomo). 25
- Figura 14. Cronoamperometria:** (A) Aplicação de um salto de potencial constante. (B) Gráfico de corrente em função do tempo (curva cronoamperométrica). 27
- Figura 15: Dispositivo de microfluídica para o estudo de bicamadas lipídicas desenhado no contexto do presente projeto.** 29
- Figura 16: Organização das bicamadas lipídicas no microdispositivo desenvolvido.** O PDMS absorve o hexano, forçando os fosfolipídios a se estabilizarem através de interações hidrofóbicas, constituindo uma bicamada lipídica no microcanal do dispositivo. 30

Figura 17: Sistema montado para análise. Figura A: (a) Potenciostato – estabelece a corrente e a voltagem pré-definidas para o experimento. (b) Suporte do microdispositivo. (c) Lupa de microdissecção – permite visualizar a absorção do solvente apolar pela matriz de PDMS. (d) Controlador da microbomba – permite acionar a microbomba. Figura B: (e) Conjunto de eletrodos. (f) microcanal central. (g) microcanal de alimentação com fosfolipídios. (h) Seringa *Hamilton* utilizada para a inserção dos fosfolipídios. (i) microbomba – alimenta o microcanal central com solução condutora. A microbomba é um recurso opcional, e pode ser substituída tranquilamente por uma seringa comum, permitindo renovar manualmente a solução condutora.....32

Figura 18: Absorção de solventes na matriz de PDMS dos microdispositivos desenvolvidos. (A) Tempo de absorção dos solventes no microcanal do dispositivo de PDMS à temperatura ambiente, §, $p < 0,0001$. (B) Tempo de absorção de hexano no microcanal central de PDMS. 33

Figura 19: Registro amperométrico nos microdispositivos de PDMS. (A) Diferença de potencial aplicada durante os registros cronoamperométricos. (B) Registro cronoamperométrico com o microcanal central do dispositivo de PDMS preenchido com KCl (1M/HEPES 5mM; PH 7) mostram correntes estáveis de ± 5 nA durante 250s de registro (n=22); microdispositivos preenchidos com NaCl (1M/HEPES 5mM; PH 7) conduzem de maneira estável $\pm 0,5$ nA durante 250s de registro (n=22)..... 34

Figura 20: Registros cronoamperométricos após a inserção de suspensão de lipídios e o estabelecimento de bicamadas lipídicas. Os gráficos A e B mostram a diminuição da corrente, parâmetro esperado como critério de formação das bicamadas lipídicas. A flecha vermelha indica o momento de inserção da suspensão lipídica. Ambos os registros foram realizados de maneira independente, com n= 4. 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Microfluídica	15
2.2 Membranas celulares	18
2.3 Micelas, lipossomas e métodos de síntese de bicamadas lipídicas	23
2.4 Cronoamperometria	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Construção de dispositivos de PDMS	29
4.2 Análise de absorção de solventes na matriz de PDMS	30
4.3 Análise cronoamperométrica em condições controle	31
4.4 Análise cronoamperométrica após a inserção de lipídios	31
4.5 Análise estatística.	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Os microdispositivos de PDMS permitem uma eficiente absorção de solvente orgânico, favorecendo o subsequente processo de formação de bicamadas lipídicas.	33
5.2 Os microdispositivos de PDMS desenvolvidos permitem registros elétricos estáveis no tempo.	34
5.3 A inserção de lipídios induz a diminuição da corrente conduzida nos microdispositivos, marcando a formação de bicamadas lipídicas.	35
6. DISCUSSÕES	37
7. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Um dos eventos cruciais no decurso evolutivo que permitiu o desenvolvimento de organismos vivos foi a compartimentalização. Com anterioridade, nosso planeta era constituído de minerais e pequenas moléculas orgânicas, muitas das quais, de acordo com a hipótese de Muller (NELSON; COX, 2014) se formaram através de reações químicas entre elementos presentes (C, H, O, N, S, etc) no planeta, catalisadas pelas altas pressões, temperaturas e descargas elétricas. No entanto, a formação de compartimentos permitiu o isolamento de moléculas com funções mais complexas (biomoléculas), originando os microorganismos mais primitivos. Ditos compartimentos foram estabelecidos através de membranas lipídicas. A “escolha” da natureza pelos lipídios, particularmente fosfolipídios, como as moléculas que compõem as membranas compartimentalizadoras, não foi um evento aleatório, considerando que os lipídios, a diferença de outras biomoléculas, apresentam propriedades físico-químicas altamente versáteis em termos de estrutura geométrica, movimentação intramolecular, propriedades anfipáticas, formação de estruturas resistentes a pressão, mudança de propriedades físicas em função da temperatura, entre outras (NELSON; COX, 2014).

As membranas biológicas são dotadas de estruturas altamente dinâmicas e especializadas, as quais desempenham papel crucial em quase todos os fenômenos celulares. Tais estruturas, cuja descrição original corresponde ao chamado modelo de Mosaico Fluido (SINGER; NICOLSON, 1972), são altamente organizadas. A depender da composição lipídica de tais membranas, derivam parâmetros estruturais, de onde acabam decorrendo os mais inúmeros eventos funcionais, dentre eles, mecanismos de transporte através delas, exocitose e endocitose, transdução de sinais, entre outros (VAN MEER, 2005; VAN MEER, 2008; VOELKER; FEIGENSON, 2008; ZÚÑIGA-HERTZ et al., 2018).

Os lipídeos de membrana, além de conferir função estrutural e delimitar o espaço celular, apresentam, como consequência da restrição do fluxo livre de moléculas através dela, propriedades elétricas. Brevemente, a difusão através da membrana de íons e outras moléculas com carga elétrica (facilitado através de canais

e transportadores), permite com que se estabeleça a separação de cargas através da bicamada lipídica; este é o princípio por trás do potencial de ação celular. Portanto, desde que as membranas lipídicas apresentam características de natureza elétrica como alta capacidade de separação de cargas (bons isolantes elétricos), alta capacitância, criação de potenciais elétricos através delas, têm sido utilizadas estratégias eletroanalíticas para determinar mecanismos de transporte através da membrana celular, fenômenos de secreção, assim como o eventual comprometimento da estrutura de membranas biológicas (i.e. agentes farmacológicos que alterem fosfolipídios de membrana, colesterol, indução de formação de poros, etc). Aliás, o uso de estratégias eletroanalíticas foi desenvolvida nas décadas de 1950 e 1960 para o registro eletrofisiológico de células, permitindo descrever fenômenos tão importantes como o potencial de ação, secreção, contração muscular, e vários outros eventos celulares (KRNJEVIR; MILEDI, 1958; ELMQVIST et al., 1964; RAHAL, 2011).

Para o estudo do comportamento dinâmico das bicamadas lipídicas assim como fenômenos biofísicos associados a estas existe uma ampla gama de estratégias técnicas, a maioria das quais requerem um suporte técnico sofisticado. No caso de estudo de fenômenos através da membrana em células vivas, tem sido utilizado, como mencionado acima, desde meados do século XX, equipamentos de eletrofisiologia, os quais requerem de sistemas amplificadores de correntes, microscópios, sistemas de micro injeção e registro elétrico. Também existem sistemas que utilizam monocamadas lipídicas artificiais. Esses sistemas oferecem a vantagem de possibilitar o controle da composição lipídica, permitindo compreender fenômenos como transições de fase (RECKTENWALD; MCCONNELL, 1981), comportamento de lipídios (FEIGENSON, 2007) e, dentre outros fenômenos, transporte de substâncias (ROMANO-FONTES et al., 2000). No entanto, os sistemas tradicionalmente utilizados, como as bicamadas planas e as vesículas gigantes unilamelares (GUVs), embora altamente utilizados e eficientes como ferramenta de estudo, apresentam dificuldades técnicas no sentido da necessidade de equipamentos especializados para a formação das mono e bicamadas lipídicas assim como dos sistemas de registro (KAPOOR et al., 2008).

Embora inúmeras respostas a questões fundamentais sobre fenômenos de membrana têm sido respondidas através do uso dessas estratégias técnicas, a necessidade de sistemas de estudo mais versáteis e com um custo técnico menor,

que abra caminho para o desenvolvimento de dispositivos com aplicação em campo, é fundamental. Tal necessidade adquire valor particular nos dias atuais como consequência de um nível de exposição cada vez maior a materiais nanoparticulados, de tal maneira que há uma crescente preocupação de alguns grupos de pesquisa no mundo sobre a interação entre tais materiais (de amplo uso em indústrias biomédicas, farmacológicas, cosméticas e outras) e sistemas biológicos, dentre eles as membranas biológicas (LEROUEIL et al., 2007; ROSSI; MONTICELLI, 2016 ; CONTINI et al., 2018).

Tem sido crescente, ano após ano, as aplicações da nanotecnologia nos mais diversos segmentos, como no desenvolvimento de cosméticos, nas indústrias de cerâmicas, para o desenvolvimento de produtos agrícolas (fertilizantes, pesticidas e herbicidas), bem como para o carregamento e distribuição controlada de fármacos dentro do organismo (ABDI, 2011; CONTINI et al., 2018). É diante deste cenário de amplo uso de nanopartículas que muitas pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando compreender melhor quais os impactos ambientais e na saúde humana causados por partículas nano, uma vez que não se conhece bem qual a toxicidade que materiais nanoparticulados podem exercer na estrutura de membranas celulares, órgãos e sistemas inteiros (HOHENDORFF; ENGELMANN; OSHIRO, 2014; ROSSI; MONTICELLI, 2016; CONTINI et al., 2018).

Os sistemas de microfluídica têm se mostrado uma solução viável, de baixo custo, alta sensibilidade e aplicáveis a diversos sistemas químicos e biológicos. Diversos materiais têm sido utilizados como matrizes para a construção destes, dentre eles vidro e polímeros como poliestireno, polipropileno, policarbonato (PVC) e polidimetilsiloxano (PDMS). As matrizes de polidimetilsiloxano oferecem a possibilidade de rápida absorção de solventes não polares. Por sua vez, as membranas lipídicas artificiais, independente do sistema de suporte utilizado, requerem da presença de solventes não polares para estabilizar os lipídios. Nesse sentido, microdispositivos compostos de microcanais (200-400 μ m) inseridos em PDMS permitem que o solvente orgânico no qual fosfolipídios se encontram suspensos possa ser absorvido, de maneira que a fase aquosa presente no microcanal força os fosfolipídios a se estabilizarem no formato de bicamadas livres,

orientando os grupos polares à fase orgânica e estabilizando as cadeias alifáticas através de interações hidrofóbicas, formando uma bicamada sintética estável.

A importância de desenvolver estratégias simples de formação de membranas lipídicas artificiais, acopladas a sistemas de detecção eletroquímica, responde à necessidade de avaliar, de maneira rápida, efetiva e de baixo custo, se a interação entre bicamadas lipídicas e nanopartículas e diversos mecanismos carregadores de fármacos são seguros, em termos de não interferirem com a integridade da membrana. No entanto, é necessário o estabelecimento de um sistema de detecção eficiente que permita avaliar dita interação. Para tanto, considerando as propriedades elétricas das bicamadas lipídicas, temos utilizado no presente projeto, sistemas de detecção eletroquímica (cronoamperometria). Existem outras estratégias técnicas para avaliar a interação de nanopartículas com membranas lipídicas, como é o caso de uso de partículas fluorescentes.

De acordo com Araújo (2010), os métodos baseados na detecção por fluorescência necessitam de aparelhagens específicas, como fonte óptica de alta intensidade para emitir feixes luminosos em comprimentos de onda específicos, lentes convergentes para direcionar o feixe luminoso para a amostra a ser analisada, monocromador para permitir a passagem de uma faixa estreita de energia radiante centrada em um comprimento de onda específico, bem como fluoróforos que possuam afinidade química com as membranas celulares, e etc.

Neste trabalho, temos decidido pelo uso da estratégia eletroanalítica. A justificativa por trás do uso dessa alternativa se dá devido se tratar de uma técnica simples, de fácil execução e alta sensibilidade (registra correntes na ordem de nanoampere - nA), alta reprodutibilidade e necessita apenas de um potenciostato acoplado a um computador.

O presente trabalho é parte de um projeto de pós-doutorado e objetivou desenvolver um dispositivo de microfluídica associado a parâmetro de detecção eletroquímica (cronoamperometria) com o objetivo de sintetizar e estabilizar uma bicamada lipídica artificial dentro do microcanal central do dispositivo, a partir de uma suspensão de fosfolipídios. Desta feita, uma vez que o microdispositivo se mostrou funcional, o mesmo poderá ser empregado futuramente em estudos de interação nanopartícula – membrana ou estudos que requerem de uma bicamada lipídica

estável. Neste microcanal será possível estabilizar bicamadas lipídicas sintéticas, cujos parâmetros elétricos registrados mostrarão se nanopartículas interferem negativamente (ou não) na estrutura das bicamadas lipídicas formadas a partir de diferentes composições lipídicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microfluídica

De acordo com Rahal (2011), a Microfluídica é um campo multidisciplinar de pesquisa e tecnologia baseada na análise do comportamento, controle preciso e manipulação de volumes muito pequenos de fluidos em estruturas de dimensões micrométricas, bem como na fabricação e aplicação dessas estruturas. Entretanto, não há uma transição bem definida entre o macro e o micro, de tal maneira que é conveniente associar à microfluídica características como: pequenos volumes (μL à mL); pequenas dimensões das estruturas (μm à mm); escala dimensional em que predominem os “efeitos micrométricos”.

A Microfluídica surge no final da década de 70 como parte da tecnologia de sistemas microeletromecânicos, utilizando técnicas próprias da microeletrônica. O desenvolvimento das impressoras inkjet deu início ao ramo da Microfluídica, onde canais e tubos de dimensões micrométricas realizam operações com fluidos (RAHAL, 2011; SCHIANTI; SEABRA, 2012).

O primeiro dispositivo microfluídico com aplicação em análises químicas foi desenvolvido e publicado em 1979 por pesquisadores da Universidade de Stanford, Califórnia. O silício foi utilizado como substrato natural para a microfabricação do seu sistema e tinha como função a análise de gases por cromatografia (TERRY; HERMAN; ANGELL, 1979). Desde então, muitos materiais têm servido de superfície para o desenvolvimento de tais dispositivos, como o vidro e alguns polímeros. Dentre os polímeros, os mais utilizados são o poliestireno, polipropileno, policarbonato (PVC), metacrilato de metila e polidimetilsiloxano (PDMS). Entre estes, o PDMS é de longe o mais utilizado na fabricação dos dispositivos de microfluídica (ZHOU; ELLIS; VOELCKER, 2010).

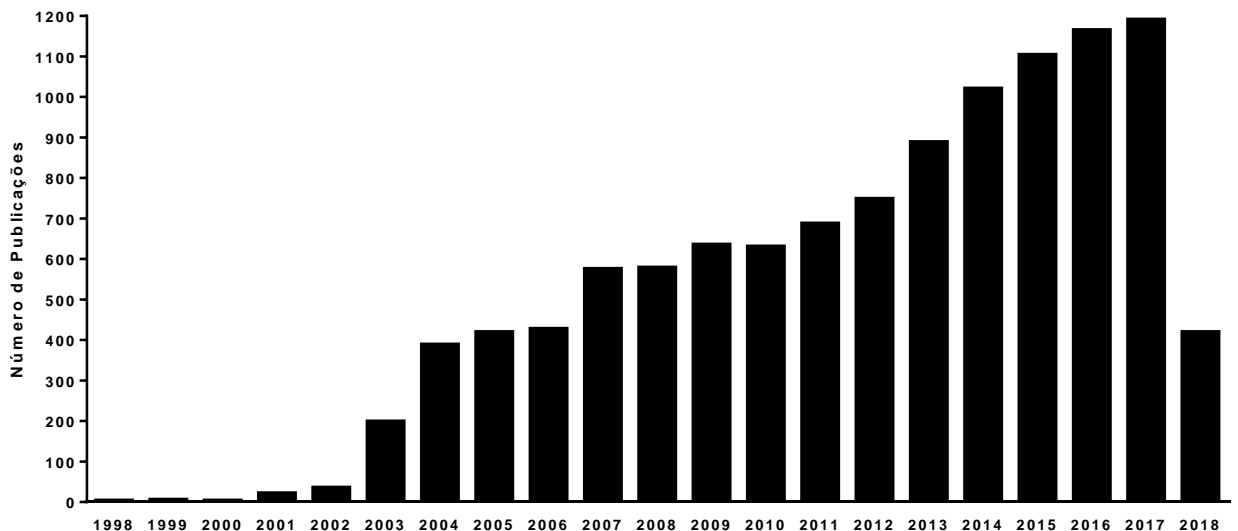
A justificativa por trás da ampla utilização do PDMS na construção dos dispositivos de microfluídica por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo se dá devido a vários fatores, como, por exemplo, seu baixo custo em relação a outros

materiais, suas propriedades elastoméricas, biocompatibilidade, permeabilidade a gases, facilidade de preparo e moldagem (o que permite construir canais em escalas micrométricas), facilidade de ligação com superfícies vítreas, inércia química relativamente alta e de boa transparência óptica (ZHOU; ELLIS; VOELCKER, 2010).

Alguns dispositivos de microfluídica integram diferentes tecnologias como microeletrônica, sistemas micromecânicos, microfluídicos e ópticos, os chamados Lab-on-a-Chips (LOC), verdadeiros laboratórios que reúnem em um só chip diversas funções como dosagem, mistura, classificação, excitação e detecção de pequenas quantidades de amostras por diferentes métodos analíticos, os quais se aproximam cada vez mais das dimensões do mundo biológico devido os avanços da micro e nanotecnologias, possibilitando estudos a nível celular ou mesmo molecular (RAHAL, 2011; ARISTIZÁBAL, 2012).

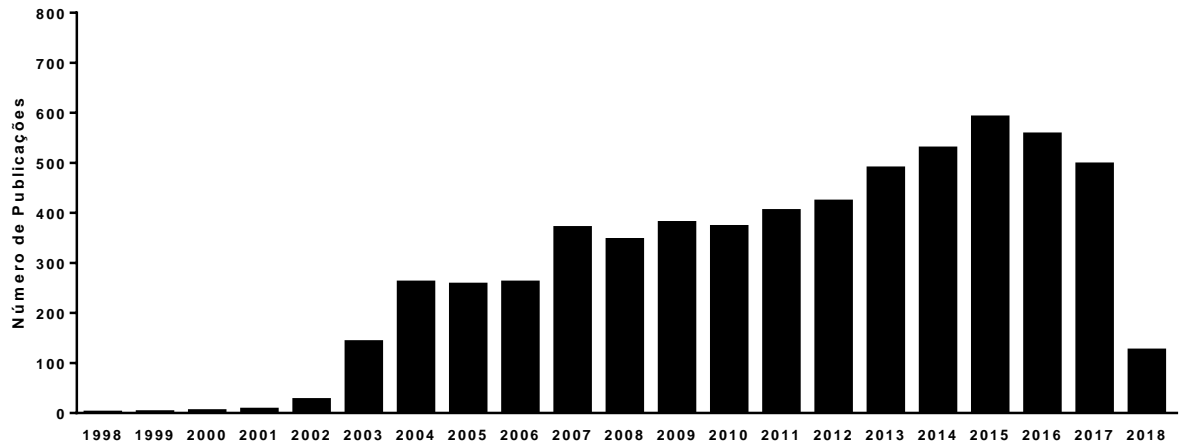
Nos gráficos abaixo é possível observar o crescente número de publicações com as palavras *microfluidics*, *microfluidics devices* e *lab on a chips*.

Figura 1. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra *microfluidics*. Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018.



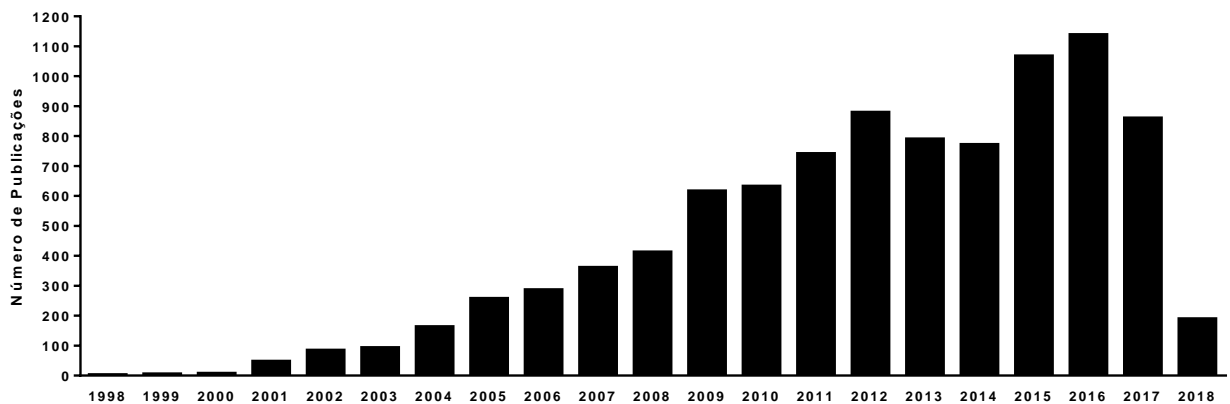
Fonte: autor, 2018.

Figura 2. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra *microfluidics devices*. Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018.



Fonte: autor, 2018.

Figura 3. Gráfico relacionado ao número de publicações com a palavra *Lab-on-a-Chips*. Os dados foram obtidos da base de dados PubMed no dia 19-04-2018.



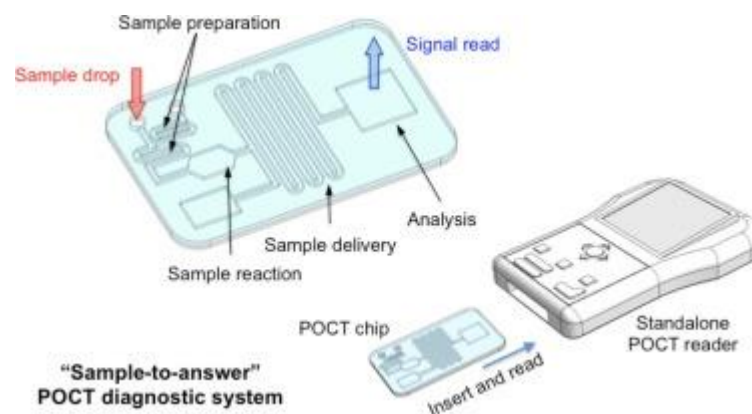
Fonte: autor, 2018.

O crescente número de publicações nesta área se justifica pelas vantagens técnicas e operacionais inerentes a ela. Com tais dispositivos é possível realizar análises com pouca ou nenhuma intervenção humana, em tempo real e consumindo o mínimo de reagentes, além de serem dispositivos portáteis. Esta última característica é bastante explorada nos “point of care” (POC), que são LOCs utilizados em diagnósticos na saúde pública e que tornam possível o diagnóstico de doenças em regiões onde não há laboratórios de análise disponíveis (RAHAL, 2011).

Os dispositivos tipo POC, além das vantagens citadas anteriormente, possuem características como ser portátil (de pequeno peso e volume), estabilidade em condições ambientais variadas, realizar análises com precisão laboratorial, processamento de análise rápida, fácil transporte, manuseio e simplicidade de operação. Tais características são de extrema importância pois possibilitam realizar testes de DNA, testes imunológicos, parasitológicos, hemograma completo, testes de gravidez, de glicose, tuberculose, hepatite B e malária e diagnósticos de muitas outras doenças em regiões mais carentes do planeta (RAHAL, 2011; LUPPA et al., 2011).

De acordo com Rahal (2011) e Jung et al. (2014), um dos modelos de dispositivos tipo POC utilizados é baseado em chips microfluídicos (cartuchos) complexos, formado por vários componentes como microcanais, microbombas e micromisturadores, filtros e etc. A amostra a ser analisada é inserida no cartucho e este por sua vez é inserido no analisador, como mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. Imagem de um sistema POC portátil.



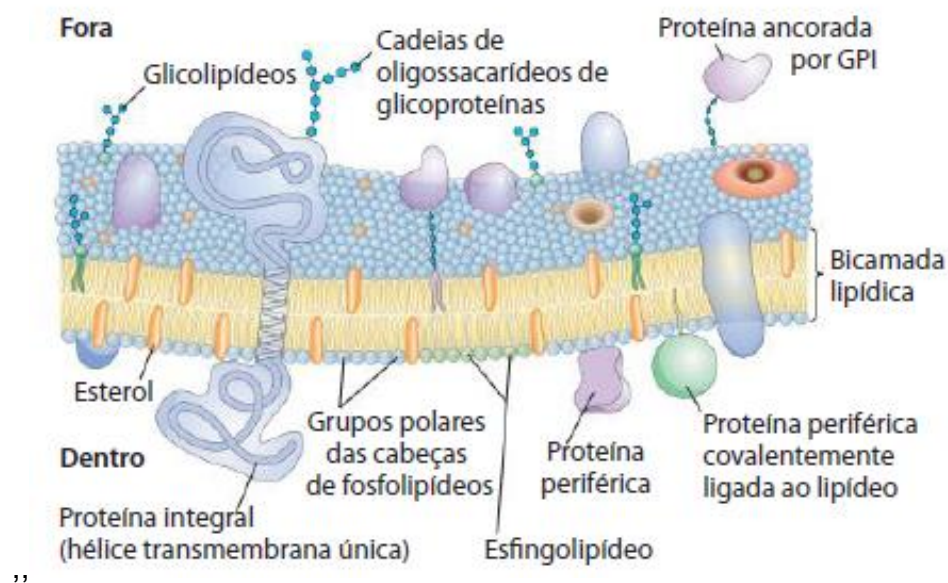
Fonte: JUNG et al. (2014)

2.2 Membranas celulares

Membranas celulares, também chamada de membrana plasmática, são barreiras constituídas de fosfolípidios que delimitam o espaço extra e intracelular. Tais membranas são semipermeáveis ao fluxo de substâncias para dentro e fora das células e organelas. Tal organização das membranas celulares é conhecida como modelo Mosaico Fluido (SINGER; NICOLSON, 1972; NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

O modelo mosaico fluido foi proposto em 1972 por Singer e Nicolson para explicar a estrutura da membrana plasmática. Tal denominação foi dada porque a membrana plasmática assemelha-se a um mosaico formado por proteínas inseridas em um fluido de fosfolipídios, como mostrado na **Figura 5** (SINGER; NICOLSON, 1972; NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015). O termo mosaico significa que as proteínas de membrana e a bicamada lipídica existem lado a lado, sem ligações covalentes entre proteínas e lipídeos (CAMPBELL; FARRELL, 2015).

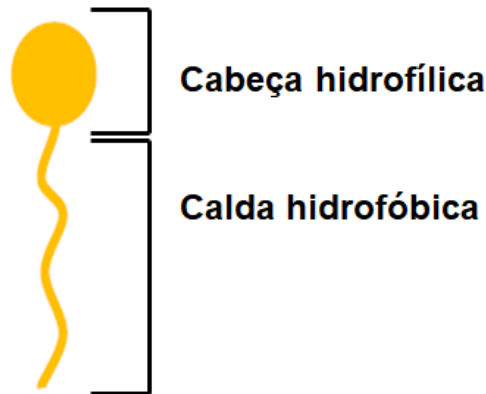
Figura 5. Modelo do mosaico fluido para a membrana plasmática. É possível ver proteínas inseridas na bicamada lipídica, e esta última delimitando o espaço extra do intracelular.



Fonte: NELSON; COX (2014).

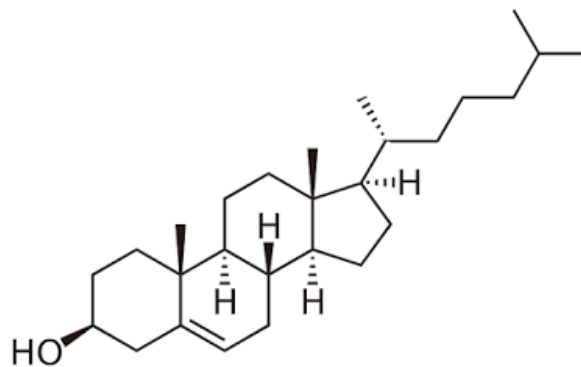
A bicamada lipídica das membranas celulares é composta basicamente de fosfolipídios e colesterol. Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam uma região hidrofílica (tem afinidade por solventes polares, como a água) e outra hidrofóbica (tem afinidade por solventes apolares), como mostrado na **Figura 6**. Já o colesterol tem apenas um grupo hidroxila polar, e uma enorme cadeia apolar, sendo assim, altamente hidrofóbico, como mostra a **Figura 7** (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

Figura 6. Esquema de um fosfolipídio de membrana.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 7. Molécula de colesterol, importante representante da classe dos esteróis. É possível notar a cadeia carbônica extensa, o que reflete um alto grau de hidrofobicidade para o composto.



Fonte: Autor, 2018.

Moléculas anfifílicas como os fosfolipídios apresentam uma “cabeça” polar e uma “calda” apolar. Deste modo, uma vez que fosfolipídios se encontrem em meio aquoso, espontaneamente sua fração polar interage com a água e sua fração apolar interage com a fração apolar de outros fosfolipídios, formando agregados lipídicos com diferentes estruturas (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

A depender da temperatura e da composição lipídica (tamanho da cadeia polar/apolar, ácido graxo saturado/insaturado e presença de colesterol), as membranas podem apresentar maior grau de fluidez ou rigidez. (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

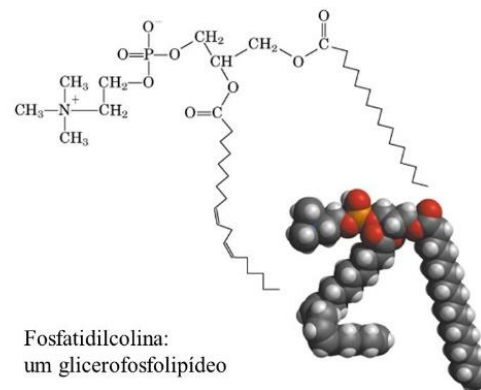
Com o aumento da temperatura, as bicamadas saem de um estado de maior organização (alto grau de empacotamento e alta rigidez) para um estado mais

desorganizado (baixo grau de empacotamento e baixa rigidez), o que influencia diretamente a resistência mecânica destas, já a presença de lipídios insaturados confere à bicamada menor grau de empacotamento e conseqüentemente, menor rigidez. O colesterol, por ter uma estrutura anelar rígida, atua como verdadeiras estacas, impedindo a movimentação das cadeias carbônicas laterais dos fosfolipídios que compõe a bicamada, restringindo a movimentação deles, conferindo maior grau de empacotamento e, conseqüentemente, maior rigidez à bicamada lipídica. (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

Os lipídios de membranas têm sido categorizados de diversas maneiras (FAHY et al., 2005), entretanto, tem sido proposto um sistema de classificação de acordo com a sua geometria e, conseqüentemente, sua contribuição à parâmetros de ordem dos mono-folhetos lipídicos (VAN MEER, 2005; ZÚÑIGA-HERTZ et al., 2018).

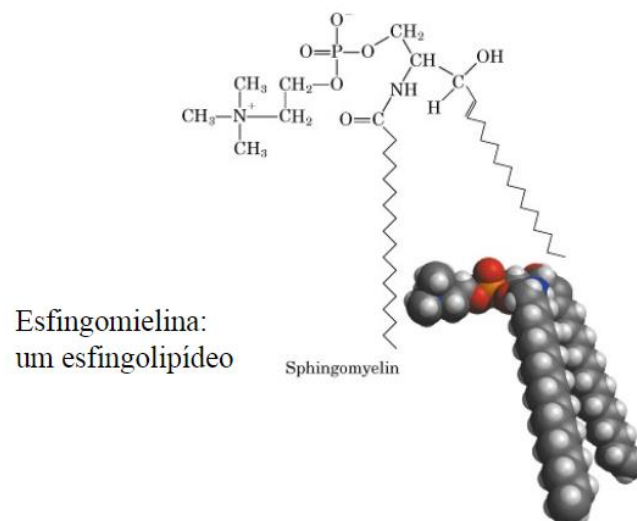
Brevemente, os lipídeos de membrana podem ser categorizados em glicerofosfolipídios (**Figura 8**), esfingolipídios (**Figura 9**) e esteróis, sendo representado pelo colesterol em membranas eucarióticas animais (**Figura 7**). A primeira categoria é composta, principalmente, de fosfolipídios com cadeias alifáticas insaturadas ou bem grupos polares volumosos, o que lhes confere uma geometria denominada de cônica (cadeias alifáticas saturadas) ou cônica invertida (grupos polares volumosos e cadeias alifáticas saturadas/insaturadas). A segunda categoria corresponde principalmente a fosfolipídios de cadeias alifáticas saturadas e grupos polares pequenos, o que lhes confere uma geometria cilíndrica. Finalmente, os esteróis correspondem a moléculas planares que, em termos gerais, se associam aos fosfolipídios providenciando maior ordem molecular, restringindo a movimentação dos lipídios (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). Dessa maneira, fosfolipídios de geometria cilíndrica conferem alto nível de empacotamento e organização molecular; por sua vez, a inserção no meio destes de fosfolipídios com geometria cilíndrica invertida (grupo polar pequeno e cadeias alifáticas com insaturações) desestabiliza dita organização aumentando a fluidez de membrana; os esteróis, colesterol no caso do reino animal, se associa nas imediações dos grupos polares agindo como verdadeiras estacas, aumentando o empacotamento dos fosfolipídios restringindo a movimentação molecular destes (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

Figura 8. Molécula de fosfatidilcolina, um dos lipídeos mais importantes da classe dos glicerofosfolipídios.



Fonte: Slideplayer, 2018.

Figura 9. Molécula de esfingomielina, um dos lipídeos mais importantes da classe dos esfingolipídios.

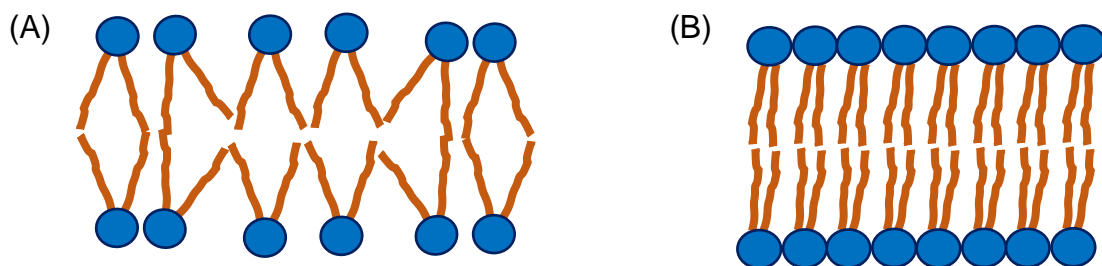


Fonte: Slideplayer, 2018.

Outro aspecto importante a ser considerado quando se fala de bicamadas lipídicas é a temperatura de transição de fase (T_c). Quando os lipídios de membrana estão submetidos a um valor de temperatura abaixo da T_c , suas cadeias apolares adquirem movimento restrito, apresentando maior grau de empacotamento, o que torna a bicamada mais rígida, mecanicamente mais resistente – a esta estrutura mais organizada, chama-se gel sólido ou gel cristalino (**Figura 10A**). Se os lipídios de membrana estão submetidos a um valor de temperatura acima da T_c , suas cadeias

apolares adquirem maior grau de mobilidade, apresentando menor grau de empacotamento, o que torna a bicamada mais fluida, mecanicamente menos resistente – este estado de menor organização chama-se de cristal líquido, ilustrado na **Figura 10B** (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015).

Figura 10. Estados de transição das membranas lipídicas. (A) Acima da T_c – Há um aumento na desordem da porção apolar dos fosfolipídios, tornando a membrana mais fluida (cristal líquido). (B) Abaixo da T_c – Há um aumento na ordem da porção apolar dos fosfolipídios, o que aumenta o empacotamento dos mesmos e torna a membrana lipídica mais rígida (gel sólido).



Fonte: autor, 2018.

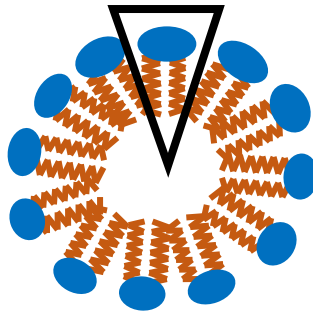
O comprimento da cadeia lipídica influencia diretamente a T_c . Quanto maior for o comprimento da cadeia e o grau de saturação dos lipídios constituintes da membrana, maior a T_c (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2015). De acordo com Voet e Voet (2013), a maioria das membranas biológicas apresentam T_c entre 10 e 40 °C.

2.3 Micelas, lipossomas e métodos de síntese de bicamadas lipídicas

Quando moléculas anfífilicas como os glicerofosfolipídios e esfingolipídios entram em contato com a água, espontaneamente há a formação de agregados globulares cujos grupos hidrofóbicos interagem entre si e não entram em contato com a água. Tal estrutura, quando é composta por poucas dúzias até alguns poucos

milhares de moléculas anfifílicas, é chamada de micela (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014).

Figura 11. Micela. Observa-se que a geometria do fosfolipídio que deu origem a micela é cônica. Praticamente não há água no interior micelar.



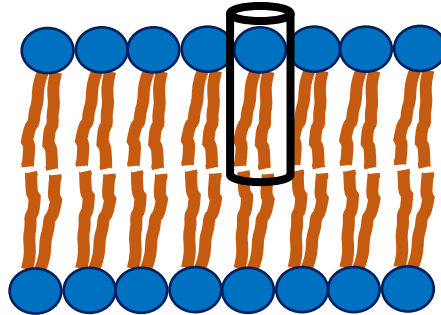
Fonte: autor, 2018.

O processo de formação de micelas é cooperativo, ou seja, necessita de uma concentração mínima de moléculas anfifílicas para as formar. Tal concentração é conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC, praticamente todas as moléculas anfifílicas formam micelas e abaixo dela, a baixa quantidade de moléculas não conseguem proteger seus grupos apolares do contato com a água, tornando-a termodinamicamente instável (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014).

A depender da composição lipídica, há a formação de estruturas diferentes. Os lipídios que apresentam os grupos polares com área de secção transversal maior (mais largos) que a área de secção transversal dos grupos apolares, tendem a formar micelas, como ilustrado na **Figura 11** (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014).

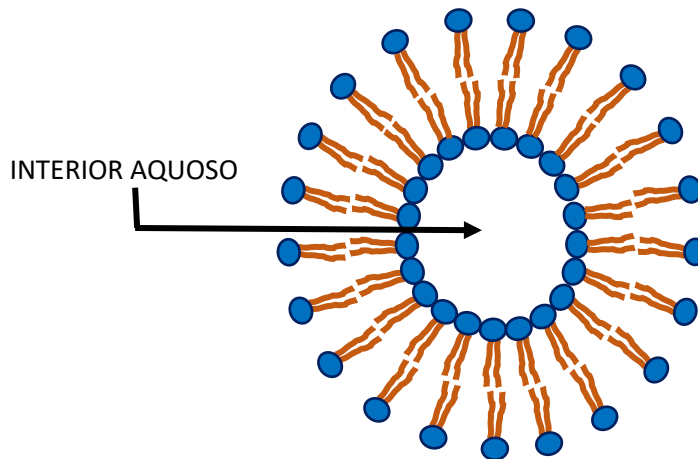
Outro tipo de agregado lipídico é a bicamada, na qual duas camadas monolipídicas interagem formando uma lâmina bidimensional, onde as porções hidrofóbicas de cada monocamada interagem entre si, e as porções hidrofílicas de cada monocamada interagem com a água, como ilustrado na **Figura 12**. Entretanto, como as bordas hidrofóbicas da bicamada lipídica ainda se encontram em contato direto com a água, a bicamada torna-se instável e, para minimizar sua instabilidade, dobra-se espontaneamente, formando vesículas, como ilustrado na **Figura 13** (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014).

Figura 12. Bicamada lipídica. Observa-se que a geometria do fosfolípido que deu origem a bicamada é esférica.



Fonte: autor, 2018.

Figura 13. Vesícula. Quando a bicamada dobra sobre si mesma, produz uma vesícula com um interior aquoso (lipossomo).



Fonte: autor, 2018.

Uma suspensão aquosa de fosfolípidios forma vesículas multilamelares (MLVs), ou seja, com múltiplas bicamadas. O arranjo das bicamadas possui o formato semelhante a uma cebola. Todavia, quando submetidas à sonicação (agitação por vibrações ultrassônicas), tais estruturas sofrem rearranjos, formando lipossomos (VOET. D; VOET. J., 2013; NELSON; COX, 2014).

De acordo com Voet e Voet (2013), os lipossomos são vesículas fechadas, autosselantes, preenchidas por solventes e delimitadas por uma bicamada única.

Os lipossomos são bastante empregados no estudo de bicamadas lipídicas sintéticas. O motivo de sua aplicação deriva da sua alta estabilidade após formados e, além disso, a possibilidade de criar lipossomos a partir de composições fosfolípídicas distintas, mimetizando bicamadas lipídicas celulares com resistências

mecânicas (fluidez/rigidez) variadas (BATISTA et al., 2007; VOET. D; VOET. J., 2013; SIONTOROU et al., 2017).

Uma das aplicações que tem sido dada aos lipossomos é como carreadores de fármacos para o meio intracelular, uma vez que estes protegem tais fármacos contra a ação enzimática e permite que este fármaco chegue à célula alvo, atravessando a bicamada lipídica, podendo assim exercer seus efeitos terapêuticos (BATISTA et al., 2007; AGHDAEI et al., 2008; SIONTOROU et al., 2017).

Para forma-los, existe uma série de alternativas técnicas, das quais a maioria se baseia em dissolver os fosfolípidios em solventes orgânicos apolares, depois evaporar o solvente orgânico, restando apenas um filme lipídico. Logo após, faz-se a hidratação do filme lipídico com água ou solução tampão sob vigorosa agitação magnética, promovendo a formação da dispersão de MLV's (BATISTA et al., 2007; SIONTOROU et al., 2017).

Há outras alternativas técnicas de síntese de mono e bicamadas lipídicas, como os métodos mecânicos por extrusão através de membranas de policarbonato de diferentes porosidades, por prensa de French ou uso de microfluidificador/homogeneizador e sonicação, métodos eletrostáticos, no qual se criam um campo elétrico que induz a formação da bicamada ou métodos químicos, no qual se dissolve os lípidios em álcool ou éter e injeta-se em solução aquosa aquecida, seguido de evaporação do solvente orgânico (BATISTA et al., 2007; AGHDAEI et al., 2008; SIONTOROU et al., 2017).

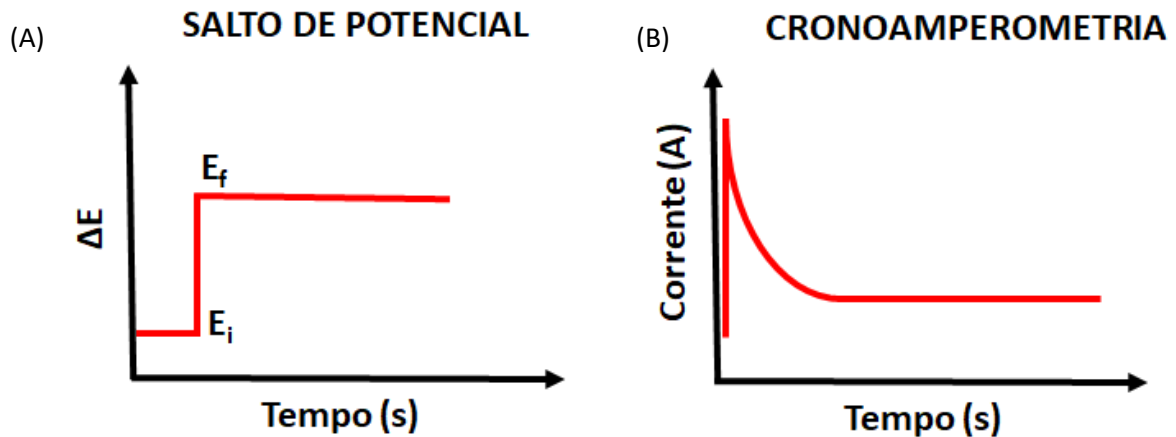
O método de síntese de bicamadas lipídicas utilizado neste trabalho é uma adaptação do método descrito por Malmstadt, N. et al. (2006).

2.4 Cronoamperometria

Trata-se de uma técnica eletroanalítica de alta sensibilidade, baseada na aplicação de um salto de potencial único (constante) que produz uma corrente elétrica que decai rapidamente com o tempo, como ilustrado na **Figura 13** (QUINTINO; ANGNES, 2003; MATIAS; GIL, 2010; OLIVEIRA. L; OLIVEIRA. M, 2011). O potencial é aplicado por um potenciostato entre o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo de referência (ER). A corrente é medida entre o ET e o eletrodo auxiliar (EAux), também

chamado de contra eletrodo (QUINTINO; ANGNES, 2003; MATIAS; GIL, 2010; OLIVEIRA. L; OLIVEIRA. M, 2011).

Figura 14. Cronoamperometria: (A) Aplicação de um salto de potencial constante. (B) Gráfico de corrente em função do tempo (curva cronoamperométrica).



Fonte: autor, 2018.

A cronoamperometria é uma técnica bastante empregada em titulações, devido a corrente produzida estar relacionada diretamente a concentração do eletrólito (QUINTINO; ANGNES, 2003; OLIVEIRA. L; OLIVEIRA. M, 2011). Também tem sido empregada para estudos de quantificação de lipossomas (HELLBERG et al., 2002; HERNÁNDEZ; SCHOLZ, 2008).

Como dito acima, para que seja aplicado o potencial entre o ET e o ER, é necessário um potenciostato acoplado a um computador. Através do computador, todos os parâmetros experimentais podem ser programados, como o potencial gerado, o tempo de análise, dentre outros.

Segundo os autores Quintino e Angnes (2003) e Oliveira. L e Oliveira. M (2011), a técnica apresenta limitações quando a análise é realizada com aplicação de potenciais extremos (positivos ou negativos), pois pode promover a oxidação ou a redução das espécies eletroativas em potenciais abaixo do valor estabelecido. Ainda segundo os autores supracitados, é aconselhável a aplicação de baixos valores de potenciais. Entretanto, para este trabalho isto não será um problema, visto que o potencial aplicado nos experimentos será de apenas 100 mV (0,1V).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver um dispositivo de microfluídica simples com matriz de PDMS para estudo de bicamadas lipídicas artificiais.

3.2 Específicos

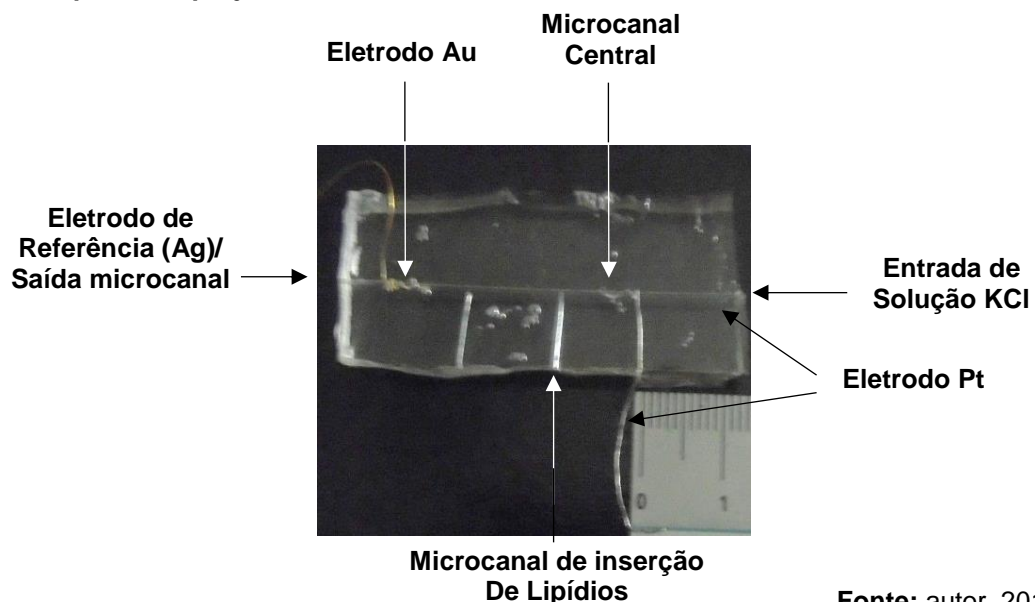
- Estabelecer as condições apropriadas para a detecção eletroquímica, solução eletrolítica a ser utilizada e solventes utilizados no preparo da suspensão fosfolipídica para o estabelecimento das bicamadas lipídicas artificiais;
- Desenvolver experimentos controle iniciais para verificar a funcionalidade do microdispositivo e a estabilidade da bicamada lipídica sintética dentro do microcanal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção de dispositivos de PDMS

Foi construído um molde (5cm comprimento e 4cm largura) sobre uma superfície de vidro. Foi utilizado um arame de aço (tipo *stainless steel*) de 400 μ m de diâmetro para estabelecer o canal central do microdispositivo de PDMS. Adicionalmente, foram inseridos no sistema agulhas de costura (previamente esterilizadas) e perpendiculares ao arame de aço do canal central. As agulhas foram escolhidas pelo seguinte motivo: sua ponta fina, quando em contato com o arame do canal central, permitem que ao serem retiradas do molde de PDMS, criem canais alimentadores através dos quais são inseridas as suspensões de lipídios. Esses canais tem o formato fino da agulha, o que permite que ao se retirar a seringa utilizada para inserir a suspensão lipídica do canal de alimentação, o poro deixado na matriz de PDMS se feche, impedindo o extravasamento da suspensão lipídica ou da solução condutora. Por sua vez, foram colocados os sistemas de eletrodos (Ag, Pt e um eletrodo de Au de trabalho) em contato com o arame central. PDMS liquido em proporção 9:1 base:agente curador foi utilizado (Sylgard[®] 184, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) para cobrir a estrutura anterior. Após uma hora de secado a 60°C, o molde foi desmontado, sendo retirado o arame central e as agulhas dos canais alimentadores, se obtendo um dispositivo como o que se mostra na **Figura 15**.

Figura 15: Dispositivo de microfluídica para o estudo de bicamadas lipídicas desenhado no contexto do presente projeto.



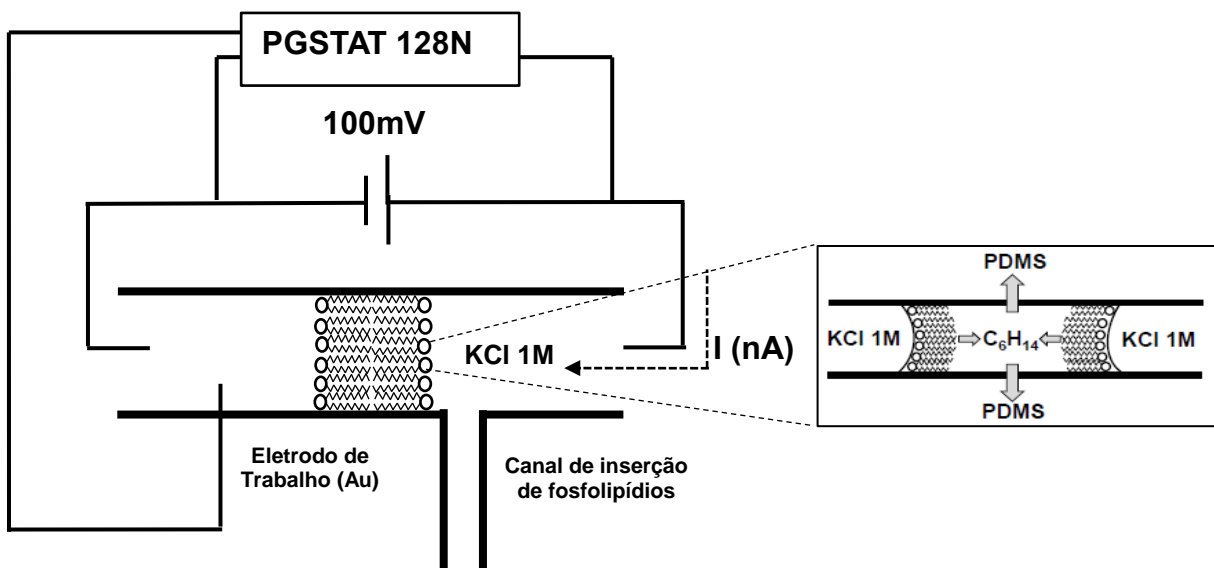
Fonte: autor, 2018.

4.2 Análise de absorção de solventes na matriz de PDMS

Diversos solventes orgânicos se utilizam para solubilizar lipídios rotineiramente utilizados para os estudos de bicamadas lipídicas. O intuito da utilização de matriz de PDMS é a sua capacidade de absorver solventes apolares. Considerando que a porção maior dos lipídios corresponde à suas cadeias de hidrocarboneto, quando são inseridas suspenções de lipídios em solventes apolares num meio aquoso, a absorção do solvente apolar pelo PDMS leva à estabilização das cadeias de hidrocarboneto através de interações hidrofóbicas, e a fração polar dos lipídios interagem com o meio aquoso da solução salina, levando ao estabelecimento de uma bicamada lipídica, tal como se mostra na **Figura 16**.

Com o intuito de determinar o solvente apropriado (eficiente solubilização dos fosfolipídios e sua rápida absorção por parte do PDMS), foram testados água deionizada (H_2O), etanol (C_2H_6O), acetonitrila (C_2H_3N), clorofórmio ($CHCl_3$) e hexano (C_6H_{14}). Todos os solventes utilizados foram fabricados pela Synth[®].

Figura 16: Organização das bicamadas lipídicas no microdispositivo desenvolvido. O PDMS absorve o hexano, forçando os fosfolipídios a se estabilizarem através de interações hidrofóbicas, constituindo uma bicamada lipídica no microcanal do dispositivo.



Fonte: autor, 2018.

4.3 Análise cronoamperométrica em condições controle

Considerando que os lipídios apresentam importantes propriedades de isolantes elétricos, foram utilizados parâmetros elétricos como estratégia de avaliação do estabelecimento das bicamadas lipídicas. Para tanto, foi registrada a corrente (em nA) através da solução de KCl 1M inserida no microcanal do dispositivo durante 250 segundos, decorrente da aplicação de uma diferença de potencial de 100 mV. Foram registrados 10 pontos por cada segundo de análise, sendo cada ponto da curva de corrente a média destes. Foram avaliadas as correntes na ausência de lipídios utilizando duas soluções condutoras diferentes (KCl 1M/HEPES 5mM pH 7, NaCl 1M/HEPES 5mM pH 7). A solução de KCl 1M foi escolhida como solução condutora de trabalho para as análises posteriores.

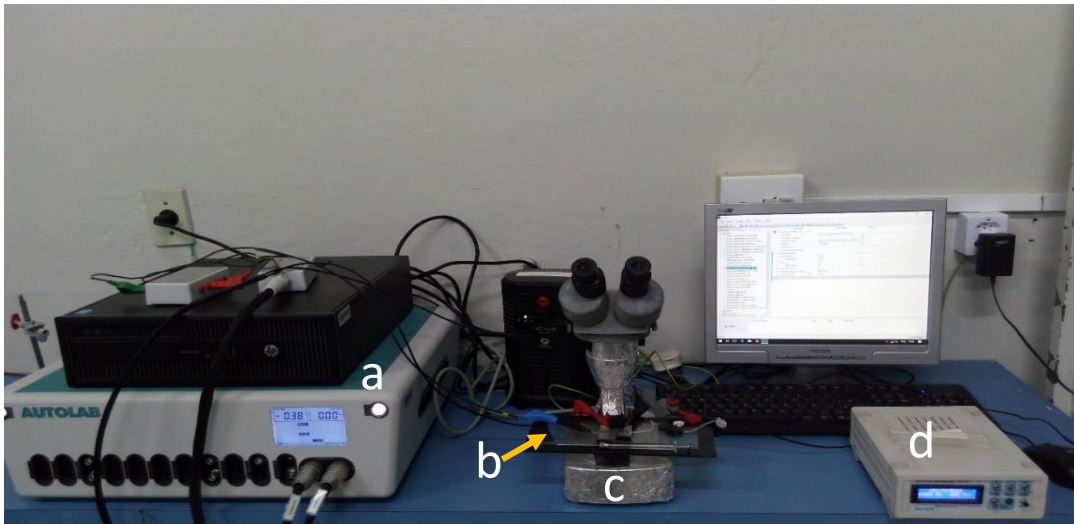
4.4 Análise cronoamperométrica após a inserção de lipídios

Para a formação de bicamadas lipídicas, foi utilizada uma mistura de lipídios composta de L- α -fosfatidilcolina/estearilamina/colesterol proporção 1:7:2 μ mol do kit de preparação de lipossomas (L4395, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, US). Os lipídios foram ressuspensos em hexano (0,5mg/100 μ L) e dispersados por ultrassom (Sonic Dismembrator 100, Fisher Scientific[®], UK) antes da sua inserção no microdispositivo. Os registros utilizando lipídios foram pausados no segundo 60, sendo injetados 1 μ L de suspensão de lipídios. Após a absorção do solvente (acompanhada por observação direta com ajuda de uma lupa de microdissecção) esperou-se 5 minutos com o intuito de permitir que a porção apolar dos fosfolipídios interagissem entre si, estabilizando a bicamada lipídica, para posteriormente continuar com o registro elétrico.

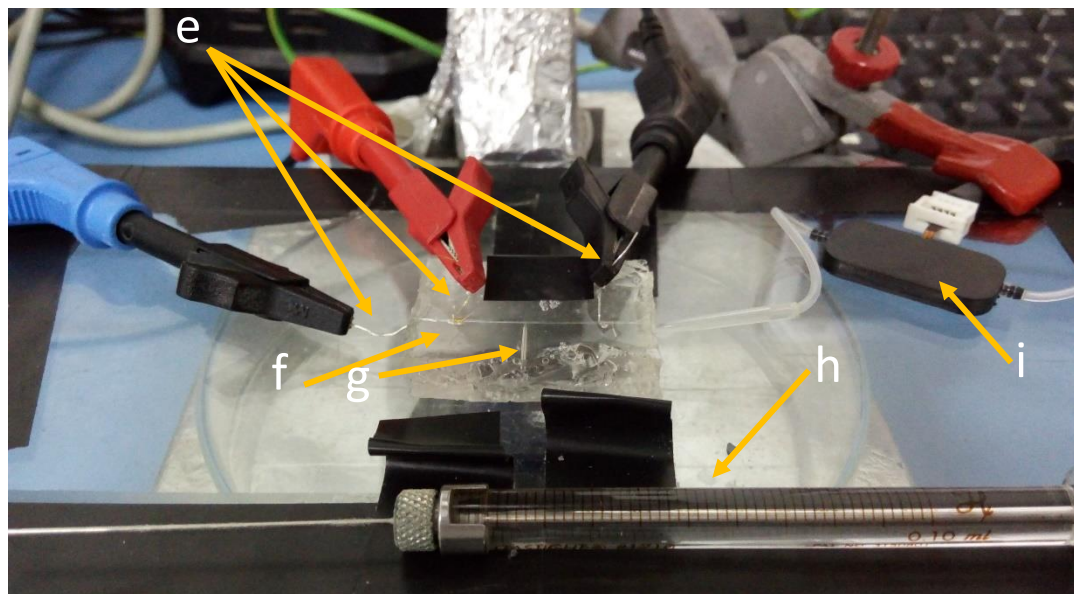
Se estabeleceu como parâmetro de formação das bicamadas lipídicas a diminuição na corrente abaixo do valor controle (± 5 nA). Todos os registros elétricos foram feitos utilizando o potenciostato PGSTAT 128N e analisados através do programa NOVA (Metrohm[®], Riverview, FL, USA). O sistema montado pode ser visto na **Figura 17**.

Figura 17: Sistema montado para análise. Figura A: (a) Potenciostato – estabelece a corrente e a voltagem pré-definidas para o experimento. (b) Suporte do microdispositivo. (c) Lupa de microdissecção – permite visualizar a absorção do solvente apolar pela matriz de PDMS. (d) Controlador da microbomba de infusão – permite acionar a microbomba de infusão. Figura B: (e) Conjunto de eletrodos. (f) microcanal central. (g) microcanal de alimentação com fosfolípidios. (h) Seringa *Hamilton* utilizada para a inserção dos fosfolípidios. (i) microbomba – alimenta o microcanal central com solução condutora. A microbomba é um recurso opcional, e pode ser substituída tranquilamente por uma seringa comum, permitindo renovar manualmente a solução condutora.

(A)



(B)



Fonte: autor, 2018.

4.5 Análise estatística.

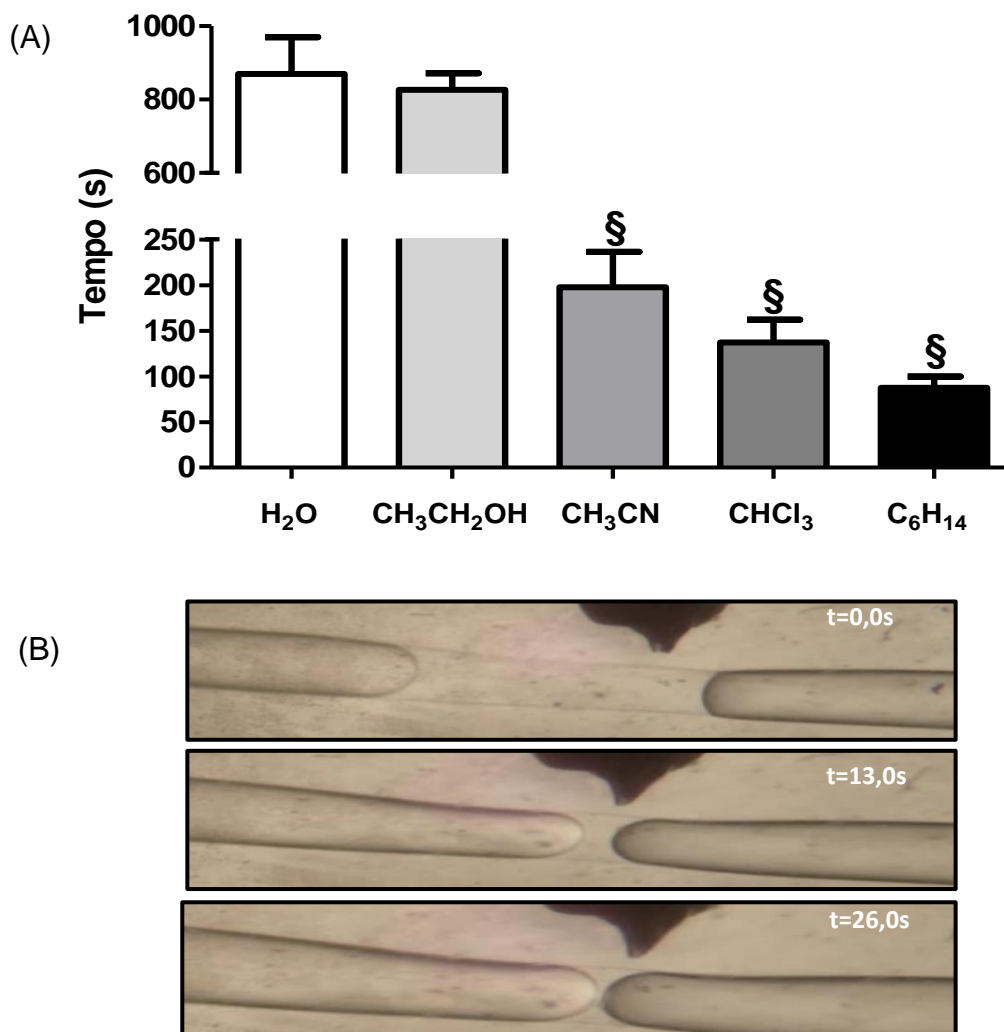
O tempo de absorção de solvente na matriz de PDMS foi analisado através de ANOVA de uma via com teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS

5.1 Os microdispositivos de PDMS permitem uma eficiente absorção de solvente orgânico, favorecendo o subsequente processo de formação de bicamadas lipídicas.

Após a fabricação dos microdispositivos, tal como se mostra na **Figura 15**, o microcanal central foi preenchido com solução de KCl 1M/HEPES 5mM pH 7 e, através do microcanal de inserção da suspensão de lipídios (perpendicular ao canal central), foi injetado 1 μ L de solvente. Dos solventes analisados, o hexano apresenta uma significativa velocidade de absorção, enquanto que água não é absorvida pela matriz de PDMS (**Figura 18A**). Adicionalmente, foi feito um registro visual absorção do hexano (**Figura 18B**). Esses dados permitiram escolher o hexano como solvente de trabalho para a suspensão dos lipídios de membrana.

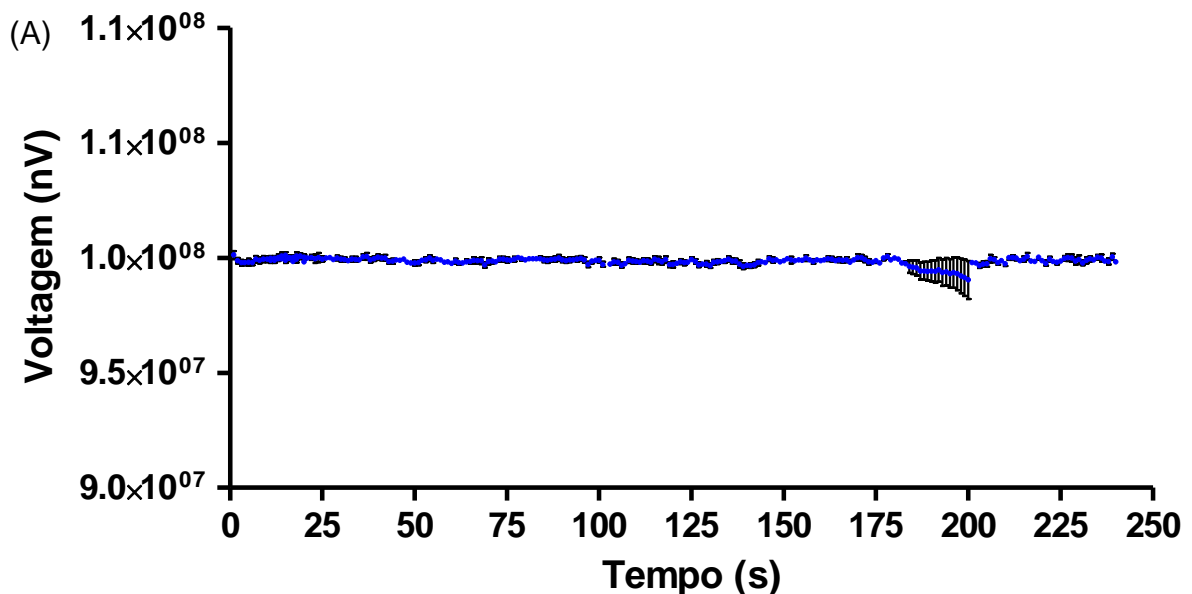
Figura 18: Absorção de solventes na matriz de PDMS dos microdispositivos desenvolvidos. (A) Tempo de absorção dos solventes no microcanal do dispositivo de PDMS à temperatura ambiente, §, $p < 0,0001$. (B) Tempo de absorção de hexano no microcanal central de PDMS.

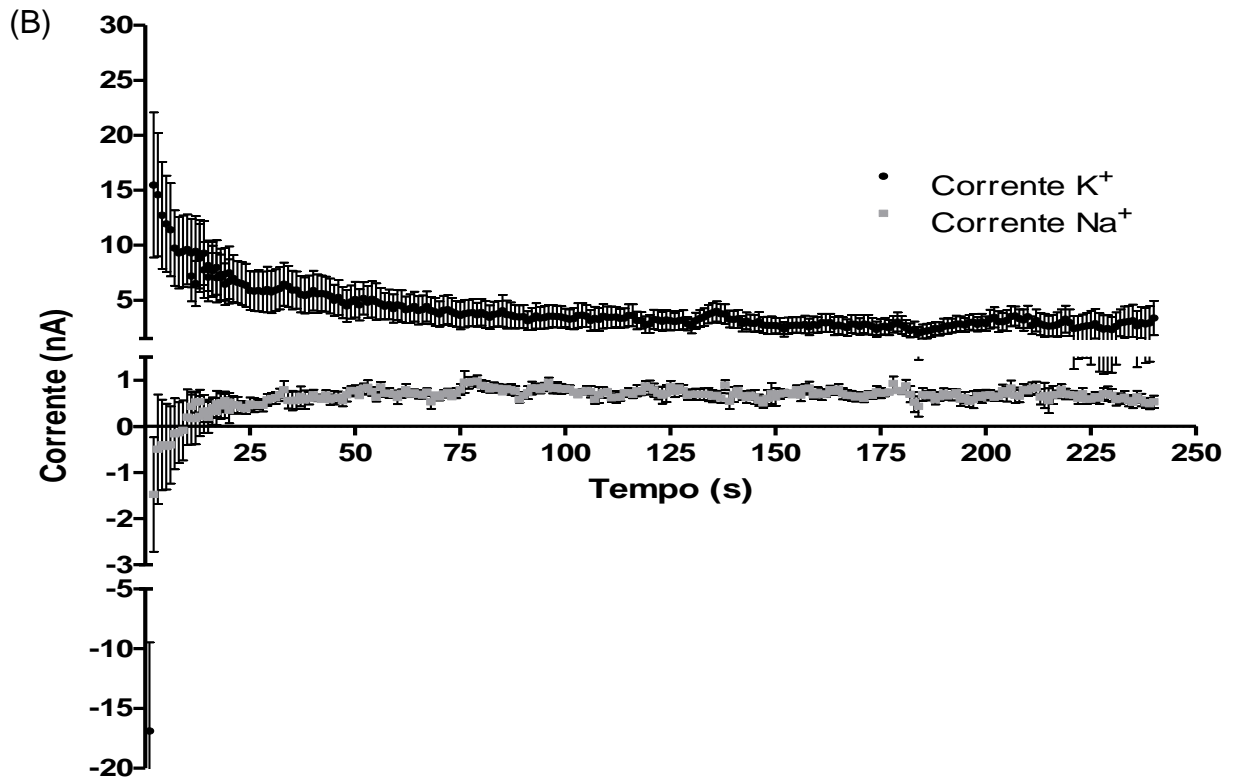


5.2 Os microdispositivos de PDMS desenvolvidos permitem registros elétricos estáveis no tempo.

Foram feitos experimentos de registro cronoamperométrico no microdispositivo desenvolvido, utilizando potenciais constantes de 100 mV (**Figura 19A**). Quando o microcanal do dispositivo foi preenchido tanto com solução de KCl, quanto de NaCl, se obtiveram registros cronoamperométricos constantes (**Figura 19B**). Os registros com KCl apresentam uma corrente média de 5 nA, enquanto que as de NaCl 0,5 nA. Esse resultado nos permitiu identificar a característica das correntes em condições controle no nosso dispositivo e selecionar o KCl como o meio condutor mais apropriado. A eleição do KCl como meio condutor nos microdispositivos atende dois objetivos. Primeiro oferece um valor médio de corrente maior que o do NaCl (neste último próximo de zero), diminuindo a possibilidade de obter registros fora do limite de sensibilidade do amplificador utilizado. Em segundo lugar, o meio tradicionalmente utilizado na literatura corresponde a KCl 1M.

Figura 19: Registro amperométrico nos microdispositivos de PDMS. (A) Diferença de potencial aplicada durante os registros cronoamperométricos. (B) Registro cronoamperométrico com o microcanal central do dispositivo de PDMS preenchido com KCl (1M/HEPES 5mM; PH 7) mostram correntes estáveis de ± 5 nA durante 250s de registro (n=22); microdispositivos preenchidos com NaCl (1M/HEPES 5mM; PH 7) conduzem de maneira estável $\pm 0,5$ nA durante 250s de registro (n=22).

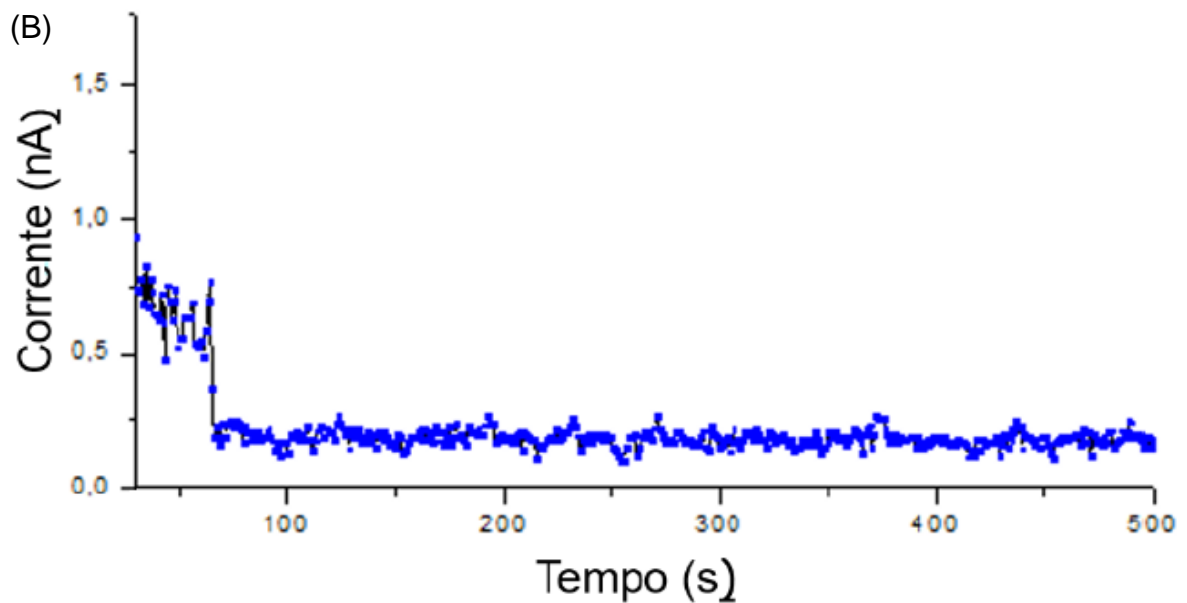
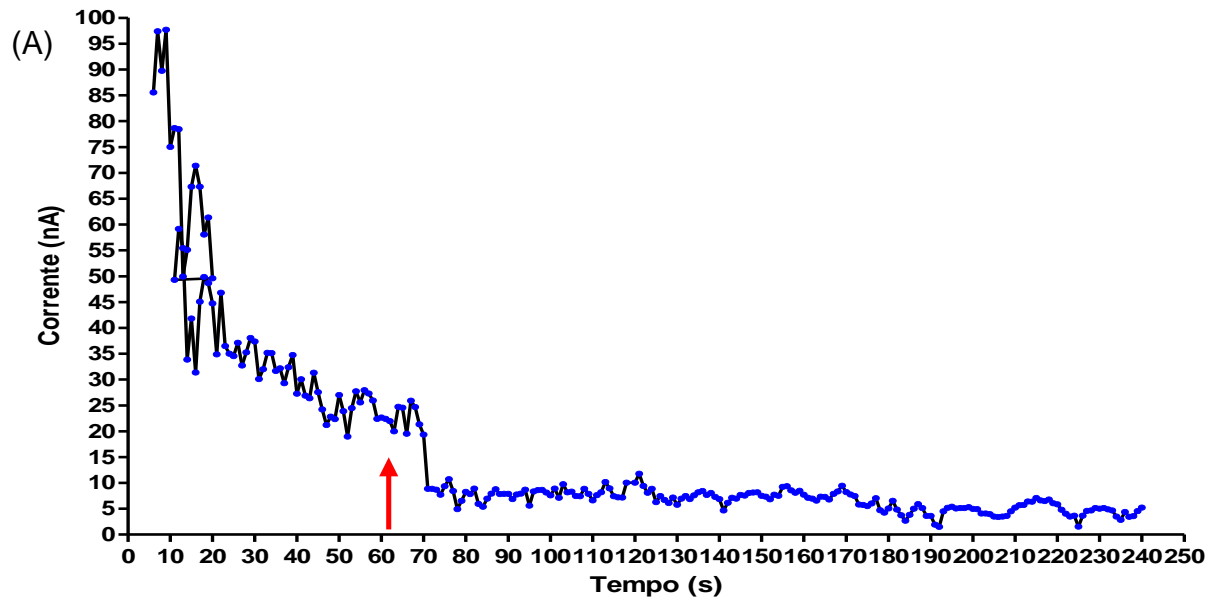




5.3 A inserção de lipídios induz a diminuição da corrente conduzida nos microdispositivos, marcando a formação de bicamadas lipídicas.

Posterior aos experimentos de registro cronoamperométrico controle, sem lipídios, foram realizados experimentos de análise de formação de bicamadas lipídicas. Para tanto, foram feitos registros elétricos nos quais, no segundo 60, foram pausadas as leituras do sistema e inseridos 1 μ L de suspensão de lipídios. Após estabilização e reinício do registro se observou uma diminuição da corrente por baixo da média do experimento (**Figura 20**). Esses resultados sugerem que no canal central do microdispositivo elaborado se estabelecem bicamadas lipídicas estáveis.

Figura 20: Registros cronoamperométricos após a inserção de suspensão de lipídios e o estabelecimento de bicamadas lipídicas. Os gráficos A e B mostram a diminuição da corrente, parâmetro esperado como critério de formação das bicamadas lipídicas. A flecha vermelha indica o momento de inserção da suspensão fosfolipídica. Ambos os registros foram realizados de maneira independente, com $n=4$.



6. DISCUSSÕES

Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo têm direcionado seus esforços ao estudo de bicamadas lipídicas artificiais. Para tanto, vários protocolos de síntese de bicamadas lipídicas foram desenvolvidos. Tais protocolos permitem a síntese de bicamadas com composições lipídicas variadas, com finalidades diversas de estudo, como a entrega eficiente e segura de fármacos ao interior celular, ou para se compreender melhor como se dão as interações entre nanopartículas e membranas, e quais seus possíveis efeitos.

Tem sido feitas associações entre sistemas microfluídicos e métodos de síntese de bicamadas lipídicas artificiais, todavia, estes sistemas são complexos, requerem de aparelhagem técnica sofisticada e muitas vezes criam bicamadas lipídicas não tão estáveis. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo primordial o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico associado a parâmetros de detecção eletroquímica (cronoamperometria), que apresente as seguintes características: simplicidade e de rápida construção, alta durabilidade, construído a partir de materiais de baixo custo, com alto grau de sensibilidade e funcionalidade e que permita a síntese bicamadas lipídicas artificiais estáveis em seu interior, podendo servir, desta forma, como ferramenta poderosa para estudos envolvendo bicamadas lipídicas.

A associação de bicamadas lipídicas a sistemas capilares de microfluídica representa uma nova estratégia de estudo. No entanto, a inserção de misturas de lipídios e estabelecimento de bicamadas lipídicas não é um processo simples, uma vez que o requisito fundamental é a estabilização de uma bicamada através de interações hidrofóbicas entre as cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios constituintes. Deste modo, esta foi a primeira dificuldade encontrada: a eliminação do solvente orgânico utilizado para solubilizar os fosfolipídios. A solução para esse problema foi encontrada no polidimetilsiloxano (PDMS). Esse material permite a absorção com alta eficiência de solventes apolares (ZHOU; ELLIS; VOELCKER, 2010). Para tanto, desenhamos um molde que incorporasse todas as estruturas necessárias para a construção de um dispositivo de microfluídica: um microcanal central, dois ou mais canais alimentadores perpendiculares a este para inserção de

lipídios e o sistema de eletrodos acoplados (fixos) ao microcanal central e incorporados à matriz de PDMS, tal como se mostra na **Figura 15**.

Sendo a dificuldade principal a eliminação do solvente apolar que estabiliza a suspensão lipídica utilizada, foi realizado um estudo do tempo de absorção de diversos solventes orgânicos pela matriz polimérica de PDMS (**Figura 18**). O hexano representou ser a melhor alternativa, uma vez que a sua velocidade de absorção pelo PDMS é a mais apropriada para permitir o estabelecimento das bicamadas lipídicas dentro do microcanal central.

Considerando que os lipídios suspensos em hexano podem se organizar em forma de lipossomas antes mesmo de serem inseridos no microcanal central, os lipídios foram sonicados para garantir a sua dispersão. Por sua vez, o fato da água não ser absorvida pelo PDMS garante que não existam mudanças de concentração da solução condutora de KCl, evitando oscilações elétricas durante os registros, desta maneira, evitando erros de interpretação ou de falsos positivos. De acordo com a lógica exposta na **Figura 16**, a absorção do hexano, solvente estabilizador das porções hidrofóbicas dos fosfolipídios (L- α -fosfatidilcolina), permite com que os grupos polares fiquem expostos à solução aquosa de KCl e, as cadeias de hidrocarboneto, se estabilizam através de interações hidrofóbicas, constituindo uma bicamada lipídica. Esse procedimento já foi testado com anterioridade e com sucesso em dispositivos semelhantes, no entanto, dotados de sistemas automatizados de injeção de lipídios (MALMSTADT, et al., 2006). Nesse sentido, o modelo de dispositivo microfluídico desenvolvido neste trabalho oferece uma alternativa de trabalho simples.

Considerando que os lipídios se comportam como bons isolantes elétricos, é possível fazer dois tipos de medidas elétricas para determinar a presença de bicamadas lipídicas: registros cronoamperométricos e análise de capacitância. No presente projeto foi utilizada apenas a primeira estratégia de análise eletroquímica. Para tanto, foram feitos registros tanto em condição controle quanto com lipídios aplicando como diferença de potencial 100 mV (**Figura 19A**). Os experimentos controle apresentaram correntes estáveis nos mais de 20 experimentos independentes, sendo a corrente basal, em média, de 5nA (**Figura 19B**). Esses registros, embora pouco significativos desde o ponto de vista do estudo das bicamadas lipídicas, proveem de informação valiosa e fundamental que permitem

caracterizar as condições basais dos registros elétricos nos dispositivos protótipo fabricados no contexto deste projeto.

O passo seguinte foi analisar os registros elétricos após o estabelecimento de bicamadas lipídicas. Para tanto foram injetados 1 μ L da suspensão lipídica previamente sonicada no microcanal central do dispositivo de PDMS. A inserção de lipídios requer de um procedimento cuidadoso desde que existe alta possibilidade da formação de bolhas de ar. Estas criam regiões dentro do microcanal desprovidas de solução condutora, ocasionando o aparecimento de diminuições na corrente através do sistema, de maneira que facilmente podem induzir a obtenção de falsos positivos. Para solucionar esse problema, a seringa do tipo *Hamilton* é carregada de suspensão de lipídios e fixada ao microdispositivo e, durante o processo de injeção até a total absorção do solvente pelo PDMS é feito um acompanhamento sob a lupa de microdisseção. Considerando que o hexano é o meio que estabiliza a porção hidrofóbica dos fosfolipídios, o tempo entre a total absorção do hexano e o estabelecimento da bicamada lipídica corresponde a um momento particularmente crítico. Registros elétricos nos quais foram reiniciadas a condução elétrica através do sistema imediatamente após a absorção do solvente, não se observou a formação de um selo elétrico e diminuição da corrente, possivelmente pela perda da estrutura da nascente bicamada lipídica.

Considerando tal situação, foi incorporado ao protocolo inicial um tempo adicional de espera após a absorção do hexano pela matriz de PDMS. Dita espera objetiva favorecer a estabilização da bicamada lipídica, através da formação de interações hidrofóbicas entre as cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios, assim como pela formação de ligação de hidrogênio entre os grupos polares dos mesmos e destes com a água da solução condutora. Após a incorporação desse critério de estabilização foram obtidos registros pilotos com uma importante diminuição da condução de corrente ao longo do sistema (**Figura 20**). Esses resultados evidenciam a formação de bicamadas lipídicas artificiais perpendiculares ao microcanal central do dispositivo. Nesse sentido, estamos frente a resultados de suma importância e de grande interesse para estudos subsequentes que envolvam bicamadas lipídicas artificiais.

Uma vez que as bicamadas lipídicas se comportam como isolantes elétricos reduzindo a corrente média do sistema, qualquer tipo de perturbação em sua estrutura decorrentes de interações com nanopartículas, seja induzindo a formação de um poro transitório ou mesmo destruindo-a, levará a uma recuperação da corrente a níveis observados na situação controle. Portanto, temos nas nossas mãos uma estratégia simples de estudo para avaliar, por exemplo, se um carregador de fármacos escolhido interfere negativamente com as bicamadas lipídicas. Temos, portanto, um parâmetro eletroquímico para avaliar a segurança de utilizar dito material.

7. CONCLUSÕES

Este estudo sugere que o dispositivo microfluídico desenvolvido oferece condições apropriadas para o estabelecimento de bicamadas lipídicas artificiais estáveis. Tal dispositivo, pela sua fácil construção e manipulação, oferece uma estratégia técnica que permite avaliar de maneira simples, rápida, com alta sensibilidade e baixo consumo de reagentes, se os parâmetros elétricos basais são alterados, indicando uma perturbação na estrutura da bicamada. Desta feita, temos em mãos uma ferramenta poderosa que poderá servir em estudos futuros que objetivem avaliar os possíveis danos na estrutura de bicamadas sintéticas de composições lipídicas variadas causados pela interação destas com nanopartículas ou complexos nanopartícula-fármaco.

REFERÊNCIAS

ABDI -AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL ABDI. Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. **Unicamp/Funcamp**, p. 52, 2011.

AGHDAEI, S. et al. Formation of artificial lipid bilayers using droplet dielectrophoresis. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 10, p. 1617, 2008.

ARAÚJO, L. M. P. Análise de detecção de fluorescência para aplicação em sistemas de diagnóstico em saúde. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

ARISTIZÁBAL, S. L. Desenvolvimento de sistemas Lab-on-a-Chip para análises em biofísica celular. **Tese de Doutorado do Curso de Engenharia Elétrica, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo**, 2012.

BATISTA, C. M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas : Estado da arte. v. 43, 2007.

CAMPBELL, M, K; FARRELL, S. O. **BIOQUÍMICA**. Tradução da 8ª ed norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

CONTINI, C. et al. Nanoparticle–membrane interactions. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 13, n. 1, p. 62–81, 2018.

ELMQVIST, D. et al. An electrophysiological investigation of neuromuscular Transmission in myasthenia gravis. 174. Great Britain: J. Physiol, 1964.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839–862, 2005.

FEIGENSON, G. W. G. Phase boundaries and biological membranes. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 36, p. 63–77, 2007.

HELLBERG, D. et al. Bursting and spreading of liposomes on the surface of a static mercury drop electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 4, p. 305–309, 2002.

HERNÁNDEZ, V. A.; SCHOLZ, F. The Electrochemistry of Liposomes. **Israel Journal of Chemistry**, v. 48, n. 3–4, p. 169–184, 2008.

HOHENDORFF, R. VON; ENGELMANN, W.; OSHIRO, M. DE L. As nanotecnologias no meio ambiente do trabalho: a precaução para equacionar os riscos do trabalhador. **Cadernos Ibero-Americanos de Direito Sanitário**, v. 2, n. 2, p. 668–683, 2014.

JUNG, W. et al. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 46–57, 2014.

KAPOOR, R. et al. Preparation of Artificial Bilayers for Electrophysiology Experiments. **Journal of Visualized Experiments**, n. 20, p. 2008, 2008.

KRNJEVIC, k. MILEDI, R. Failure of neuromuscular propagation in rats. 140. Canberra: J. Physiol, 1958.

LUPPA, P. B. et al. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 887–898, 2011.

MALMSTADT, N. et al. Automated formation of lipid-bilayer membranes in a microfluidic device. **Nano Letters**, v. 6, n. 9, p. 1961–1965, 2006.

MATIAS, A. B. Desenvolvimento e caracterização de sensores quimicamente modificados para análise de sulfeto. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação de Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Porto Alegre, 2014.

OLIVEIRA, L. S. Desenvolvimento de um sistema eletroquímico de análise por injeção em fluxo para detecção de cocaína. DISSERTAÇÃO (Mestre em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, 2011.

PASCALE R. LEROUEIL, SEUNGPYO HONG, ALMUT MECKE, JAMES R. BAKER JR., BRADFORD G. ORR, M. M. B. H.; PASCALE R. LEROUEIL, SEUNGPYO HONG, ALMUT MECKE, JAMES R. BAKER JR., BRADFORD G. ORR, M. M. B. H. Nanoparticle Interaction with Biological Membranes. **Ac Chem Res**, v. 40, n. 5, p. 335–342, 2007.

QUINTINO, M. S. M. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas. TESE. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

RAHAL, F. A. S. Desenvolvimento de sistemas de bombeamento microfluídicos de fluxo bidirecional: prova de conceito. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Programa Interdisciplinar de Pós Graduação em Engenharia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

RECKTENWALD, D. J.; MCCONNELL, H. M. Phase equilibria in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. **Biochemistry**, v. 20, n. 15, p. 4505–4510, 1981.

ROMANO-FONTES, L. G. et al. Fatty acid transport across lipid bilayer planar membranes. **Lipids**, v. 35, n. 1, p. 31–34, 2000.

ROSSI, G.; MONTICELLI, L. Gold nanoparticles in model biological membranes: A computational perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2380–2389, 2016.

SCHIANTI, J. Sistemas microfluídicos aplicados na produção de micro e nanopartículas. **Teses.Usp.Br**, 2012.

SINGER, S. J. J.; NICOLSON, G. L. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.

SIONTOROU, C. et al. Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. **Membranes**, v. 7, n. 3, p. 38, 2017.

TERRY, S. C.; HERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v. 26, n. 12, p. 1880–1886, 1979.

VAN MEER, G. Cellular lipidomics. **EMBO Journal**, v. 24, n. 18, p. 3159–3165, 2005.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008.

VOET, D; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ZHANG, H. et al. Cooperative transmembrane penetration of nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

ZHOU, J.; ELLIS, A. V.; VOELCKER, N. H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 2–16, 2010.

ZÚÑIGA-HERTZ, JP; KASSAN, A; MORALES, S; PATEL HH. Biological membranes composition: from molecular organization to physical and functional implications. *Trabalho em processo de submissão*. 2018.