



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE MATERIAIS

KARINA MARIA DE SOUZA SILVA

**FLUIDO IMPRIMÍVEL BIOINSPIRADO NO MECANISMO DE IRIDESCÊNCIA DE
PEIXES DO GÊNERO *Paracheirodon***

Recife
2020

KARINA MARIA DE SOUZA SILVA

**FLUIDO IMPRIMÍVEL BIOINSPIRADO NO MECANISMO DE IRIDESCÊNCIA DE
PEIXES DO GÊNERO *Paracheirodon***

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Materiais não metálicos

Orientador: Prof. Dr. Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Falcão

Coorientador Externo: Prof. Dr. Fabricio Oliveira Souto

Recife
2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

S586f Silva, Karina Maria de Souza
Fluido imprimível bioinspirado no mecanismo de iridescência de peixes do gênero *paracheirodon*/ Karina Maria de Souza Silva. – 2020.
83f., il., fig., tab.

Orientador: Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Materiais não metálicos. 2. Guanina. 3. Bioinspiração. 4. Impressão DoD de Materiais. I. Oliveira, Petrus d'Amorim Santa Cruz. (orientador) II. Título.

620.19 CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2021-34

KARINA MARIA DE SOUZA SILVA

FLUIDO IMPRIMÍVEL BIOINSPIRADO NO MECANISMO DE IRIDESCÊNCIA DE PEIXES DO GÊNERO PARACHEIRODON

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 12/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Ana Carla Asfora El-Deir (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Severino Alves Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Petrus Santa-Cruz, meu querido orientador, pelos ensinamentos e incentivos, os quais foram imprescindíveis para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Fabrício Oliveira Souto, por suas contribuições científicas, que me proporcionaram o aprimoramento e evolução dos meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante a pesquisa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), por viabilizarem esse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais pela oportunidade e confiança em mim depositadas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais pelas contribuições durante o curso.

Aos amigos do doutorado, que com prazer compartilhei esse tempo e os quais pretendem encontrar futuramente como colegas de profissão.

À minha família que mesmo sem assimilar a relevância de cada projeto, me apoiaram em cada momento de minha vida.

A Igor Milanez, que esteve sempre ao meu lado, compartilhando minhas lutas e vitórias, me contagiando com sua alegria, tranquilidade, e principalmente paciência, com o seu amor e carinho.

Aos meus amigos do Laboratório LandFoton, especialmente a Sueli Tavares e a Carolina, que me ensinaram os valores e a força que uma equipe pode formar.

E sem dúvidas agradecer àqueles que me deram à luz, meus eternos amados pais, que muitos fizeram e continua a fazendo pela minha vida, mãe e pai guerreiros e amorosos que sempre lutaram com todas as forças para me proporcionar sempre o melhor, que me mostraram que nunca se deve desistir. Serei eternamente grata pelo amor, carinho e intensa dedicação, sem vocês não seria nada.

Àqueles cujos ensinamentos desejo gravar cada vez mais forte em meu coração, que guia cada passo meu, a quem entrego todos os meus anseios e receios, dúvidas e decisões, alegrias e tristezas, e principalmente minha fé... Deus!

RESUMO

Esta tese teve como objetivo o desenvolvimento de fluidos imprimíveis bioinspirados em mecanismos de iridescência de peixes do gênero *Paracheirodon*, endêmico da Bacia Amazônica, para impressão por tecnologia de Drop-on-Demand (DoD), utilizando-se uma impressora de materiais. A iridescência da faixa lateral desses peixes apresenta variação de cor em função de estímulos que provocam mudanças na distribuição de nanoestruturas presentes em células iridóforas, identificadas como cristais de guanina. Foram realizados experimentos envolvendo estudo comportamental e de análise da banda lateral dos peixes alimentados com náuplios de artêmias salinas utilizadas para vetorização de fármacos com atividade neurológica, inicialmente a Olanzapina. Apesar da literatura apontar como causa da variação de cor da faixa lateral desses peixes as variações de distância entre os planos cristalinos da guanina devido à variação da pressão osmótica no interior dos iridóforos em função da abertura e fechamento de canais iônicos, imagens de microscopia de força atômica e do comportamento da cor nos experimentos e após óbito do animal mostraram que há indícios de que a causa da cor parece estar associada a mecanismos de ordem-desordem dos cristais de guanina atuando como cristais fotônicos. Com base nesta observável, o principal objetivo deste trabalho foi a otimização de fluidos à base de guanina, para cristalização após impressão camada por camada (LbL, layer-by-layer) por tecnologia DoD. Tentou-se cultivar as células iridóforas de peixes da espécie *Paracheirodon axelrodi*, iniciando-se com a dissociação celular da sua faixa lateral, e foi constatada a complexidade para o cultivo das células iridóforas utilizando-se uma incubadora de CO₂. Com as dificuldades do cultivo das células para utilização em fluidos imprimíveis, decidiu-se o desenvolvimento de fluidos bioinspirados no mecanismo de iridescência desses peixes. Para isso, foram estabelecidas as condições ideais para a composição de um fluido transportador de núcleos de cristalização de guanina, otimizado pela avaliação das suas coordenadas em relação à região de imprimibilidade, através do cálculo de parâmetros de microfluídica, como os Números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh), definindo-se parâmetros de impressão a partir do monitoramento de imagens de formação das gotas por câmera estroboscópica *drop watcher*, embarcada na impressora DoD. A partir de guanina comercial em pó, foram sintetizados e caracterizados por MEV e DRX microcristais de guanina, e os menores filtrados foram utilizados como parte ativa na composição do fluido a ser impresso, ajustado com monoetilenoglicol (MEG). Os filmes impressos tiveram os cristais crescidos em processo pós-impressão, apresentando iridescência.

Palavras-chave: Guanina. Bioinspiração. Impressão DoD de Materiais.

ABSTRACT

This thesis aimed at the development of printable fluids bioinspired in mechanisms of Iridescence of fishes from the *Paracheirodon* genus, endemic of the Amazon Basin, for printing by Drop-on-Demand (DoD) technology, using a material printer. The iridescence of the lateral band of these fishes presents color variation as a function of stimuli that cause changes in the distribution of nanostructures present in iridophore cells, identified as guanine crystals. Experiments were performed involving a behavioral study and analysis of the lateral band of fish fed with nauplii of saline artemias used for vectorization of drugs with neurological activity, initially olanzapine. Although the literature points out as the cause of the color variation of the lateral band of these fish the variations of distance between the crystalline planes of guanine due to the variation of osmotic pressure inside the iridophores as a function of the opening and closing of ionic channels, images of atomic force microscopy and the behavior of color in the experiments and after death of the animal showed that there are indications that the cause of color seems to be associated with an order-disorder mechanisms of guanine crystals acting as photonic crystals. Based on this observation, the main objective of this work was the optimization of a guanine-based fluid for crystallization after the printing layer-by-layer (LbL, layer-by-layer) by DoD technology. An effort was made to cultivate the iridophore cells of fish of the *Paracheirodon axelrodi* species, starting with the cell dissociation of its lateral band, and the complexity for the cultivation of iridophore cells using a CO₂ incubator was verified. Due to the difficulties of cell culture for use in printable fluids, it was decided to develop fluids bioinspired in the iridescence mechanism of these fish. For this purpose, the ideal conditions were established for the composition of a fluid carrier of guanine crystallization nuclei, optimized by the evaluation of its coordinates concerning the printability region, through the calculation of microfluidic parameters, such as the Reynolds (Re), Weber (We) and Ohnesorge (Oh) numbers, defining print parameters from the monitoring of the droplet formation images by Drop Watcher stroboscopic camera, embedded in the DoD printer. From commercial guanine powder, it was synthesized and characterized by MEV and DRX microcrystals of guanine, and the smallest ones were filtered and used as an active part in the composition of the fluid to be printed, adjusted with monoethylene glycol (MEG). The printed films had the crystals grown in a post-printing process, showing iridescence.

Keywords: Guanine. Bioinspiration. DoD Materials Printing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclos de Kondratiev	16
Figura 2 –	Ondas de Inovação	16
Figura 3 –	<i>Colocasia esculenta</i> ‘black magic’ em diferentes estágios de maturação, e respectivas micrografias (MEV Shimadzu SS-550)	18
Figura 4 –	Mostra o material inteligente em bioinspirados na mecânica dos raios da nadadeira do peixe	19
Figura 5 –	Borboleta do gênero <i>Morpho</i> (a), Macroscopias das estruturas fotônicas (b, c). À direita sombras bioinspiradas da linha LUCI	20
Figura 6 –	Algumas espécies que apresentam cores iridescentes produzidas em estruturas naturais	28
Figura 7 –	Bacia do Rio Negro onde se encontra o peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> , estado do Amazonas	30
Figura 8 –	<i>Paracheirodon axelrodi</i> (Schultz, 1956) (A) e outras espécies do gênero: <i>Paracheirodon innesi</i> (Myers, 1936) (B); <i>Paracheirodon simulans</i> (Géry, 1963) (C)	30
Figura 9 –	Cristais da guanina anidra e monihidratada	32
Figura 10 –	Diagrama mostrando o princípio de operação de uma impressora CIJ	34
Figura 11 –	Impressão <i>DoD</i> , com (a) atuador térmico e (b) atuador piezoelétrico	35
Figura 12 –	Variáveis para controle da impressão <i>DoD</i>	36
Figura 13 –	a) Gráficos mostrando as regiões em que os valores dos números de Weber (<i>We</i>), Reynolds (<i>Re</i>) e Ohnesorge (<i>Oh</i>) resultam em fluidos imprimíveis em impressoras <i>DoD</i> , e b) monitoramento dos parâmetros <i>Re</i> e <i>Z</i> por aplicativo on-line	37

Figura 14 –	Waveform Editor do software de controle embarcado na DMP 2831	43
Figura 15 –	Etapas realizadas para a dissociação das células da faixa lateral do peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> (A, B, C, D, E e F)	45
Figura 16 –	Citômetro (BD Accuri C6 Sampler. BD Bioscience)	46
Figura 17 –	Garrafas com a solução e a suspensão das células (A) e incubadora (ESCO) com a temperatura de 28°C com 5% de CO ₂ (B)	46
Figura 18 –	Microscópios ópticos (A) Microscópio Nikon (Eclipse E600 POL) e (B) Microscópio invertido	47
Figura 19 –	Imagens de microscopia ótica na guanina comercial	50
Figura 20 –	Imagens de microscopia ótica da cristalização em pH 14, com regiões iridescentes destacadas com círculos vermelhos	51
Figura 21 –	Imagens MEV dos cristais de guanina obtidos a partir de soluções de 20 mg (A), 70 mg (B) e 100 mg (C) de guanina em pH 14	51
Figura 22 –	Dupla desprotonação da guanina em pH 14	52
Figura 23 –	Imagens de microscopia ótica da cristalização em pH 2	53
Figura 24 –	Tautômeros da guanina formados em pH 2	53
Figura 25 –	Microscopias óticas dos cristais de guanina obtidos em pH 10	54
Figura 26 –	Imagens MEV dos cristais de guanina sintetizados em pH 10	54
Figura 27 –	Imagens MEV da guanina comercial em pó, utilizada como produto de partida	55
Figura 28 –	DRX da guanina comercial e cristalizações em pH 10, e pH 14	56

Figura 29 –	Coordenada (Re, Z) do fluido da guanina comercial para o presente trabalho, calculada conforme descrito na figura 13 ($Z=1/Oh$)	59
Figura 30 –	Fluido 4.5:0.5 depositado sobre substrato de silicato de sódio	60
Figura 31 –	Imagem de microscopia óptica do sistema 4.5:0.5 impresso por DoD	60
Figura 32 –	Fluido 2.5:2.5 impresso por tecnologia <i>DoD</i> sobre substrato de vidro	61
Figura 33 –	Imagem de microscopia óptica dos microcristais de guanina após etapas de nucleação-crescimento, obtidos via impressão <i>DoD</i>	61
Figura 34 –	Visualização das células totais e iridescentes obtidas após dissociação tecidual da faixa lateral do peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> . Células totais após dissociação tecidual, SSC-A representa a complexidade celular e FSC-A o tamanho/volume celular (A); estratégia de análise de células iridescentes, canal FL1 (verde) e canal FL2 (laranja) (B); Células totais após dissociação tecidual e uso de gradiente de Percoll, SSC-A representa a complexidade celular e FSC-A o tamanho/volume celular (C); estratégia de análise de células iridescentes, após isolamento por gradiente de percoll, canal FL1 (verde) e canal FL2 (laranja) (D)	63
Figura 35 –	Estratégia de visualização de células iridescentes, utilizada por Higton e colaboradores, a partir da fluorescência emitida por estas células	64
Figura 36 –	Análise das células após dissociação celular da faixa lateral. Visualização das células totais da faixa lateral do peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> , aumento de 100x vezes (A) e análise da viabilidade celular colorida com solução de Azul de Tripán, 98% de células viáveis (B)	65
Figura 37 –	Cultura das células totais extraídas da faixa lateral do peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> . Visualização das células totais em garrafa de cultura através do microscópio invertido (Olympus)	66
Figura 38 –	Acompanhamento do cultivo celular das células totais obtidas da faixa lateral do peixe. Garrafa mostra o meio consumido pelas células a dois dias de cultura (A); expansão celular após uma semana de cultivo (B); visualização das células no microscópio após uma semana de cultivo (C)	67
Figura 39 –	Primeiras imagens obtidas por RMN do peixe <i>Paracheirodon axelrodi</i> , analisado três profundidades de corte longitudinais diferentes, sendo a terceira, mais próxima do tecido subepitelial onde se encontram os iridóforos da banda lateral nanoestruturada	76

Figura 40 –	Aumento da pressão osmótica nos iridóforos levaria o espaçamento de 160 nm para 200 nm entre as palhetas de cristais de guanina, alterando a cor da iridescência	77
Figura 41–	Modelos para iridescência dos peixes <i>Paracheirodon</i> (a) Modelo “veneziana” e (b) Modelo “acordeon”	78
Figura 42 –	AFM do tecido subepitelial da banda lateral do <i>Paracheirodon axelrodi</i>	78
Figura 43–	Imagem do <i>Paracheirodon axelrodi</i> com desaparecimento da iridescência azul associada aos iridóforos, após óbito. A cor vermelha do ventre é atribuída à absorção, por pigmento de cromóforos	79
Figura 44 –	superfície dos orbitais HOMO e LUMO da guanina anidra calculada pelo método DFT B3LYP/6-31++G(d,p)	80
Figura 45 –	Representação do sistema guanina anidra simulado por dinâmica molecular	81
Figura 46 –	RMSD calculado para o sistema simulado incluindo a guanina anidra e solvente	81
Figura 47 –	RDF da guanina em relação a água (a) e suas próprias moléculas (b)	82
Figura 48 –	Exposição dos náuplios de artêmias à olanzapina para vetorização do fármaco aos peixes do gênero <i>Paracheirodon</i> para análise comportamental objetivando bioinspiração de dispositivos imprimíveis	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros otimizados para os cartuchos e ciclos de limpeza para os fluidos desenvolvidos	58
Tabela 2 –	Concentrações dos fluidos contendo 4.5 a 2.5 mL da solução de guanina pH 10 + X (mL) de monoetilenglicol (MEG)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
CIJ	Jato de tinta contínuo
DoD	Drop-on-Demand
DRV	Difração de Raios-X
FBS	Soro Feral Bovino
LbL	layer-by-layer
L-15	Meio Leibovitz
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NIT	Núcleo de Inovação Tecnológica
Ob	Número de Ohnesorge
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino
Re	Número de Reynolds
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
We	Número deWeber

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	24
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
3.1	LUZ E CORES	25
3.2	ESTRUTURAS FOTÔNICAS.....	26
3.3	GÊNERO <i>PARACHEIRODON</i>	29
3.4	CRISTAIS DE GUANINA	31
3.5	TECNOLOGIAS <i>INKJET</i>	33
3.5.1	Mecanismos <i>CIJ</i> e <i>DoD</i> para geração de gotas para impressão	33
3.5.2	Atuadores	33
3.5.3	Sistema <i>CIJ</i>- continuous inkjet	34
3.5.4	Sistema Drop-on-Demand	35
3.5.5	Parâmetros para o desenvolvimento do fluido de impressão	35
3.5.6	Fluidos imprimíveis	36
3.6	CULTURA DE CÉLULAS	38
3.6.1	Tipos de culturas	38
3.6.2	Células primárias, células estabelecidas e células transformadas.....	39
3.6.3	Aplicações dos cultivos celulares	40
3.6.4	Cultivo de células de peixes.....	41
4	EXPERIMENTAL.....	42
4.1	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA	42
4.1.1	Cristalização da guanina em meios ácidos e básicos.....	42
4.1.2	Preparação do Fluidos.....	42
4.1.3	Substrato	42
4.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMPRESSÃO - DMP 283.....	42
4.3	DISSOCIAÇÃO CELULAR.....	44
4.4	CULTIVO DE CÉLULAS	46
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	47
4.5.1	Microscopia ótica e invertida	47

4.5.2	Difração de Raios X (DRX).....	47
4.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
4.5.4	Citometria de fluxo.....	48
4.5.5	Metodologia computacional.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	PREPARAÇÃO DE FLUIDO PARA CRISTALIZAÇÃO DA GUANINA APÓS IMPRESSÃO DoD.....	56
5.1.1	Fluido de proporção 4.5:0.5 (Guanina/MEG)	59
5.1.2	Fluido de proporção 2.5:2.5	60
5.2	CULTURA CELULAR DO PEIXE <i>PARACHEIRODON AXELRODI</i> ..	62
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A - IMAGEAMENTO POR RMN	76
	ANEXO B - MECANISMOS PROPOSTO PARA IRIDESCÊNCIA DA BANDA LATERAL DOS GENERO PARACHEIRODON	77
	ANEXO C - MÉTODOS COMPUTACIONAIS E CRISTAIS DE GUANINA	80
	ANEXO D - ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS PEIXES, INICIADO COM A DROGA OLANZAPINA	83

1 INTRODUÇÃO

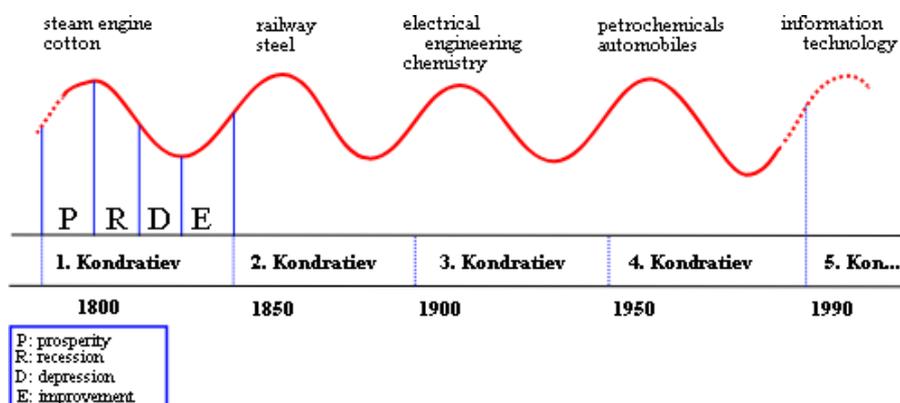
A bioinspiração procura um conjunto de soluções que se pareçam ou contenham elementos que resultaram da evolução biológica das espécies e que permitam otimizar soluções inovadoras para os problemas em questão, de forma mais ampla que a biomimética, que trata da replicação exata de processos biológicos.

Processos e materiais bioinspirados vêm sendo incorporados cada vez mais em novas tecnologias, e como a evolução das espécies biológicas resultou em um alto nível de otimização da eficiência para cada meio, inclusive para se garantir sobrevivência até em ambiente muito hostis, como no caso dos organismos extremófilos, a inspiração na natureza pode resultar em um salto tecnológico, previsto na atual onda de inovação tecnológica.

Atualmente estamos vivendo a quarta revolução industrial, conhecida por Indústria 4.0, caracterizada por “fábricas inteligentes” com estruturas modulares, incluindo conceitos como o de “manufatura aditiva” (AM) e Internet das Coisas (IoT), mas do ponto de vista das tecnologias envolvidas nessas revoluções, estamos na sexta onda de inovação tecnológica. As ondas de inovação descritas atualmente originaram-se de ciclos propostos em 1922 pelo economista russo Nikolai Kondratiev, na época vistos com períodos de mesma largura temporal, em torno de 50 anos (Figura 1).

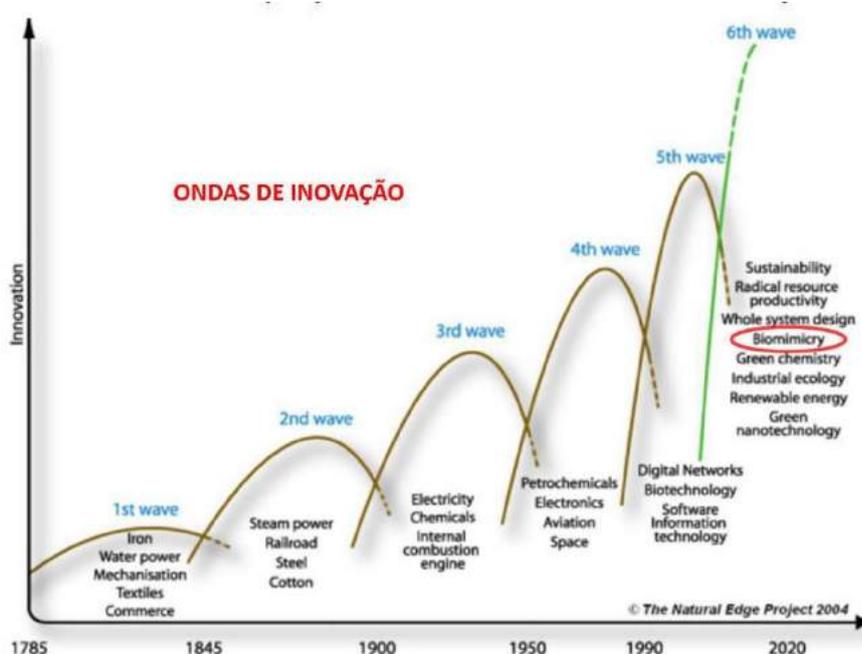
Numa visão mais atual, percebe-se que as ondas de inovação estão com ciclos temporais cada vez mais curtos, e neste ano de 2020 estamos chegando no ápice de um ciclo de inovação pautado pela sustentabilidade, envolvendo tecnologias limpas, biomimética e de forma mais ampla, bioinspiração, com vistas a um crescimento sustentável. Trata-se da 6ª Onda de Inovação, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 1– Ciclos de Kondratiev



Fonte: The Natural Edge Project - The Natural Advantage of Nations (Vol.1): Business Opportunities, Innovation and Governance in the 21th Century.

Figura 2– Ondas de Inovação



Fonte: The Natural Edge Project.

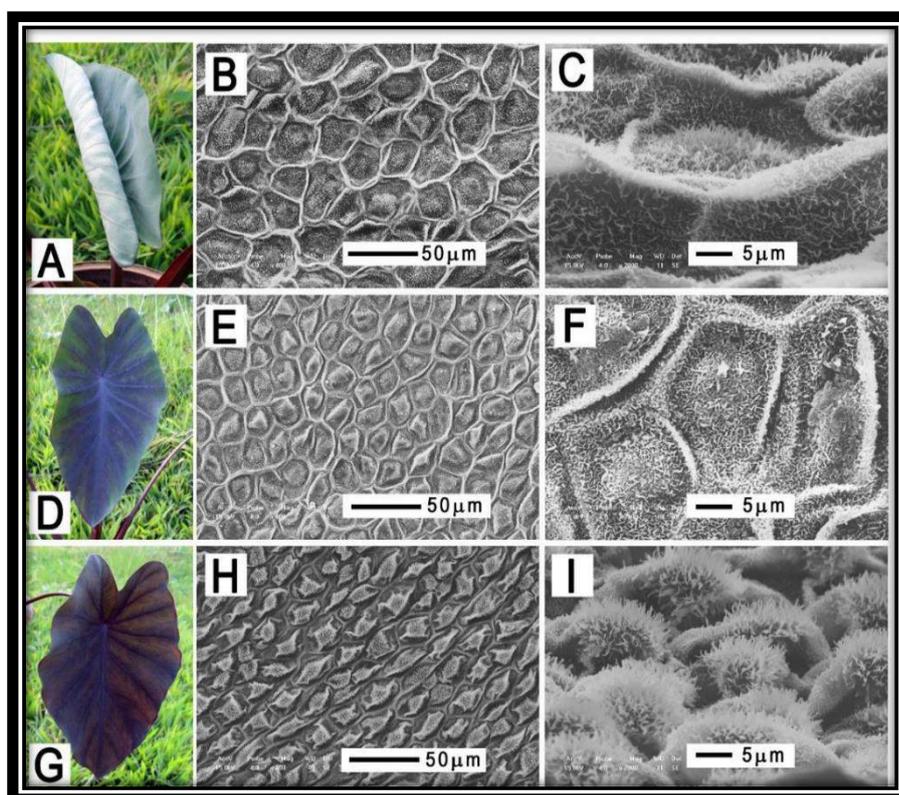
O presente trabalho, executado no Laboratório LandFoton do Grupo de Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados da UFPE, une duas linhas de pesquisa prioritárias do Grupo, em fase com essa sexta onda de inovação: a de Impressão de Materiais Complexos (Printrônica), na linha de manufatura aditiva, e a

linha de Materiais Bioinspirados, que vem resultado no depósito de patentes de dispositivos bioinspirados, produtos e processos fruto de bioinspiração em espécies vegetais endêmicas da Caatinga, único bioma 100% brasileiro, e animais da nossa biodiversidade. A maior motivação para se inserir nesta sexta onda de inovação vem do fato do Brasil ser um dos 17 países considerados “megadiversos”, abrigando aproximadamente 20% de todas as espécies animais e vegetais do planeta, sendo considerado o país com a maior quantidade de espécies endêmicas.

Vários exemplos recentes de trabalhos envolvendo tecnologias bioinspiradas desenvolvidos no laboratório LandFoton-DQF/UFPE, e que resultaram em patentes de produtos e processos do nosso Grupo de Pesquisas, podem ser citados, como a patente depositada em 2019 de um recobrimento antibacteriano que alia nanopartículas de prata e superfícies super-hidrofóbicas bioinspiradas em plantas de nossa biodiversidade, que reduzem a formação de placas bacterianas (biofilmes), patente BR10201901483, fruto da integração de trabalhos de quatro estudantes orientadas no Grupo, ou a patente depositada em 2018, de um Filme Bioinspirado em Superfícies Hidrofóbicas para Medida de Salinidade em função de Ângulo de Contato, de número BR10201801710, fruto da dissertação de Felipe Sousa (2017) também desenvolvida no Grupo, cuja dissertação de mestrado descreve a obtenção de filmes super-hidrofóbicos por soft lithography tipo lift-off, utilizando como biotemplates as nano- e microestruturas presentes tanto nas superfícies das folhas de espécies vegetais endêmicas da Caatinga quanto na *Colocasia esculenta* ‘black magic’, típica de regiões tropicais. As hierarquias micro- e nanométricas reproduzidas em materiais poliméricos resultaram em um dispositivo para medida de salinidade de água potável a partir da observação do ângulo de contato de uma gota da água analisada sobre essa superfície bioinspirada, e deu origem a um projeto do Edital CENTELHA (Facepe), atualmente selecionado para a terceira e última fase, com vistas à produção do dispositivo a ser monitorado por câmera de smartphone.

O “biomolde” utilizado no desenvolvimento do dispositivo bioinspirado é mostrado na figura 3, que evidencia a hierarquia das bioestruturas, responsável pela propriedade explorada, a super-hidrofobicidade, e que bioinspirou o dispositivo patenteado.

Figura 3– Colocasia esculenta ‘black magic’ em diferentes estágios de maturação, e respectivas micrografias (MEV Shimadzu SS-550)



Fonte: Felipe Sousa; 2017.

O grupo também tem um software depositado no INPI para produção de biotemplates digitais, para impressão por processo de manufatura aditiva camada por camada (LbL) de superfícies bioinspiradas, fruto de dois trabalhos do grupo, o de doutorado de Rosely Queiroz, e o do mestrado defendido por Elibe Souza, para produção de filmes bactericidas super-hidrofóbicos. A função do software registrado no INPI (512018001308-2), chamado TopoSlicer, é de substituir a técnica de lift-off pela impressão Drop-on-Demand (DoD) de fluidos funcionais, a partir da conversão de imagens de microscopia em um conjunto de camadas separadas por cotas para impressão 3D em impressoras 2D de materiais.

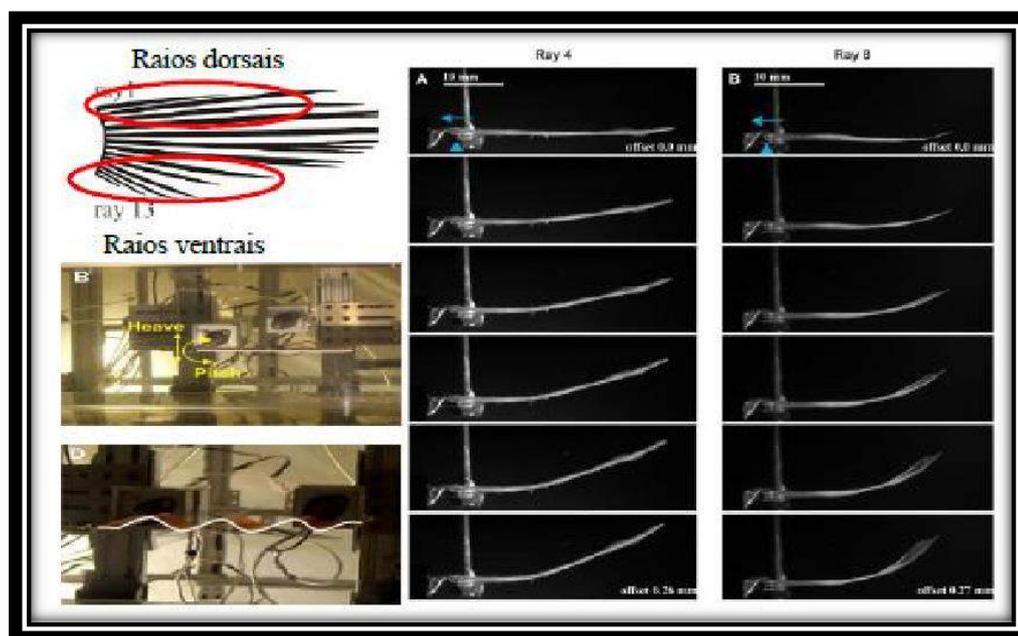
Nos dois depósitos de patentes mais recentes temos em 2020 o “Dispositivo pré- concentrador com parte ativa viva para análise de traços de micropoluentes em água” patente BR102020003546-0 de Sueli Tavares Silva, que explora a capacidade filtradora não seletiva do microcrustáceo artêmia, e a própria patente fruto dos

trabalhos da presente tese “Recobrimento iridescente imprimível contendo guanina cristalizada e respectivo processo de preparação”, BR1020200036033 (Silva e Santa-Cruz, 2020).

A bioinspiração também pode ocorrer pela observação de estruturas macroscópicas, para inspiração de peças com design com melhor funcionalidade, ou mesmo para novos projetos de design mecânico, como nas famosas invenções de Leonardo da Vinci, por exemplo as “máquinas voadoras” inspiradas em pássaros.

O trabalho G V Lauder et al (2011) traz um breve resumo dos principais aspectos da biomecânica dos peixes, explorados em bioinspiração: a mecânica dos raios da nadadeira dos peixes, e a função de modelos de natação ondulatórios simples que variam entre a rigidez e a flexibilidade (figura 04).

Figura 4– Mostra o material inteligente em bioinspirados na mecânica dos raios da nadadeira do peixe



Fonte: Adaptado de G V Lauder et al., 2011.

Borboletas do gênero *Morpho*, endêmicas das florestas tropicais brasileiras, bioinspirou a indústria de cosméticos L'Oréal Paris para o desenvolvimento do primeiro produto bioinspirado na iridescência de animais, desenvolvendo a linha de cosméticos LUCI, sem nenhum pigmento químico. A cor azul é de natureza física, resultante da interferência construtiva de material bioinspirado em nanoestruturas

presentes nas asas iridescentes das borboletas *Morpho*, (Figura 5a). A ausência de cromóforos no cosmético diminui consideravelmente a ocorrência de alergias. As figuras 5b e 5c mostram a hierarquia das estruturas, e à direita, a maquiagem bioinspirada na borboleta, aplicada.

Figura 5– Borboleta do gênero *Morpho* (a), Micrografias das estruturas fotônicas (b, c). À direita, a sombra bioinspirada (linha LUCI) aplicada em modelo



Fonte: Adaptado da L'Oréal.

As descrições científicas mais antigas de cores estruturais foram provavelmente as escritas por Hooke em 1665 em *Micrografia* e há quinze anos republicadas (Hooke, 2003). As cores mais brilhantes da natureza não estão associadas a pigmentos, mas são produzidas pela interação da luz com materiais estruturados, sendo cores estruturais, originadas nos seguintes cinco processos ópticos fundamentais e suas combinações: interferência de filme fino, interferência multicamada, efeito de grade de difração, cristais fotônicos e dispersão de luz (Kinoshita e Yoshioka, 2005).

Do ponto de vista evolutivo, as cores biogênicas estruturais evoluíram paralelamente à pigmentação, e muitos animais apresentam uma combinação das duas nas suas colorações (Land, M. 1972; A. R. Parker, 2000; Prum R.O, 2006; Fox,

D. L. 1953). A presença de cores estruturais ocorre em organismos de todos os reinos. Animais e plantas usam para diversos fins, como comunicação, termorregulação, aprimoramento da visão, camuflagem e proteção.

Muitos animais desenvolveram estratégias independentemente para produzir cores estruturais usando matrizes 2D ou 3D de vários materiais, incluindo a quitina e fibras de celulose, calcita, e cristais de guanina. (Doucet e Meadows 2009; Stuart-Fox e Moussalli 2009). Como exemplos como em aves (Hill et al., 2006), répteis como o camaleão (Teyssier et al. 2015; Or Berger et al. 2016), artrópodes representado por copépodos, caranguejos e aranhas (Dvir Gur et al. 2015; Kate D. L. Umbers et al. 2014), moluscos (Land, 1966), peixes (Denton e Lande, 1971; Ortmann et al., 2008; Gur et al., 2013), e em frutas como exemplo a fruta *Pollia condensata* (Vignolini et al. 2012).

Essas espécies possuem estruturas de multicamadas com dimensões que variam de nano, micro a macro, características de materiais biológicos, que desempenham um papel importante na obtenção de integridade estrutural e funcional (BAR-COHEN, 2006).

No presente trabalho, colaborações com Dra. Daniela Nadvorny, na ocasião de seu estágio pós-doutoral no grupo, incluíram ferramentas computacionais para avaliação de cristais de guanina, estruturas presentes em iridóforos de peixes do gênero *Paracheirodon*, visando o desenvolvimento de fluidos funcionais para impressão materiais bioinspirados, por tecnologia *Drop-on-Demand* (DoD) de materiais, utilizada neste Grupo de Pesquisas.

A tentativa de preparação de fluidos imprimíveis com materiais biológicos foi a tentativa mais ousada dentro esta área do grupo, que denominamos de Printrônica de fluidos funcionais, e constituiu a primeira tentativa de bioinspiração deste trabalho.

Uma ferramenta que podemos utilizar atualmente são os métodos computacionais de dinâmica molecular, que surgem como uma alternativa na compreensão de diversos comportamentos físico-químicos. Valores de energia dos orbitais de fronteira HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) e diferença de energia entre eles (gap) desempenham um papel relevante na determinação de suas propriedades ópticas, bem como indicam estabilidade química (Kessentini et al., 2018).

A energia EHOMO está relacionada ao caráter elétron-doador de um composto

enquanto a energia do ELUMO se refere o caráter elétron-aceitador. Desta forma, duas importantes características podem ser observadas: quanto maior EHOMO, maior a capacidade elétron-doadora, e quanto menor ELUMO, menor será a resistência para aceitar elétrons. Estes parâmetros podem ser obtidos através de métodos computacionais como DFT, por exemplo. Neste contexto, cálculos de estrutura eletrônica e de dinâmica molecular foram realizados a título de melhor entendermos o comportamento molecular da guanina inserida nas células iridóforas, e os primeiros resultados são apresentados no ANEXO II.

A presente tese envolve o estudo de espécie animal endêmica do Brasil, o peixe *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956), da bacia amazônica, com vistas ao desenvolvimento futuro de dispositivos bioinspirados em sua linha lateral nanoestruturada, que resulta em iridescência típica das espécies de peixes desse gênero (*Paracheirodon innesi*, *Paracheirodon simulans* e *Paracheirodon axelrodi*), todos criados no Biotério de Espécies Nanoestruturadas (BEN-DQF/UFPE) do nosso Grupo, consolidado após expedição organizada com recursos da Rede Nanobiotec Brasil (CAPES) onde foram observadas as condições ambientais dos igarapés em que esses peixes habitam. Um documentário está à disposição em https://youtu.be/LyNuC_y0rDs e também na página do biotério: <http://ben-ufpe.blogspot.com/>.

A implementação do Biotério e os primeiros estudos foram realizados em colaboração, durante o estágio pós-doutoral do Dr. José Lúcio Bezerra Júnior no Grupo, e estudos comportamentais e associação de imageamento por RNM foram confrontados avaliadas em conjunto com imagens de AFM, e como perspectivas serão posteriormente confrontadas a crio-microscopia eletrônica de transmissão para confirmação de novo mecanismo proposto, para servir de bioinspiração de dispositivos futuros, em particular para uso em monitoramento ambiental.

O estudo de nanoestruturas da faixa lateral de peixes do gênero *Paracheirodon*, aqui representados pela espécie *Paracheirodon axelrodi*, endêmico da região amazônica, tem como objetivo se analisar a viabilidade de preparação de fluidos bioinspirados para impressão de material iridescente via processo Drop on Demand (DoD), aliando as duas linhas prioritárias de pesquisa do Grupo GrandFoton (Grupo de Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados, Diretório de Grupos de

Pesquisa do Brasil, CNPq): a bioinspiração e a printrônica, dando origem à “Printrônica Bioinspirada”.

Pretende-se também avaliar o comportamento das nanoestruturas deste peixe através de sua iridescência em função de nanocontaminantes, e analisar a linha lateral através de técnicas ainda não exploradas na literatura, como o imageamento por RMN, na tentativa de contribuir com nova proposta de mecanismo do comportamento da iridescência envolvendo as células iridóforas do peixe, em função de parâmetros de ordem-desordem, que explicaria o comportamento observado da nanoestrutura após óbito. Além disso, pretende-se uma análise comportamental do peixe com base na detecção de nado errático em caso de danos neurológicos causados por nanocontaminantes, e a correlação com a mudança de cor da faixa lateral. Esses dados serão utilizados para avaliação da viabilidade de futuros dispositivos baseados no mecanismo de iridescência desses peixes, com vistas a dispositivos imprimíveis bioinspirados, com vistas às perspectivas de continuidade desse trabalho.

A bioinspiração é nitidamente subexplorada pela comunidade científica de um país com a biodiversidade do Brasil, para desenvolvimento de novos produtos e processos unindo a Ciência dos Materiais com a Biologia, e é neste contexto que este projeto de doutorado se inseriu, aliando a ele minha formação em Ciências Biológicas à Pós-graduação em Ciência de Materiais.

2 OBJETIVOS

- ✓ Desenvolver fluidos imprimíveis bioinspirados, baseados no mecanismo de iridescência observada no peixe *Paracheiroduon axelrodi*, com parâmetros de microfluídica otimizados para impressão Drop-on-Demand, como prova de conceito para desenvolvimento de dispositivos visuais bioinspirados.

Os objetivos específicos

- ✓ Realizar a cristalização da guanina a partir de soluções aquosas, utilizando um ácido e uma base, inspirando-se nos cristais das nanoestruturas presentes nas células iridóforas do peixe *Paracheiroduon axelrodi*;
- ✓ Caracterizar os cristais de guanina através de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios-X (DRX).
- ✓ Desenvolver fluidos imprimíveis a partir de guanina comercial, com monitoramento dos parâmetros de impressão - Números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh), e imagens de formação das gotas pela câmera Drop Watcher embarcada na impressora DoD;
- ✓ Implementar sistema para cultivar células iridóforas do peixe *Paracheiroduon axelrodi* em incubadora de CO₂, para serem incorporadas em fluidos imprimíveis, em paralelo com a impressão de cristais de guanina que constituem as nanoestruturas integrantes destas células;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LUZ E CORES

A luz é a estreita faixa visível do espectro de radiação eletromagnética. As ondas eletromagnéticas são caracterizadas pela frequência e o comprimento de onda, inversamente proporcional a ela (Mendham et al. 2008), e cada intervalo de comprimento de onda na região visível está associado a uma faixa de cor espectral. Em ordem crescente de comprimento de onda, vai do violeta, passando pelo azul, ciano, verde, amarelo, alaranjado e vermelho. Há cores não-espectrais, caracterizadas pela síntese aditiva de cores espectrais: o magenta, por exemplo, é resultado da síntese aditiva de cores-luz vermelha e azul, não havendo comprimento de onda algum que a represente, por ser não-espectral.

A luz, quantizada na forma de fótons, é absorvida por células (cones e bastonetes) no fundo do olho (retina), promovendo reações químicas que resultam na geração de elétrons conduzidos pelo nervo óptico ao córtex visual.

A rigor, a cor é uma sensação produzida pelo cérebro, resultado de *tristímulos*. São estímulos produzidos por três tipos de cones, diferenciados pela faixa de radiação que detecta. A intensidade relativa da excitação dessas três células, com máximo de sensibilidade associada às cores consideradas primárias em luz (vermelho-verde-azul), nos dá a sensação de cor.

Algumas das cores mais brilhantes da natureza são produzidas pela interação da luz com materiais estruturados, causando reflexão ou espalhamento de luz seletivas. O uso dessas cores estruturais biogênicas evoluiu paralelamente à pigmentação e muitos animais usam uma combinação das duas para produzir a coloração, através de células iridóforas, cuja cor por iridescência (interferência construtiva ou destrutiva da luz, que dá a seletividade da cor refletida) é resultado de síntese aditiva da luz, e células cromóforas, que resulta em cores causadas por síntese subtrativa, por absorção de parte do espectro visível. As cores estruturais (iridescentes, geralmente de aspecto metálico) são encontradas em vários grupos taxonômicos de animais, como artrópodes, moluscos, peixes, aves, répteis e podendo ser usadas para diversos fins, como comunicação, aprimoramento da visão e camuflagem (Lythgoe e Shand 1982).

3.2 ESTRUTURAS FOTÔNICAS

A visão e as interações luz-matéria desempenharam um papel crucial no desenvolvimento de cor estrutural em vários organismos. As estratégias exclusivas de manipulação de luz empregadas por vários organismos levaram ao desenvolvimento da coloração de predadores e presas e das comunicações visuais que determinam as preferências de acasalamento. A cor estrutural é formada por arquiteturas hierárquicas multiescala, altamente sofisticadas (Sirimuvva et al 2017).

As surpreendentes cores estruturais observadas em materiais naturais e biológicos são consequência da interferência, difração ou reflexão seletiva da luz em cristais fotônicos, foco deste trabalho. Os cristais fotônicos são estruturas dielétricas periódicas (com dimensões da ordem do comprimento de onda da luz) que exibem um intervalo de banda fotônica, proibindo a propagação da luz de certas frequências.

O intervalo de banda dos cristais fotônicos depende da orientação da propagação da luz no cristal, muitas vezes quantificado pelo espaço recíproco da rede e correspondente aos picos de reflexão da luz, causando a iridescência (Pavarini et al., 2005).

Os cristais fotônicos podem ser classificados em cristais fotônicos unidimensionais (1D), bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D), dependendo da orientação e da disposição periódica dos materiais dielétricos em relação à direção da propagação da luz. Os cristais fotônicos 2D naturais fornecem coloração a vários animais marinhos e pássaros (Zi et al., 2003; Lee et al., 2012; Yoshioka et al., 2011), enquanto os cristais fotônicos 3D são mais comumente encontrados em insetos. (Pavarini et al., 2005, Saranathan et al., 2010; Parker, et al., 2003; Galusha, et al., 2010).

O reflexo da luz nos limites superior e inferior (interfaces) de um filme fino resulta em interferência construtiva ou destrutiva de luz em certos comprimentos de onda, dependendo da espessura do filme. A formação de cores estruturais na maioria dos sistemas biológicos decorre da disposição espacial alternada de materiais dielétricos de índice de refração baixo e alto. Por exemplo, nas borboletas do gênero *Morpho*, as estruturas fotônicas formam discretas multicamadas de cutícula e vazios, resultando em uma visibilidade à longa distância de suas cores estruturais (Vukusic et al. 1999; Kesong e Lei, 2011; Qingsong et al., 2016).

A cor estrutural ocorre devido à presença de estruturas lamelares nos cristais que oferecem uma forte reflexão em uma determinada faixa de comprimento de onda, resultando em um reflexo difuso e amplo de uma cor uniforme (Kinoshita et al., 2002). A origem da coloração verde-clara nas escalas de asa do *Papilio palinurus* (Fabricius, 1787) é devido à modulação de mistura de cor dupla imposta às multicamadas pela justaposição das regiões planas e inclinadas entre as concavidades (Vukusic et al., 2000). Este tipo de média espacial em cores também foi observado nos besouros (Sharma et al., 2009).

O caso mais simples de cor estrutural surge de interferências de filme fino. Quando uma onda plana é incidente sobre uma película fina de espessura d e índice de refração n_b em um ângulo de refração θ_r , então as ondas refletidas nas duas interfaces interferem, e a condição para a interferência construtiva do comprimento de onda incidente λ é dada por:

$$2n_b d \cos \theta_r = m\lambda,$$

onde m é um inteiro ou meio inteiro, dependendo se o filme fino está ligado a um material de alto índice de refração (Kinoshita et al., 2008). Isso sugere que, à medida que o ângulo de incidência aumenta, o comprimento de onda correspondente à reflexão máxima muda para um comprimento de onda mais curto, que é uma característica da cor estrutural e mudança de cor associada ao ângulo de visão.

A interferência multicamada é um fenômeno causado por camadas finas de índices de refração altos e baixos empilhados em uma forma periódica com uma espessura física na ordem do comprimento de onda da luz. Considere duas camadas, A e B, com espessuras d_A e d_B e índices de refração n_A e n_B . Quando $n_A > n_B$, a condição para a interferência construtiva é dada por:

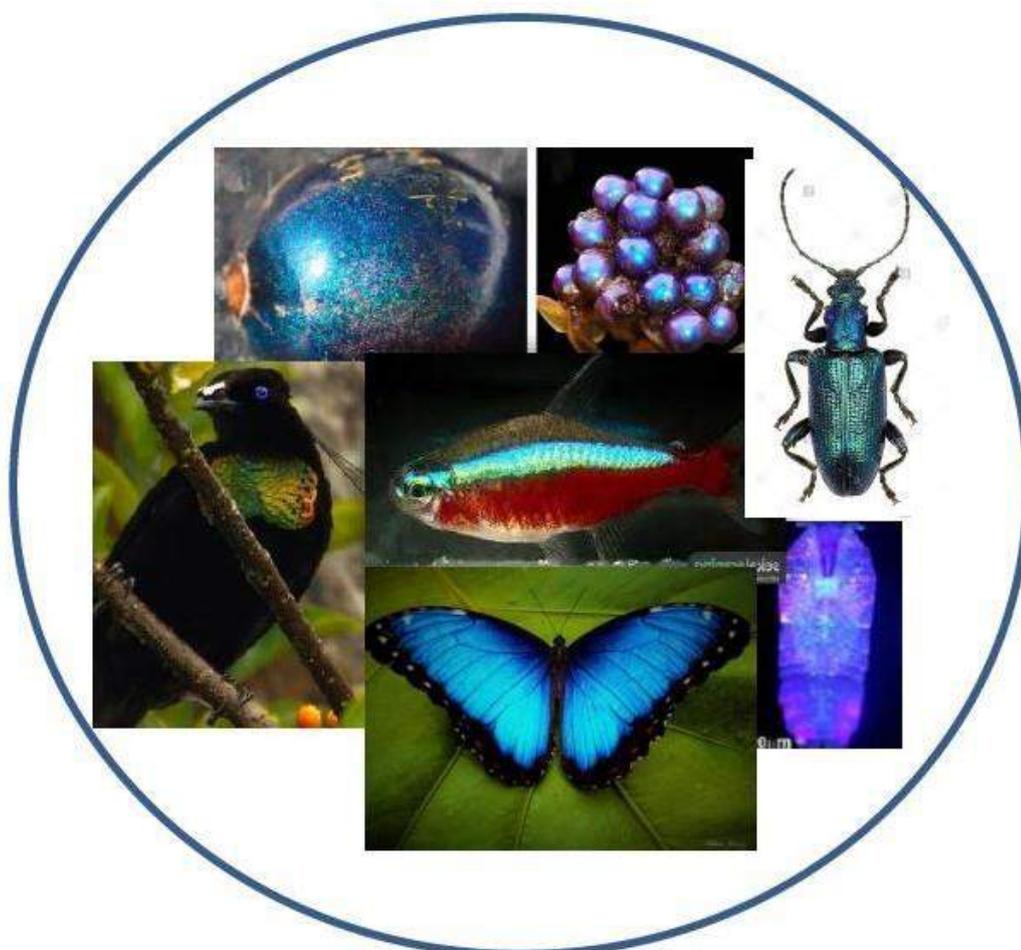
$$2(n_A d_A \cos \theta_A + n_B d_B \cos \theta_B) = m\lambda,$$

com o ângulo de refração nas camadas A e B dado por θ_A e θ_B (Kinoshita et al., 2008). Embora esta seja uma versão simplificada da compreensão da reflexão multicamada, a reflectividade e a transmitância de uma multicamada com índices e espessuras de refração arbitrárias e sem periodicidade podem ser calculadas pelo

método da matriz de transferência (Kinoshita e Yoshioka, 2005a; 2005b).

Este fenômeno é responsável pelas brilhantes cores iridescentes produzidas em estruturas naturais, observadas nos peixes do gênero *Paracheirodon* aqui estudados, borboletas do gênero *Morpho*, ordem copépodos, gênero *Sapphirina* (machos), besouros *Plateumaris sericea* (Linné, 1758), *Calloodes grayanus* de cor verde, Parotis “Ave do paraíso”, *Parotia lawesii* Vieillot, 1816 e no fruto *Pollia condensata* (Wilts et al., 2014; Gur et al., 2015; Yoshioka et al., 2011; Kinoshita et al., 2002; Kinoshita et al., 2005; Mckenzie e Large, 1998; Stavenga et al., 2011) (figura 6).

Figura 6– Algumas espécies que apresentam cores iridescentes produzidas em estruturas naturais



Fonte: Imagem da autora (2020)

Segundo a literatura atual, os mecanismos de iridescência dos peixes desse gênero envolveriam variação de pressão osmótica no interior das células iridóforas

por abertura e fechamento de canais iônicos induzidos por estímulos externos ou do sistema nervoso central do peixe, e a variação da pressão osmótica levaria a mudança no espaçamento nanométrico de estruturas lamelares de cristais de guanina, alterando o comprimento de onda associada à interferência construtiva da luz, e a cor da iridescência (Yoshioka et al., 2011). No entanto, medidas de microscopia de força atômica obtidas durante o estágio pós-doutoral do Dr. José Lúcio Bezerra Júnior no nosso Grupo levaram a uma proposta de novo modelo, apresentado na *International Conference of Nanophotonics* (ICNP 2017), que é apresentado no ANEXO II, envolvendo mecanismo de ordem-desordem de cristais fotônicos, o que explicaria o desaparecimento da cor quando o peixe vai a óbito.

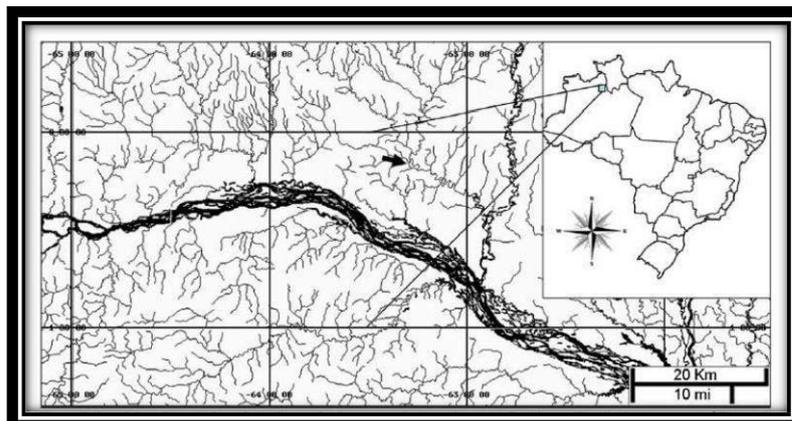
Independente do mecanismo envolvido, a cor notável do *Paracheiroduon axelrodi*, assim como os demais peixes deste gênero (*P. innesi*, *P. simulans*), está associada à presença de cristais de guanina periodicamente dispostos dentro de células de iridóforos (Yoshioka et al., 2011), e meu trabalho será bioinspirado nesses cristais biogênicos.

3.3 GÊNERO *Paracheiroduon*

Metade da ictiofauna de água doce conhecida do mundo encontra-se na região Neotropical, e o Brasil abriga cerca de 43% desses peixes. A predominância é da ordem *Characiforme*, com destaque à família *Characidae*, com quase 150 gêneros e mais de mil espécies (Buckup et al., 2007).

A espécie *Paracheiroduon axelrodi* (Schultz, 1956), da família *Characidae*, conhecida popularmente como "Neon Tetra", "Cardinal Tetra" ou simplesmente "Neon", é um peixe de pequeno porte, nativa da bacia amazônica. É encontrada somente nas bacias do Rio Negro e Orinoco (figura 7), habitando preferencialmente áreas rasas de florestas inundáveis, localizadas em pequenos igarapés e afluentes que possuem pouca luminosidade e pouca correnteza. Em seu ambiente natural, vive em ambientes com valores médios de nível de oxigênio dissolvido na água em torno de 5,5 mg/L, pH 5,3, condutividade elétrica ~7,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e temperatura média de 28,5 °C (Lemos et al. 2015), podendo variar muito de acordo com a sazonalidade.

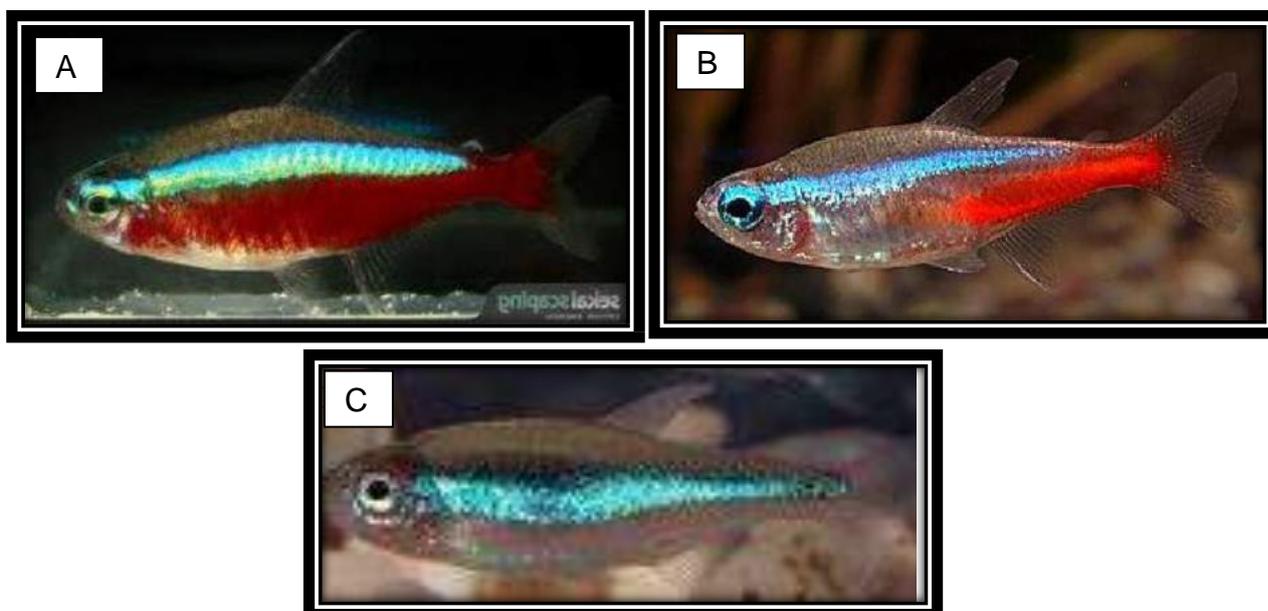
Figura 7– Bacia do Rio Negro onde se encontra o peixe *Paracheirodon axelrodi*, estado do Amazonas



Fonte: Lemos et al. (2015).

Embora seja encontrado como um peixe ornamental de aquário em pet-shops de várias partes do mundo pela sua beleza, nem a biologia natural nem o status sistemático do *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956) é bem conhecido, havendo outras duas espécies do mesmo gênero: *Paracheirodon innesi* (Myers, 1936) e *Paracheirodon simulans* (Géry, 1963) (figura 8).

Figura 8– *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956) (A) e outras espécies do gênero: *Paracheirodon innesi* (Myers, 1936) (B); *Paracheirodon simulans* (Géry, 1963) (C)



Fonte: Imagens da autora (2020)

O brilho azul-esverdeado na faixa lateral dos peixes do gênero *Paracheirodon* é devido a uma nanoestrutura composta por um sistema de cristais fotônicos localizados nas células iridóforas (Lythgoe J. N. and Shand J. 1982). Os cristais biogênicos orgânicos são descritos como placas finas (50-100 nm) de guanina (Levy-Lior et al. 2008) e desempenham uma função semelhante aos de alguns minerais (Lowenstam, e Weiner, 1989). Abaixo da faixa lateral, a cor vermelha ao longo de todo o ventre do *P. axelrodi* e na parte anterior do ventre do *P. innesi* é devido à absorção de luz por pigmentos em células cromóforas, praticamente inexistentes na espécie *P. simulans*.

Exemplos de cristais biogênicos orgânicos são oxalatos, tartratos e citratos encontrados principalmente em plantas (Lowenstam e Weiner, 1989; Franceschi e Horner, 1980; Arnott e Pautard, 1970) e purinas como ácido úrico e guanina, encontradas em insetos, répteis, anfíbios e peixes (Fox, 1953 e Millot, 1923).

Recentemente foram identificados cristais de guanina em espécies machos de Copepodas, como a *Sapphirina nigromaculata* (Claus, 1863) e *Sapphirina metallin* (Dana, 1849) mais conhecidas como Safiras do mar, pela beleza (à direita da borboleta *Morpho* na Figura 6). Em função da pressão osmótica intracelular, podem passar de azul a incolor, ficando invisíveis, quando o espaçamento entre os cristais corresponde à faixa de comprimento de onda do ultravioleta (Baar et al. 2014).

3.4 CRISTAIS DE GUANINA

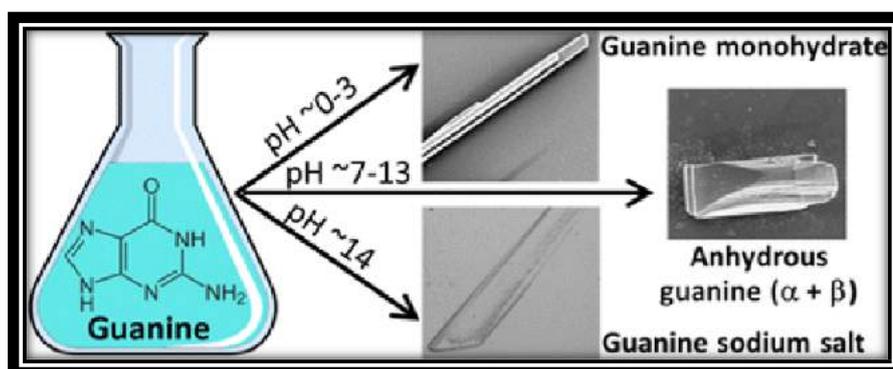
Os cristais biogênicos orgânicos de guanina produzem montagens funcionais em sistemas naturais, e são intracelulares, formando-se em células especializadas, referidas na literatura como iridóforos, iridócitos, guanócitos ou guanóforos. (Masashi Hirata et al. 2003). Essas células de pigmento consistem em nanoplacas de cristal de guanina anidro, e estão presentes na pele de uma ampla gama de animais de grupos taxonômicos distintos, gerando cores estruturais. Esta formação de cor eficiente é baseada no índice de refração muito alto dos cristais de guanina, 1,83 na direção de refletida (Avital et al. 2008).

Uma das cinco bases de ácido nucleico, a guanina tem a fórmula química $C_5H_5N_5O$. Existem três diferentes fases conhecidas de guanina cristalina: monohidrato de guanina e dois polimorfismos de guanina anidra, α e β . A guanina

pode cristalizar como um monohidrato ou em forma anidra. Apenas a guanina anidra está presente em sistemas biogênicos, e estão entre os cristais orgânicos mais difundidos utilizados pelos organismos para produzir as cores estruturais (Dvir Gur et al., 2016).

A estrutura cristalina do monohidrato é monoclinico com o grupo espacial $P21/n$, e dimensões da célula $a = 16,51$, $b = 11,28$, $c = 3,65$ Å, e $\beta = 96,8^\circ$. A estrutura cristalina de guanina anidra é monoclinica, com grupo espacial $P21/c$ e célula com dimensões $a = 3,55$, $b = 9,69$, $c = 16,35$ Å, $\beta = 95,88^\circ$ (Avital et al. 2008; Dvir Gur et al. 2016). Esses cristais de guanina são o foco deste estudo (figura 9).

Figura 9– Cristais da guanina anidra e monihidratada



Fonte: adaptada de Dvir Gur et al. (2016).

A β -guanina anidra também é encontrada por baixo da cutícula de certos crustáceos, como os copépodos de *Sapphirina*, onde produz cristais fotônicos ajustáveis, induzidos pela luz. A forma polimórfica de guanina anidra é encontrada em camaleões, em diferentes grupos de lagartos e em olhos de molusco. Em todos os casos em que o polimorfo foi determinado (aranhas, peixes e copépodos), a fase cristalina biogênica foi composta apenas do polimorfo β , enquanto que o polimorfo α foi obtido somente *in vitro* (Dvir Gur et al. 2016).

Esses cristais de guanina são usados em muitos sistemas ópticos biológicos para realizar uma surpreendente variedade de funções (Land, 1972), desde a produção de cor branca em certas aranhas, até a brilhante reflectância metálica iridescente de certos crustáceos, peixes a planctônicos e para visão em olhos espelhados complexos (Locket, 1970).

A cor branca observada em certos organismos resulta da reflexão difusa de luz,

em que todos os comprimentos de onda da faixa visível do espectro sofrem dispersão. Por outro lado, reflectância de aspecto prateado, iridescência, e as cores estruturais são produzidas por reflexão especular (ou seja, direcional), quer de todos os comprimentos de onda (no caso da reflectância prata) ou de comprimentos de onda específicos da luz (no caso das cores estruturais).

A reflexão da luz pode ter algumas vantagens sobre a absorção é energeticamente eficiente, evita o aquecimento devido à absorção, é mais propício para seletividade (sintonizável), pode facilitar o controle sobre a polarização e direcionalidade, e muitas vezes produz um brilho melhorado (Kinoshita e Yoshioka, 2005; Oxford e Gillespie, 1998).

3.5 TECNOLOGIAS *INKJET*

3.5.1 Mecanismos *CIJ* e *DoD* para geração de gotas para impressão

O presente projeto tem como objetivo a produção de fluidos bioinspirados imprimíveis por tecnologia *DoD*, a partir de moldes digitais (*templates*). De acordo com o mecanismo para formação das gotas a serem ejetadas, as tecnologias *inkjet* podem ser classificadas como de jato de tinta contínuo (*CIJ*) e gotas sob demanda (*DoD*), podendo produzir gotas com volumes tão pequenos quanto de 0,1fL, ou tipicamente no nosso laboratório, 1 a 10 pL, correspondendo a um raio de 1 a 10 μm por tecnologia *DoD*, enquanto que a impressão *CIJ* é mais utilizada para impressões com gotas cerca de dez vezes maiores. (DERBY, 2010).

3.5.2 Atuadores

Os atuadores mais comuns para expulsar o fluido na forma de gotas usam mecanismos térmicos ou piezoelétricos. Para o presente trabalho, será utilizada uma impressora de materiais com cartuchos equipados com atuadores piezoelétricos, que preservam o fluido produzido, por não utilizar o calor.

Com uma maior resolução do que as impressoras 3D convencionais, a precisão no jateamento das gotas em condições controladas e a versatilidade da natureza dos

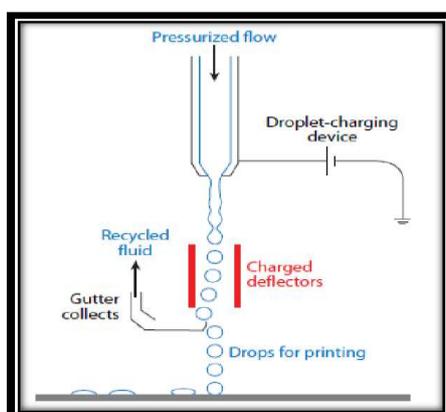
fluidos tornaram a impressoras de materiais uma nova plataforma de preparação de dispositivos funcionais, dando origem ao que chamamos de printrônica. A impressão LbL por tecnologia DoD pode produzir superfícies com microestruturas 3D em resolução maior, nessas impressoras.

Temos como objetivo final neste trabalho, a printrônica de fluidos bioinspirados nas estruturas presentes nos iridóforos. A preparação do fluido envolve o controle de parâmetros de microfluídica, que dependem tanto do material ativo, quanto da fase volátil de transporte quanto do substrato e dos bicos de impressão. O fluido preparado e acondicionado no reservatório do cartucho de impressão é jateado a partir de um conjunto de bicos de impressão por efeito piezoelétrico em cristais acionados pela aplicação de diferença de potencial elétrico controlada via software, a partir do estabelecimento de curvas otimizadas para regulação da pressão aplicada nos bicos de impressão, definindo a velocidade de ejeção das gotas. (RU et al., 2014; Felipe 2014).

3.5.3 Sistema CIJ- continuous inkjet

A figura 10 mostra o esquema do mecanismo *CIJ*. Ele gera muito resíduos, desperdiçando, contaminando ou degradando o fluido, não sendo uma tecnologia tão limpa quanto a *DoD*, motivo pelo qual este *hardware* não foi escolhido para a linha de printrônica implementada em nosso Grupo.

Figura 10– Diagrama mostrando o princípio de operação de uma impressora CIJ

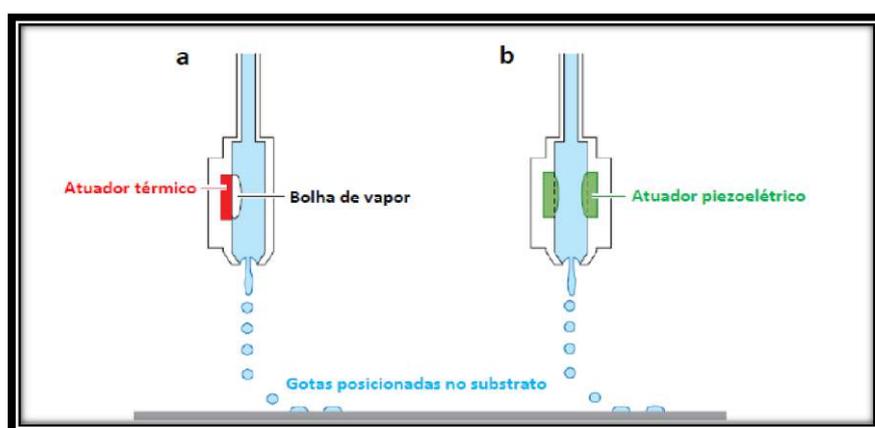


Fonte: DERBY (2010).

3.5.4 Sistema Drop-on-Demand

A figura 11 mostra o esquema de funcionamento de uma impressora *DoD*, com atuador térmico (a) e atuador piezoelétrico (b). Para este projeto de tese, utilizamos equipamento *DoD* com atuadores piezoelétricos (b) controlados por MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*), disponível para os projetos de printrônica do nosso Grupo.

Figura 11– Impressão *DoD*, com (a) atuador térmico e (b) atuador piezoelétrico



Fonte: DERBY, 2010

Com a versatilidade de uso de materiais diversos por tecnologia *DoD*, hoje em dia podemos projetar materiais funcionais imprimíveis, com parte ativa por exemplo com os materiais inorgânicos para aplicação em eletrônica flexível, semicondutores como nanotubos de carbono, materiais metálicos na forma de nanopartículas, além materiais orgânicos para aplicações biológicas, com proteína, DNA, polímeros, etc. Para este trabalho, os materiais serão bioinspirados em cristais presentes em células iridóforas da banda lateral de peixes do gênero *Paracheirodon*. Para isso, os fluidos precisarão ser otimizados.

3.5.5 Parâmetros para o desenvolvimento do fluido de impressão

Para que as impressoras de materiais com tecnologia *DoD* produzam impressões de qualidade, o par fluido/substrato precisa ser otimizado. Jateamentos

com boa resolução e reprodutividade precisam de ajustes entre a parte ativa e o fluido de transporte, geralmente volátil, e valores viscosidade, densidade, dispersão, ponto de ebulição, tensão superficial e pH precisam estar dentro de faixas específicas. A figura 12 mostra as diversas variáveis a serem consideradas no processo de impressão de materiais, em geral feita em processo *LbL* (*layer-by-layer*), ou seja, camada por camada, sobrepostas.

Figura 12– Variáveis para controle da impressão *DoD*



Fonte: Felipe Sousa (2015), adaptada de Chen (2011).

3.5.6 Fluidos imprimíveis

Os fluidos produzidos precisam ser devidamente monitorados através de parâmetros que os situem em faixas otimizadas para uma impressão de qualidade. Segundo Derby (2010) e Martin et al. (2008), os coeficientes físicos adimensionais a seguir, definidos pela dinâmica dos fluidos, podem orientar a preparação de um fluido que resulte em uma boa impressão, levando em conta que valores mal ajustados podem levar até mesmo à não ejeção das gotas. Serão utilizados os números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh):

$$Re = \frac{v\rho a}{\eta}$$

$$We = \frac{v^2\rho a}{\gamma}$$

$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} = \frac{\eta}{(\gamma\rho a)^{1/2}}$$

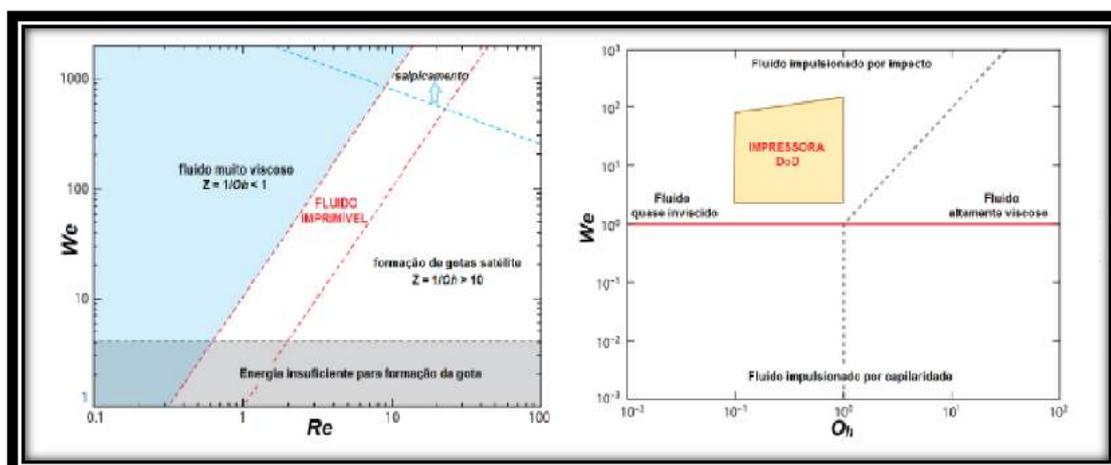
em que ρ , η e γ são a densidade, viscosidade dinâmica, e tensão superficial do fluido, enquanto que u é a velocidade média do fluido, e o comprimento característico, associado ao diâmetro da gota. Tomando-se o parâmetro $Z = 1/Oh$, valores entre $10 > Z > 1$ resultam em gotas estáveis, com menor quantidade de gotas satélite (Reis e Derby, 2000).

Uma velocidade mínima de ejeção da gota (u_{min}), com energia cinética mínima o suficiente para vencer a tensão superficial fluido/ar num bico de impressão de diâmetro $dn \approx \alpha$ é dada por: $v_{min} = (4\gamma/\rho dn)^{1/2}$.

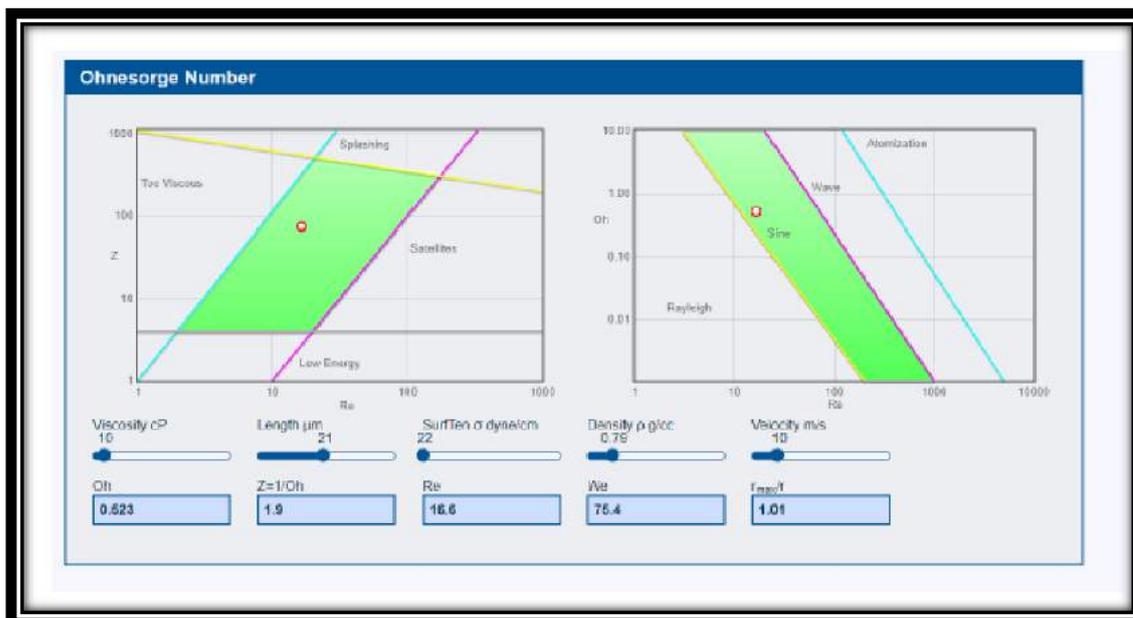
Nas impressoras *DoD* pode-se ajustar esse valor pela tensão aplicada ao atuador, definindo-se um valor mínimo de We para impressão do fluido (Duineveld et al., 2002). Valores de We insuficientes para ejeção da gota são mostrados na região cinzenta do gráfico na esquerda da figura 13. Entre as linhas tracejadas em vermelho, a figura mostra a região em que os parâmetros We e Re resultam em fluidos imprimíveis, e acima da linha tracejada em azul, região em que o alto impacto, devido à velocidade da gota, provoca gotas satélite. No gráfico à direita da mesma figura, é mostrada a região onde é possível a impressão *DoD*, em função dos parâmetros de Ohnesorge e Weber. Ajustes nos algoritmos de controle podem ser importantes para que o fluido esteja definido em região adequada para se conseguir uma boa qualidade de impressão. Os parâmetros de Re , Z e Oh podem ser monitorados através de aplicativo on-line para se avaliar se o fluido projetado é imprimível nas condições utilizadas - região em verde na figura 13 (b).

Figura 13– a) Gráficos mostrando as regiões em que os valores dos coeficientes de Weber (We), Reynolds (Re) e Ohnesorge (Oh) resultam em fluidos imprimíveis em impressoras *DoD*, e b) monitoramento dos parâmetros Re e Z por aplicativo on-line

a)



b)



Fonte: a) Derby, 2000; b) www.stevenabbott.co.uk/practical-coatings/ohnesorge.php (06/2019)

3.6 CULTURA DE CÉLULAS

Com vistas a avaliar a possibilidade de cultura de iridóforos na tentativa de se utilizar diretamente as células em fluidos, em paralelo ao desenvolvimento de material bioinspirado, foi montado um sistema de incubadora de CO₂ para cultivo de células na Ponto Quântico Nanotecnologia, hub de inovação situado na Positiva, NIT da UFPE, pertencente ao Laboratório LandFoton onde a tese foi desenvolvida. Diante disso, algumas considerações sobre cultura de células serão feitas nessa seção.

3.6.1 Tipos de culturas

Por causa de perdas de algumas características das células durante o seu desenvolvimento em cultura, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular e pode trazer problemas como um modelo de função fisiológica, pois a proliferação *in vitro* e *in vivo* apresenta diferenças. Segundo Alves e Guimarães (2010), “a adesão célula – célula e célula – matriz é reduzida, pois no meio de cultura, não possui as

características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado”.

Apesar disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental, mas o maior desafio consiste na escolha do meio ideal para a obtenção de uma cultura que expresse uma função específica. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia, são as principais vantagens dessa técnica.

Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais vivos em experimentos de pesquisa (Freshney, 1994).

3.6.2 Células primárias, células estabelecidas e células transformadas

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem formando a primeira monocamada de células daquele tecido, possuindo as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença de suas características genóticas e fenotípicas (Alves e Guimarães, 2010).

No organismo vivo, o processo denominado apoptose é responsável tanto pela renovação tecidual pela a morte celular programada, quanto pela morte prematura de células com alta taxa de erro na divisão celular, evitando o surgimento de tumores malignos. A morte por apoptose é programada e não causa danos, pois a célula não é rompida, ela simplesmente se “autodigere” formando botões apoptóticos que se degradam.

Alves e Guimarães (2010) descrevem que “esse tipo de célula é chamado linhagem celular contínua (células estabelecidas), e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares contínuas podem ser propagadas sem

perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie”.

Ainda segundo Alves e Guimarães (2010), “no momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas células transformadas. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta. A transformação celular é uma alteração genética que permite mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor). A mutação pode resultar de uma superexpressão de proto-oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor”.

As células transformadas também podem ser obtidas diretamente de tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais., como na linhagem das células HeLa, citadas no trabalho pioneiro de 1951 descrito na introdução desta qualificação - são oriundas de um tumor de cérvix uterina humana - células genética e morfológicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura. Essas células são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade e controle de qualidade (Alves e Guimarães, 2010).

3.6.3 Aplicações dos cultivos celulares

Existem muitas aplicações para a cultura de células, como por exemplo, para produção de imunológicos, virologia e terapia celular, conforme descrito a seguir.

- Produção de imunológicos

As primeiras aplicações se relacionam com a produção de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais têm sua maior aplicação nos imunoenaios, como o ELISA, e também são muito utilizados associados a marcadores radioativos em imunocintilografia.

- Virologia

Como os vírus necessitam de hospedeiros, é na cultura de células que é possível cultivá-los, por isso, na virologia, a cultura de células é muito utilizada para a obtenção viral, permitindo o isolamento do vírus para avaliar o seu efeito em determinados tipos celulares, além de verificar as células que são.

- Terapia celular

A técnica de terapia celular tem como objetivo restabelecer a função ou a estrutura de um tecido por meio da utilização de células. É utilizada no caso de traumas, doenças degenerativas ou agressões aos tecidos do corpo. É necessário o conhecimento do microambiente celular original para a reprodução no meio de cultura.

3.6.4 Cultivo de células de peixes

Apesar de cada tipo de célula necessitar de conhecimentos específicos para sua cultura, conhecendo-se o microambiente celular original, pode-se afirmar que os conceitos tratados de forma geral nos tópicos precedentes se estendem às células de peixes de interesse nesta tese.

4 EXPERIMENTAL

4.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

4.1.1 Cristalização da guanina em meios ácidos e básicos

Os cristais de guanina foram produzidos por dissolução de 20 mg, 50 mg, 70 mg e 100 mg de guanina em pó (ACROS ORGANCS; Guanina 99%), em solução de 10 ml de HCl com pH =2 e 1 M; NaOH pH = 10 e 1 M. As soluções foram então filtradas usando-se um filtro de PVDF (22 µm, milipore) e 0,1 ml de NaOH 1 M ou HCl 1 M. A cristalização de guanina foi induzida a partir do gotejamento da solução de NaOH ou HCl. O pH da solução foi acompanhado utilizando-se um pHmetro digital e a solução foi ajustada para diferentes valores de pH.

4.1.2 Preparação do Fluidos

Foram iniciados os ensaios de preparação dos fluidos de impressão, sendo compostos por uma solução de guanina em água com pH corrigido, e monoetilenoglicol (MEG) em proporções variadas para ajuste de parâmetros.

4.1.3 Substrato

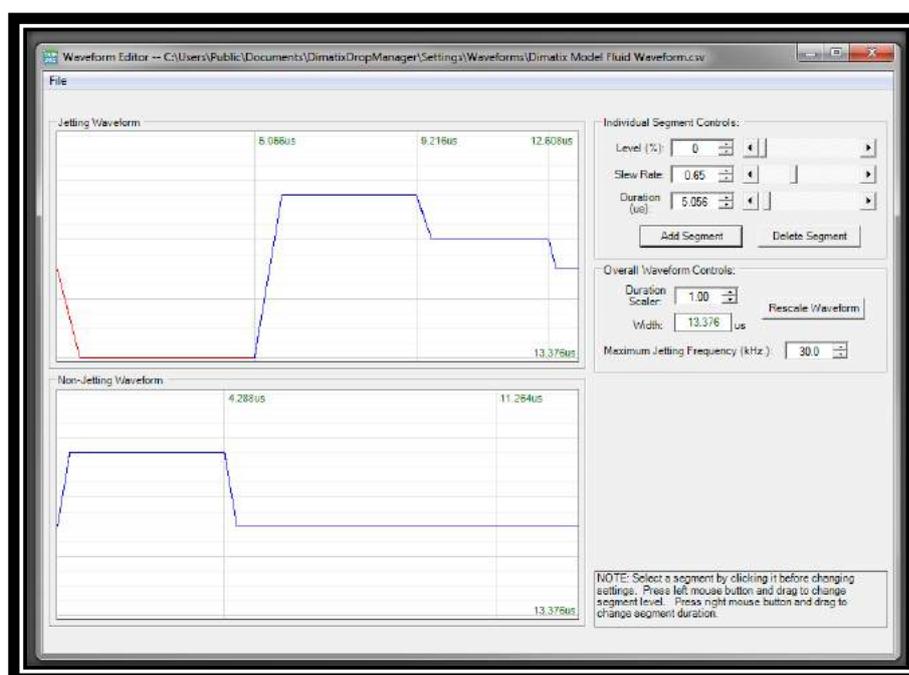
Foram utilizadas lâminas de vidro de silicato de sódio para microscopia óptica (26 mm x 76 mm) como substrato vítreo para impressão do fluido. As superfícies foram tratadas com vapor de ácido fluorídrico de forma a aumentar a rugosidade e aumentar o número de grupos silanóis disponíveis, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e fixação da guanina na lâmina.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMPRESSÃO - DMP 2831

O LandFoton, laboratório de nosso Grupo, está equipado com a impressora DoD de materiais DIMITIX® Materials Printer DMP2931 (Fuji) para os projetos de

pesquisa envolvendo Printrônica de nanodispositivos, com cartuchos de 1pL ou 10pL, composto de 16 bicos de impressão utilizando 16 atuadores independentes com cristais piezoelétricos controlados por MEMS independentes, que recebem uma diferença de potencial (DDP) em função do tempo a partir de curva DDP (t) estabelecida por software de controle. Para os parâmetros dos bicos de impressão, determinou-se a frequência máxima de ciclo de jateamento com as ferramentas embarcadas DropWatcher e Cartridge Settings. Para a determinação dos algoritmos de controle utilizou-se uma forma de onda padrão, com o auxílio da ferramenta Waveform Editor, mostrado na figura 14.

Figura 14– Waveform Editor do software de controle embarcado na DMP 2831



Fonte: Imagens da autora.

Parâmetros de DDP e frequência máxima de ejeção de gotas (F_{max}) foram obtidos empiricamente, observando-se a forma das gotas geradas, volume e energia cinética, proporcional à DDP aplicada. A determinação e controle dos parâmetros de impressão foram ajustados inicialmente partindo-se dos algoritmos de controle para um fluido padrão da DMP 2831 (Sousa, 2015).

O protocolo seguido para a determinação dos parâmetros iniciou com a varredura da tensão aplicada entre 10 – 40 V, aplicada aos bicos de impressão, para

determinar o valor mínimo para o jateamento sem provocar obstrução dos bicos e a máxima sem gerar gotas satélites. Determinou-se em seguida a frequência máxima do ciclo de jateamento que não provocasse efeitos de obstrução, geração de gotas satélites ou desvio do jato. Ajustou-se patamar de tensão constante sem fluxo de fluido, e o ajuste do patamar e declives de preenchimento da antecâmara de jateamento. Por fim, ajustou-se o patamar e declives para o aumento da tensão aplicada para o início da ejeção do fluido, e o ajuste do patamar e declives para a diminuição controlada da tensão aplicada nos piezoelétricos, para reduzir a turbulência na formação da gota ejetada.

A distância entre o centro de duas gotas adjacentes foi definido com a ferramenta *Drop Spacing*, e os parâmetros de impressão foram ajustados. Através de goniômetro que equipa o suporte do cartucho de impressão, ajustou-se manualmente o ângulo da cabeça de impressão. A temperatura da plataforma de fixação do substrato pode ser ajustada para se otimizar o controle da evaporação do solvente utilizado, dentro de limite compatível com o fluido.

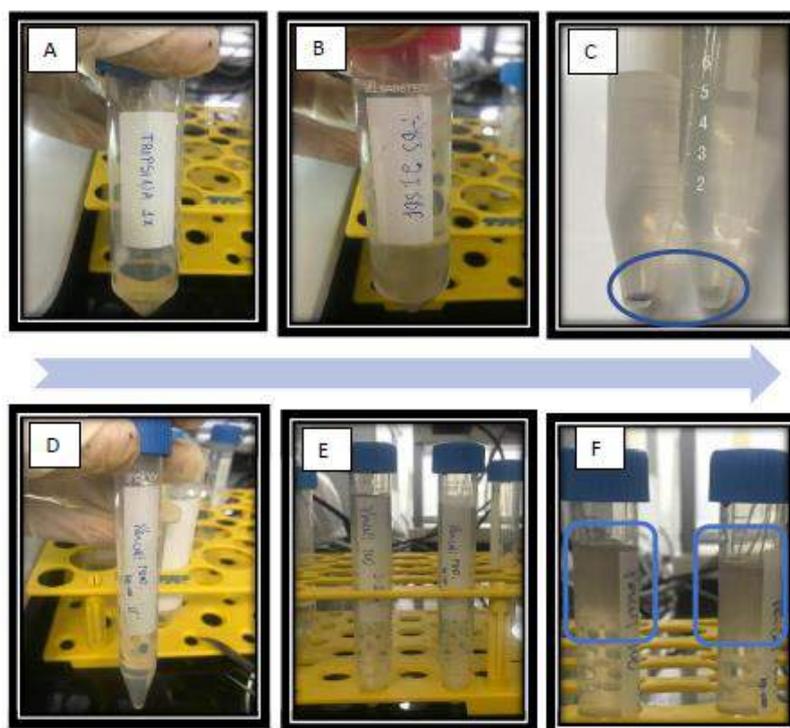
Templates digitais (padrões de impressão) podem ser desenhados por software embarcado na impressora, ou importados em formato bitmap de 1 bit (preto e branco). Utilizou-se inicialmente padrões retangulares. A espessura do substrato foi informada para evitar o contato dos bicos com o mesmo, mantendo-os em distância ideal para impressão.

4.3 DISSOCIAÇÃO CELULAR

Foram utilizados peixes saudáveis da espécie *Paracheirodon axelrodi*. Os peixes foram anestesiados de acordo com as normas da comissão de ética através do método de “*cold shock*” onde, os espécimes eram acondicionados em recipiente com gelo em escamas, submetendo-os a um choque térmico. Este método é recomendado pelo *Use of Fishes in Research Committee* (AFS, 2014), e nosso Biotério de Espécies Nanoestruturadas (BEN/LandFoton) e os experimentos tem registro na Comissão de ética para experimentação animal da UFPE. Em seguida, foi retirada a faixa lateral onde se encontra determinados tipos celulares, como as células iridóforas, que produzem a iridescência no peixe. Para dissociação das células foram feitos os seguintes passos mostrado na figura 15: as células totais foram dissociadas em

tripsina 1x (Figura 15A) e PBS 2% FBS, e foi realizado um processo de filtração através de uma peneira de 100 μ m macerado, lavado com PBS 2% FBS (Figura 15B) e novamente filtrado através de uma peneira de 100 μ m para melhor dissociação. Após esse processo, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm por 5 minutos) (Figura 15C). Em seguida as células foram ressuspensas em 2ml de PBS 2% FBS e posteriormente colocadas em tubos de 15 ml (Falcon) sob gradiente de Percoll fisiológico (nove partes de Percoll-Sigma + uma parte de PBS 10X, Figura 15D), seguindo Charles et al (2013). Os tubos contendo as células totais e o Percoll foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (centrífuga CT - 4000 de ângulo fixo, CIENTEC) (Figura 15E). Ao final as células que se encontraram na parte superior do gradiente (Figura 15F) foram removidas e lavadas por centrifugação (2000 rpm por 5 minutos). As células totais foram ressuspensas em 0,4 ml de PBS 2% FBS e em seguida analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6) (Figura 16).

Figura 15– Etapas realizadas para a dissociação das células da faixa lateral do peixe *Paracheirodon axelrodi* (A, B, C, D, E e F)



Fonte: Imagens da autora (2020)

Figura 16– Citômetro (BD Accuri C6 Sampler. BD Bioscience)



Fonte: Imagens da autora (2020).

4.4 CULTIVO DE CÉLULAS

Após dissociação tecidual, como descrito no item 4.3, as células totais foram ressuspensas em meio L-15 Medium Leibovitz (SIGMA) contendo 1% de antibiótico e solução antimicótica (1.000 U de penicilina, 1.000 μg de estreptomicina e 25 μg de anfotericina B mL⁻¹; Invitrogen) e 20% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO). Em seguida, a suspensão das células foi colocada em duas garrafas para cultivos de 25 cm (Corning) (Figura 17A), e as garrafas foram colocadas em uma incubadora de CO₂ (ESCO) em temperatura de 28°C com 5% de CO₂ (Figura 17B). De dois em dois dias as células foram observadas com auxílio de microscópio invertido (Olympus) (Figura 18B). Quando necessário o meio sobrenadante era removido e adicionado um novo.

Figura 17– Garrafas com a solução e a suspensão das células (A) e incubadora (ESCO) com a temperatura de 28°C com 5% de CO₂ (B)



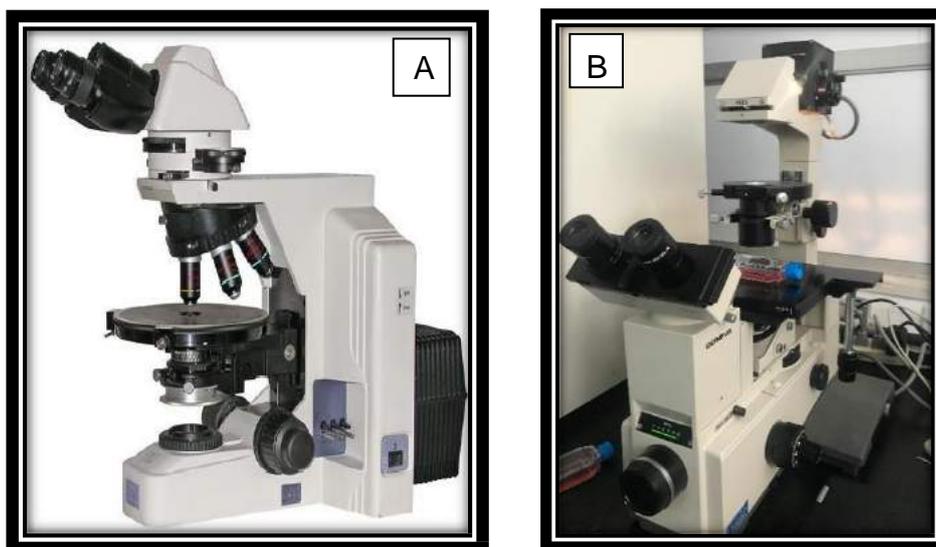
Fonte: Imagens da autora (2020).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.5.1 Microscopia ótica e invertida

As imagens foram adquiridas no microscópio Nikon (Eclipse E600 POL), com ou sem luz polarizada em posição cruzada para as imagens da cristalização. Também foram registradas imagens da cultura de células com o microscópio invertido (Olympus) (Figura 18).

Figura 18– Microscópios ópticos (A) Microscópio Nikon (Eclipse E600 POL) e (B) Microscópio invertido



Fonte: Imagens da autora (2020).

4.5.2 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um equipamento Rigaku Ultima III e as medições da cristalização da guanina foram feitas em um equipamento Smartab da Rigaku, utilizando tubo de carbonato de cobre com o comprimento de onda utilizado $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ (CuK_{α}), com a varredura de 10° a 100° . Para realizar a análise da guanina em pó, as amostras foram dispersas em um substrato. Todas as análises de dados DRX foram feitas com o pacote de software Jade (Materials Data Inc.). As medidas foram realizadas por ângulo rasante e geometria Bragg-Brentano

com o intuito de diminuir a interferência do substrato na medida real. Com esta geometria, o feixe de radiação monocromática incide tangenciando a amostra, que está rotacionada no ângulo Θ , enquanto que os dados são coletados no detector que se movimenta em 2Θ .

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cristais de guanina foram fixados em porta amostra com fita de carbono. Toda as amostras foram metalizadas com filme de Au de 10 nm de espessura, utilizando o SC 701 Quick Coater. As medidas de MEV foram feitas em equipamento TESCAN MIRA3, utilizando aceleração de 10 kV sob diferentes magnificações. O equipamento foi utilizado para aquisição das imagens dos cristais de guanina em diversas concentrações. As análises permitiram observar a morfologia e a estrutura do cristal.

4.5.4 Citometria de fluxo

Como descrito no item 4.3, após dissociação tecidual, as células que se encontraram na parte superior do gradiente foram removidas e lavadas por centrifugação. As células totais foram ressuspensas em 0,4 ml de PBS 2% FBS e em seguida analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6).

O citômetro de fluxo é capaz de analisar várias partículas em cada segundo em "tempo real" e podem ativamente separar e isolar partículas com propriedades específicas. Um citômetro de fluxo é similar a um microscópio que produz, ao invés de imagens da célula, uma quantificação de um conjunto de parâmetros. Para análise de tecidos biológicos é necessária a preparação de uma suspensão de células.

Um citômetro de fluxo tem 5 principais componentes:

- Uma célula de fluxo - *flow cell*
- Uma fonte de luz - normalmente são usados lasers (de excitação de gases, como Argônio e Hélio-Neônio) e lasers de estado sólido (*solid state laser*) emitindo em

diversos comprimentos de onda, como: 355 nm (laser UV); 405 nm (laser violeta); 488 nm (laser azul); 561 nm (laser amarelo-verde); 633 ou 638 nm (laser vermelho); 808 nm (laser infravermelho).

- Um sistema ótico/eletrônico compostos de filtros e detectores – Fotomultiplicadoras (PMT) ou arranjos de fotodiodo (APD) que captam as luzes emitidas pelos lasers e pelas substâncias fluorescentes e as convertem sinais eletrônicos analógico em digitais (ADC), e amplificando esses sinais.
- Um computador para análise de sinais.

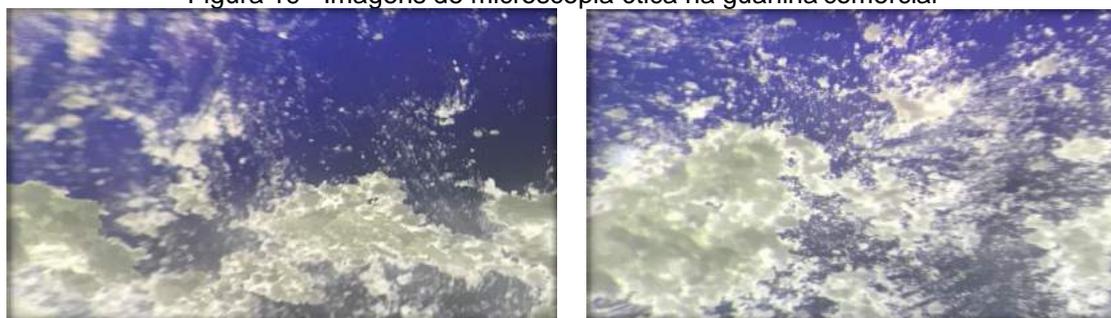
4.5.5 Metodologia computacional

Para a realização dos cálculos de dinâmica molecular, através de colaboração com a pós-doutoranda Daniala Nadvorny, inicialmente a estrutura geométrica da guanina anidra foi otimizada através do método de estrutura eletrônica B3LYP/6-31++G(d,p) com o programa GAUSSIAN 09 (Frisch et al., 2009). Em seguida uma caixa de simulação foi gerada, aonde as moléculas de guanina foram inseridas de acordo com a estrutura cristalina gerada através do programa computacional. A simulação foi realizada durante 100 ns à temperatura de 298 K e pressão de 1 bar com o programa GROMACS e campo de força 53A6 (Oostenbrink e Soares, 2005; Oostenbrink et al., 2004). Foram realizadas as análises de desvio médio quadrático (RMSD), função de distribuição radial (RDF) e tempo de vida médio das ligações de hidrogênio. Para os cálculos de estrutura eletrônica foram também realizados os cálculos dos orbitais HOMO e LUMO.

5 RESULTADOS

A guanina obtida comercialmente na forma de pó (Sigma Aldrich) não apresenta iridescência, como mostra as imagens de microscopia ótica na figura 19. Foram realizadas cristalizações da guanina comercial em meios ácidos e básicos visando na obtenção de cristais que apresentem iridescência, como o objetivo de se estudar a viabilidade da produção de fluidos bioinspirados que permitam a simulação da auto-organização de guanina cristalina presente na faixa lateral dos peixes de gênero *Paracheirodon*.

Figura 19– Imagens de microscopia ótica na guanina comercial



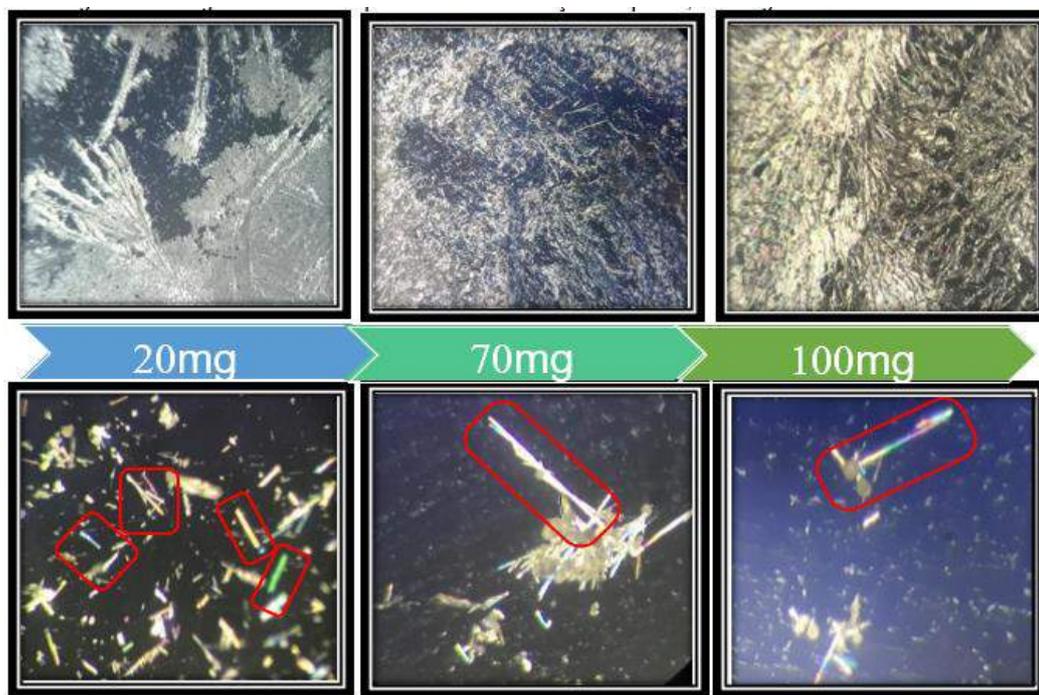
Fonte: Imagens da autora (2020)

Foram realizadas cristalizações em meio básico (pH 14) variando-se a quantidade de guanina em pó (20 mg, 70 mg e 100 mg). O tempo médio de formação dos cristais mostrados nas imagens de microscopia ótica da figura 20 foi em torno de 15 dias. É observado uma morfologia cristalina tipo filamentos ou microagulhas, observando-se em algumas regiões a iridescência de filamentos sob luz polarizada. Para estas amostras, cristalizadas em pH 14, foi observada a formação de depósitos do excesso de hidróxido de sódio na superfície dos cristais formados, funcionando como contaminantes que dificultam a observação da iridescência.

A figura 21 mostra imagens de MEV dos cristais obtidos a partir de soluções de 20 mg (A), 70 mg (B) e 100 mg (C) de guanina em pH 14, e observa-se a presença de depósito de contaminantes, provavelmente NaOH, na superfície dos filamentos obtidos em todas as amostras. Foi observada uma variação na dimensão do filamento cristalino obtido em função da quantidade de guanina utilizada na solução. Para a cristalização a partir de 20 mg de guanina são obtidos filamentos curtos e para a

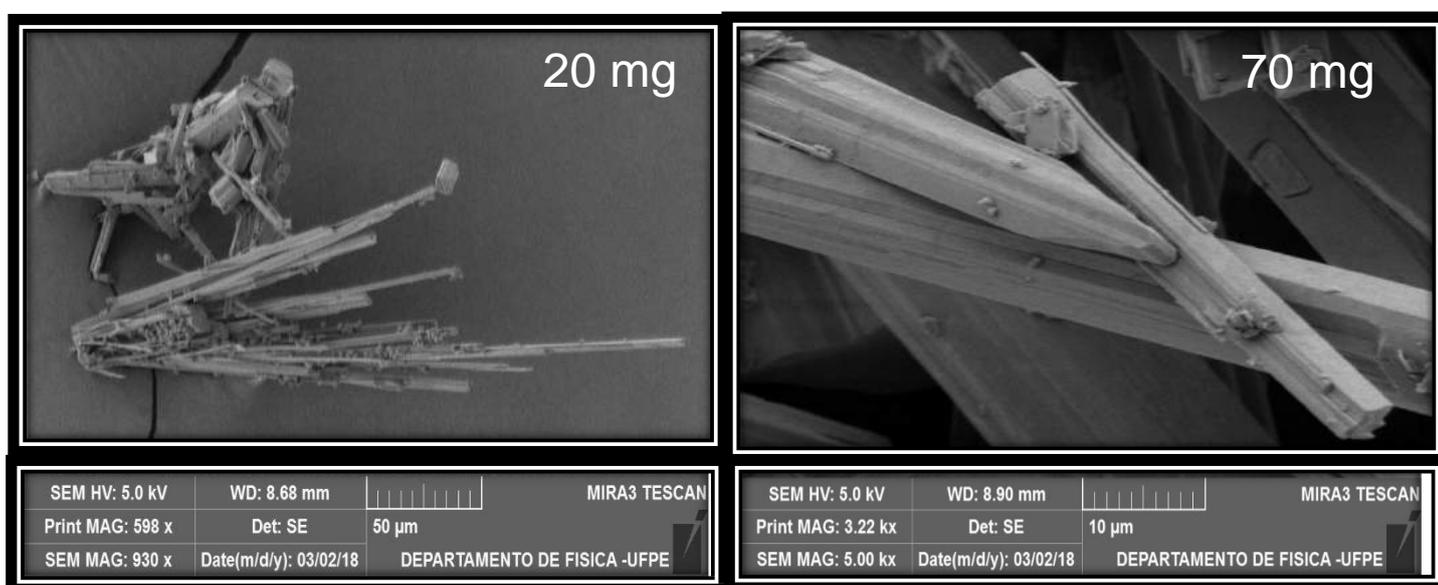
cristalização de 100 mg são obtidos filamentos de maior comprimento, com iridescência observada em todas as amostras, como mostrado na figura 20.

Figura 20– Imagens de microscopia ótica da cristalização em pH 14, com regiões iridescentes visíveis

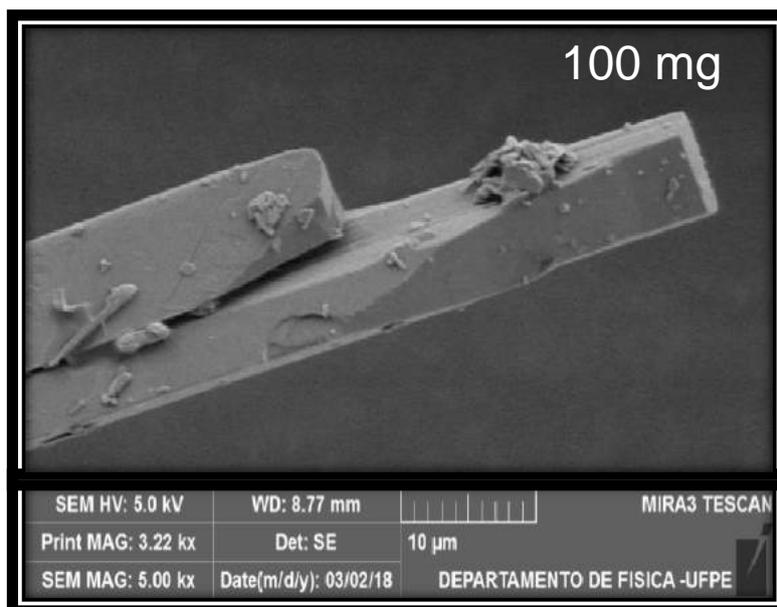


Fonte: Imagens da autora (2020).

Figura 21– Imagens MEV dos cristais de guanina obtidos a partir de soluções de 20 mg ampliada 598x (A), 70 mg ampliada 3220x (B) e 100 mg ampliada 3220x (C) de guanina em pH 14



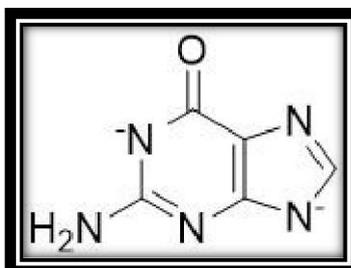
Continuação da figura 21



Fonte: Imagens da autora (2020).

A cristalização realizada em pH 14 resulta na formação do sal dissódico de guanina heptahidratado, o que facilita a solubilidade e a posterior cristalização, já que a guanina é insolúvel em solução aquosa com pH neutro. A cristalização em pH 14 é ocorrida devido a uma dupla desprotonação, formando o tautômero mostrado na figura 22, assim, quando os íons de guanina atingem a saturação, o sal heptahidratado formado cristaliza na forma de longos microfilamentos.

Figura 22– Dupla desprotonação da guanina em pH 14



Fonte: Imagens da autora (2020).

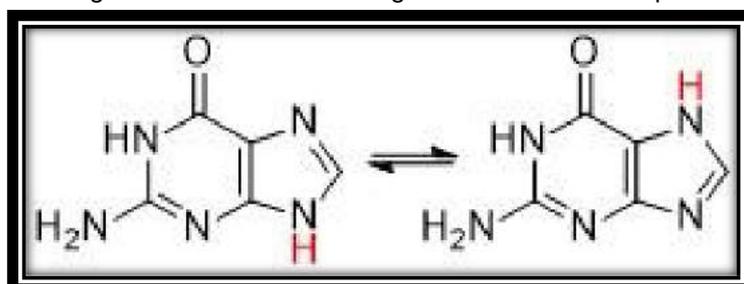
Foram realizadas também cristalizações em meio ácido (pH 2) com 100 mg de guanina, com tempo mínimo de cristalização de 4 meses. Foram obtidos cristais pequenos na forma de microbastões, como mostrado na figura 23. A cristalização da guanina em pH 2 também ocorre pela formação do tautômero da molécula, obtendo-se dois possíveis tautômeros, como mostrado na figura 24.

Figura 23– Imagens de microscopia ótica da cristalização em pH 2



Fonte: Imagens da autora (2020).

Figura 24– Tautômeros da guanina formados em pH=2

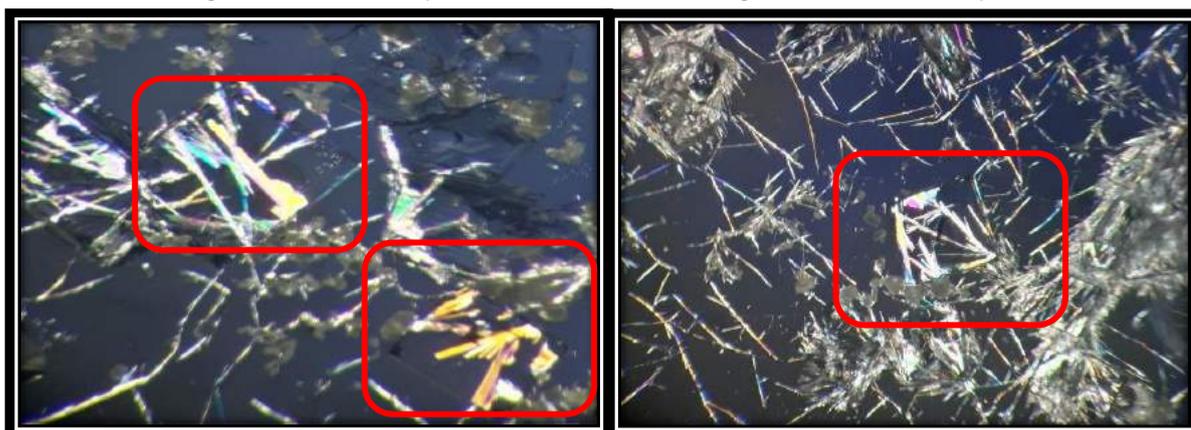


Fonte: Imagens da autora (2020).

Os cristais formados neste pH não mostram contaminação na superfície observada em pH alcalino, mas o tempo de cristalização impede seu uso imediato, portanto, para contornar o problema da contaminação, foram realizadas cristalizações com controle de pH, neutralizando o meio a partir da titulação da solução básica de guanina com HCl, iniciando o controle do pH em 10.

Os cristais obtidos nesta nova metodologia mostram em 15 dias a formação de cristalitos de guanina com morfologia de microfilamentos, como mostrado na figura 25.

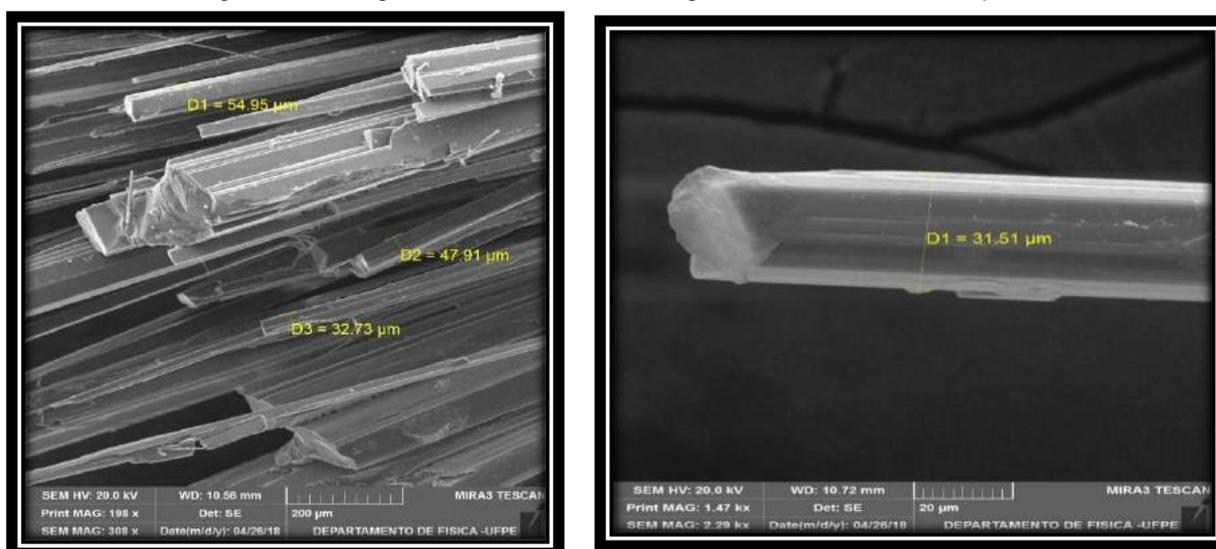
Figura 25– Microscopias óticas dos cristais de guanina obtidos em pH 10



Fonte: Imagens da autora (2020).

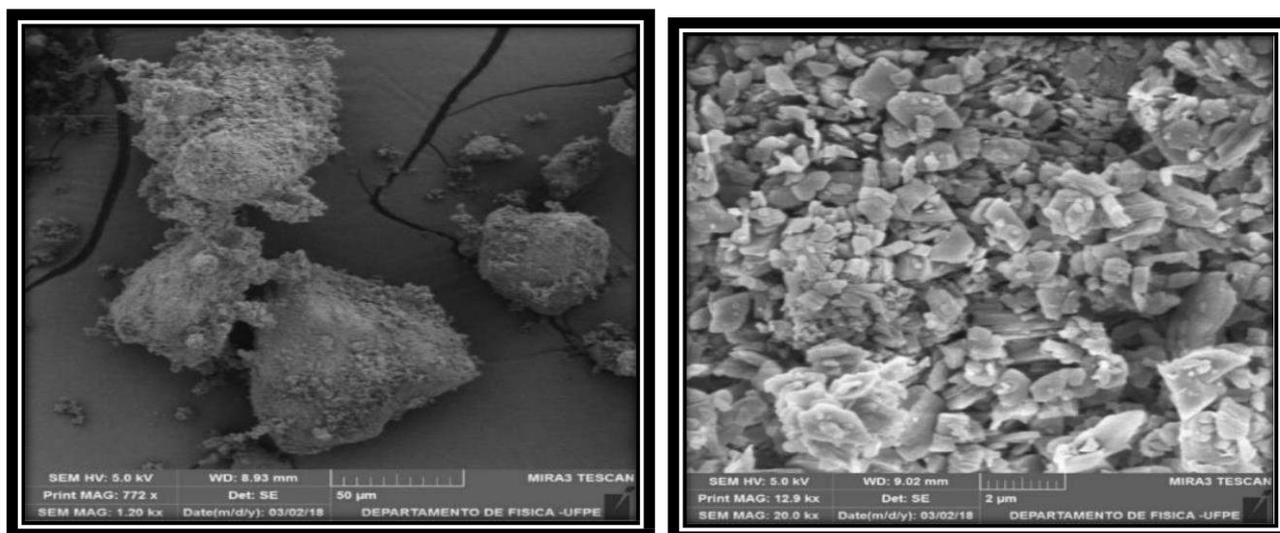
Para esta cristalização, foram obtidos cristais de maior comprimento, que apresentam nítida iridescência sob luz polarizada, como mostrado acima. A caracterização morfológica por MEV é mostrada nas micrografias da figura 26. A morfologia obtida é de microfilamentos de menor diâmetro que as obtidas anteriormente, e é observado uma estrutura de formação hexagonal. É importante mencionar que não é observada a presença de contaminantes na superfície do cristal. Para comparação da morfologia do produto de partida com os cristais formados, na figura 27 são mostradas as imagens MEV da guanina comercial em pó, observando-se uma estrutura irregular e não uniforme, deixando em evidência as alterações morfológicas obtidas com a formação dos cristais com a metodologia proposta.

Figura 26– Imagens MEV dos cristais de guanina sintetizados em pH 10



Fonte: Imagens da autora (2020).

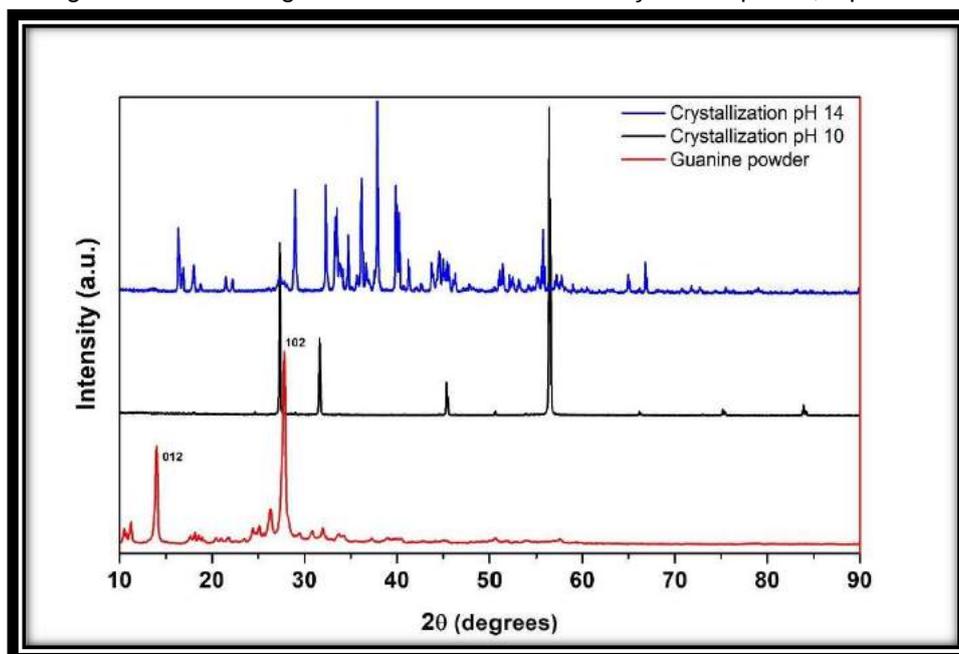
Figura 27– Imagens MEV da guanina comercial em pó, utilizada como produto de partida



Fonte: Imagens da autora (2020).

Realizada a caracterização morfológica por microscopia óptica e eletrônica, foram realizadas medidas DRX para confirmar a estrutura cristalina da guanina. Os difratogramas obtidos da análise DRX de pó para as amostras obtidas em pH 10, pH 14 e para a guanina comercial são mostrados na figura 28. Para guanina comercial, observa-se os picos de Bragg correspondentes à fase β -guanina, obtendo-se uma orientação preferencial na família de planos (102), observado em 27° e plano (012) em 14° . Para a cristalização em pH 10, observa-se os picos de Bragg correspondentes a uma estrutura cúbica de face centrada, tipicamente da cristalização do NaCl, mas realizando um zoom na região de 20° a 60° , observa-se o pico mais intenso da guanina em 27° , correspondente ao plano (102), comparada à guanina comercial. Já para as cristalizações em pH 14, foram observados em maior intensidade os picos cristalinos do contaminante NaOH, não sendo possível a identificação dos picos característicos da guanina.

Figura 28– DRX da guanina comercial e cristalizações em pH 10, e pH 14

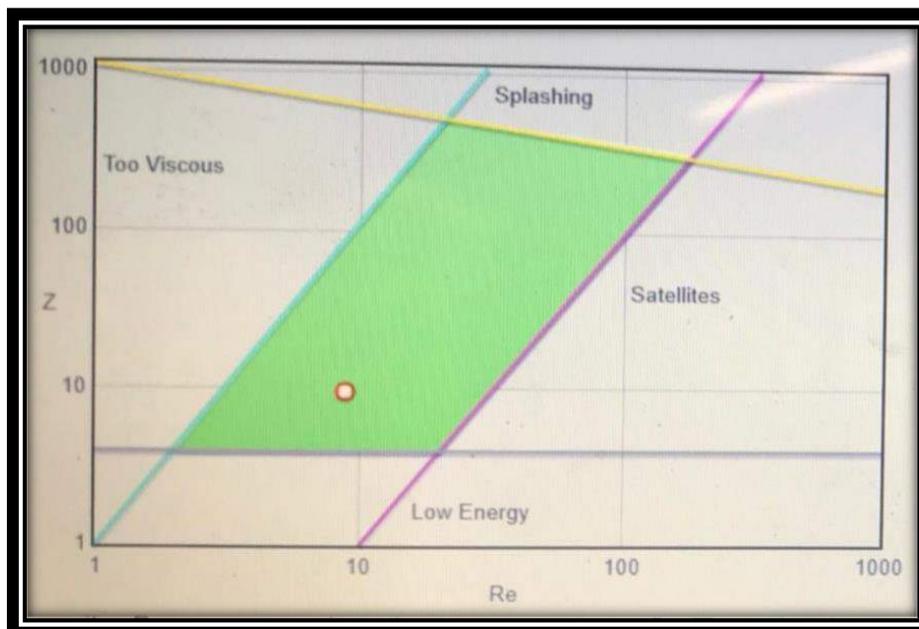


Fonte: Imagens da autora (2020).

5.1 PREPARAÇÃO DE FLUIDO PARA CRISTALIZAÇÃO DA GUANINA APÓS IMPRESSÃO *DoD*

Conforme descrito na sessão 3.5.5, a determinação dos números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh) pode nos guiar na otimização da composição final do fluido, permitindo ajustá-lo para que seja imprimível por tecnologia *DoD*. Esses coeficientes são calculados a partir de parâmetros físico-químicos em função da mistura dos componentes do fluido, a partir das equações apresentadas na mesma sessão. O gráfico mostrado na figura 13 situa o fluido em relação a uma região ótima para impressão *DoD*. A figura 29 mostra este gráfico, traçado *on-line em aplicativo* via Web, conforme descrito também na figura 13, com a coordenada final do fluido otimizado, preparado para a impressão *DoD* da guanina comercial, com o pH já controlado a partir do presente trabalho. Percebe-se que a coordenada se situa em região que indica que a composição utilizada resultou num fluido imprimível (área verde).

Figura 29– Coordenada (Re,Z) do fluido da guanina comercial para o presente trabalho, calculada conforme descrito na figura 13 ($Z=1/Oh$)



Fonte: Imagem da autora (2020).

Foram feitos vários testes para determinação dos parâmetros adequados para impressão dos fluidos com guanina aqui desenvolvidos. Partiu-se dos parâmetros utilizados para o fluido padrão da Dimatix (fluido modelo), ajustando em seguida esses parâmetros para os fluidos funcionais preparados, determinando assim as curvas otimizadas de tensão X tempo para os atuadores piezoelétricos. A tabela 1 apresenta os parâmetros utilizados nos algoritmos de controle, que garantem a ejeção do fluido sem problemas, resultando numa impressão de qualidade.

Tabela 1– Parâmetros otimizados para os cartuchos e ciclos de limpeza para os fluidos desenvolvidos

PARÂMETROS	VALORES OTIMIZADOS
DDP [V]	30
F_{MAX} [KHZ]	5,0
TEMPERATURA DO CARTUCHO [°C]	30
CICLOS DE LIMPEZA (INÍCIO E DURANTE O JATO) [S]	300
TEMPERATURA DA PLACA [°C]	30
TEMPO DE ESPERA ENTRE CAMADAS [MIN]	10

Fonte: Da autora (2020).

Realizadas as otimizações de parâmetros das amostras com a guanina comercial, foram preparados fluidos de impressão para enchimento dos cartuchos (máximo de 1,5 mL por cartucho), sendo compostos por uma solução de guanina em água com pH corrigido e monoetilenoglicol (MEG) em diversas concentrações para ajuste de viscosidade, para posteriormente realizar as impressões. Como substratos de impressão, foram utilizadas lâminas de vidro para microscopia óptica (silicato de sódio), para deposição do fluido. As superfícies, à base de SiO₂, foram tratadas com vapor de ácido fluorídrico, de forma a aumentar a rugosidade e aumentar o número de grupos silanóis disponíveis, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e fixação da guanina na lâmina.

Foi escolhida a metodologia utilizando-se 70 mg de guanina e pH 10, onde se obteve filamentos mais longos, finos e que não mostrou a contaminação nos cristais. Os fluidos (5 mL) foram preparados em 5 soluções que variaram entre as concentrações contendo 4,5 a 2,5 mL da solução de guanina pH 10 e 0,5 a 2,5 mL de monoetilenglicol (MEG) respectivamente, para ajustar a viscosidade (tabela 02) nos valores otimizados.

Tabela 2– Concentrações dos fluidos contendo 4.5 a 2.5 mL da solução de guanina pH 10 e monoetilenglicol (MEG)

SOLUÇÕES DE GUANINA COM PH 10 (ML)	MEG X (ML)
4,5	0,5
4,0	1,0
3,5	1,5
3,0	2,0
2,5	2,5

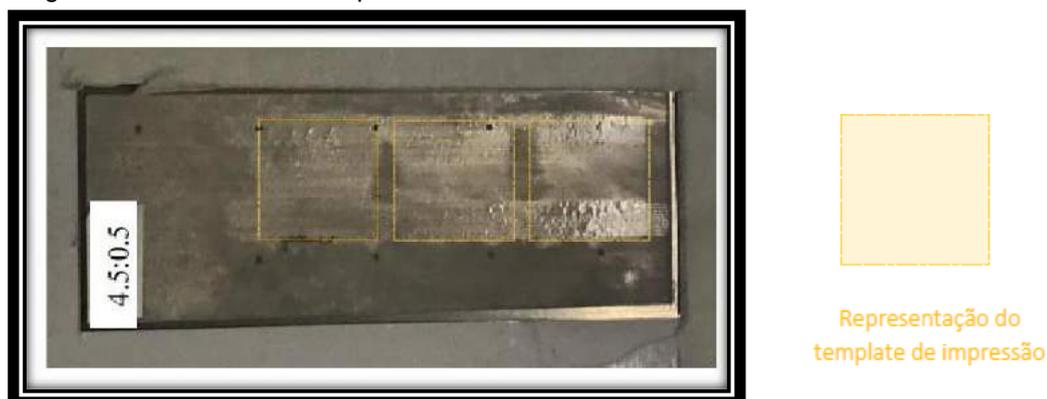
Fonte: Da autora (2020).

As impressões foram feitas em substratos tratados conforme descrito, para induzir a cristalização após impressão, utilizando a técnica de deposição *DoD* na impressora DMP 2831 e utilizado as soluções de maior e menor concentração de guanina com pH10. O primeiro fluido utilizado foi com 4,5 mL de solução de guanina, que corresponde ao de maior concentração, e foram depositadas 10 camadas de impressão, jateadas *layer-by-layer (LbL)*, enquanto que com 2,5 mL de solução de guanina, foram depositadas 5 camadas *LbL*.

5.1.1 Fluido de proporção 4.5:0.5 (Guanina/MEG)

A figura 30 apresenta o primeiro ensaio de impressão *DoD* com o fluido 4,5:0,5, em que três quadrados foram impressos lado a lado como *template* digital, com 10 camadas superpostas. Comparando-se com a representação do *template*, observa-se a não homogeneidade e dispersão do material depositado, que pode ser relacionado à baixa viscosidade do sistema de solventes, associada à natureza do substrato, não poroso.

Figura 30– Fluido 4.5:0.5 depositado sobre substrato de vidro de silicato de sódio



Fonte: Imagem da autora (2020).

A figura 31 apresenta a imagem obtida por microscopia ótica das camadas impressas com o fluido do sistema 4.5:0.5 cristalizando. Observa-se pequenos pontos, relacionados ao início da cristalização da guanina.

Figura 31– Imagem de microscopia ótica do sistema 4.5:0.5 impresso por *DoD*



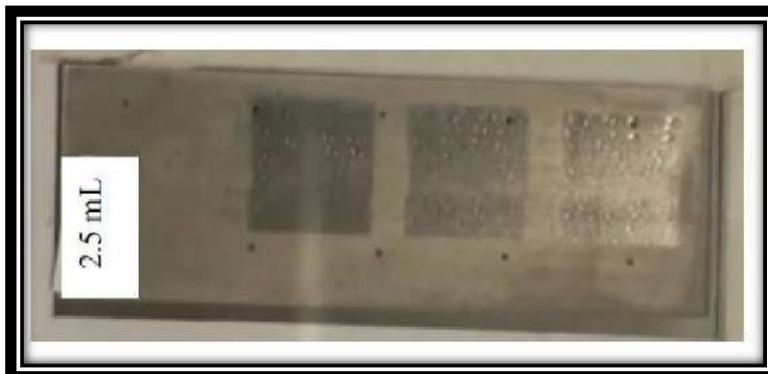
Fonte: Imagem da autora (2020).

5.1.2 Fluido de proporção 2.5:2.5

A figura 32 apresenta o fluido 2.5:2.5 impresso por *DoD* em cinco camadas superpostas, com o mesmo *template* da figura 27, ou seja, três quadrados dispostos lado a lado. Observa-se a maior homogeneidade do material depositado, associada à composição de maior viscosidade, devido ao aumento da concentração relativa de

MEG. O monoetilenoglicol atua como estabilizador das micropartículas e confere maior viscosidade ao fluido de impressão.

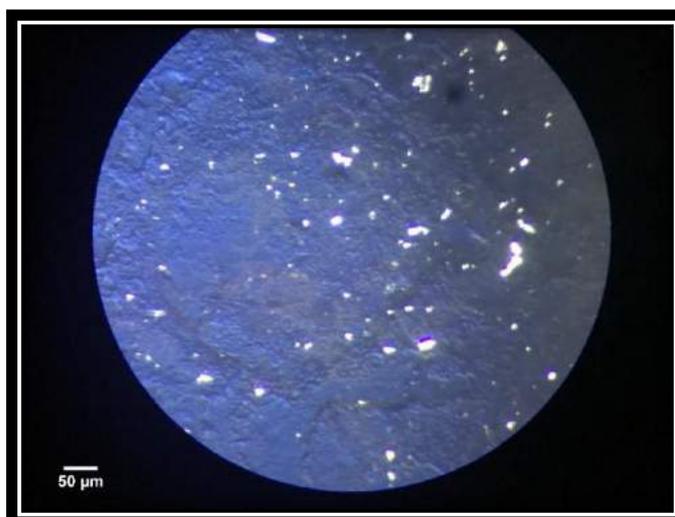
Figura 32– Fluido 2.5:2.5 impresso por tecnologia *DoD* sobre substrato de vidro



Fonte: Imagem da autora (2020).

A figura 33 apresenta os microcristais de guanina obtidos via impressão *DoD*, e a medida de distribuição de tamanho das partículas foi obtida por auxílio do software de processamento de imagens ImageJ, version 1.50, *public domain*, *National Institutes of Health*. O tamanho médio das partículas foi de $13.81 \pm 6.23 \mu\text{m}$, selecionando-se aleatoriamente 100 microcristais.

Figura 33– Imagem de microscopia óptica dos microcristais de guanina após etapas de nucleação-crescimento, obtidos via impressão *DoD*



Fonte: Imagem da autora (2020).

A forma dos cristais é alongada numa direção, aproximando-se de microbastões. Ao expor as amostras à luz polarizada, é possível se observar indícios

de iridescência. O processo de recristalização da guanina é realizado em meio alcalino, e provavelmente existem grupos OH^- e Na^+ inseridos na estrutura de forma a modificar alguns parâmetros interplanares dos cristais puros. Dessa forma, em etapa posterior serão feitos ensaios num meio para remoção de moléculas de NaOH , para se monitorar alterações nos processos de síntese aditiva de cor por iridescência, em função de alterações de homogeneidade e valores do índice de refração do meio.

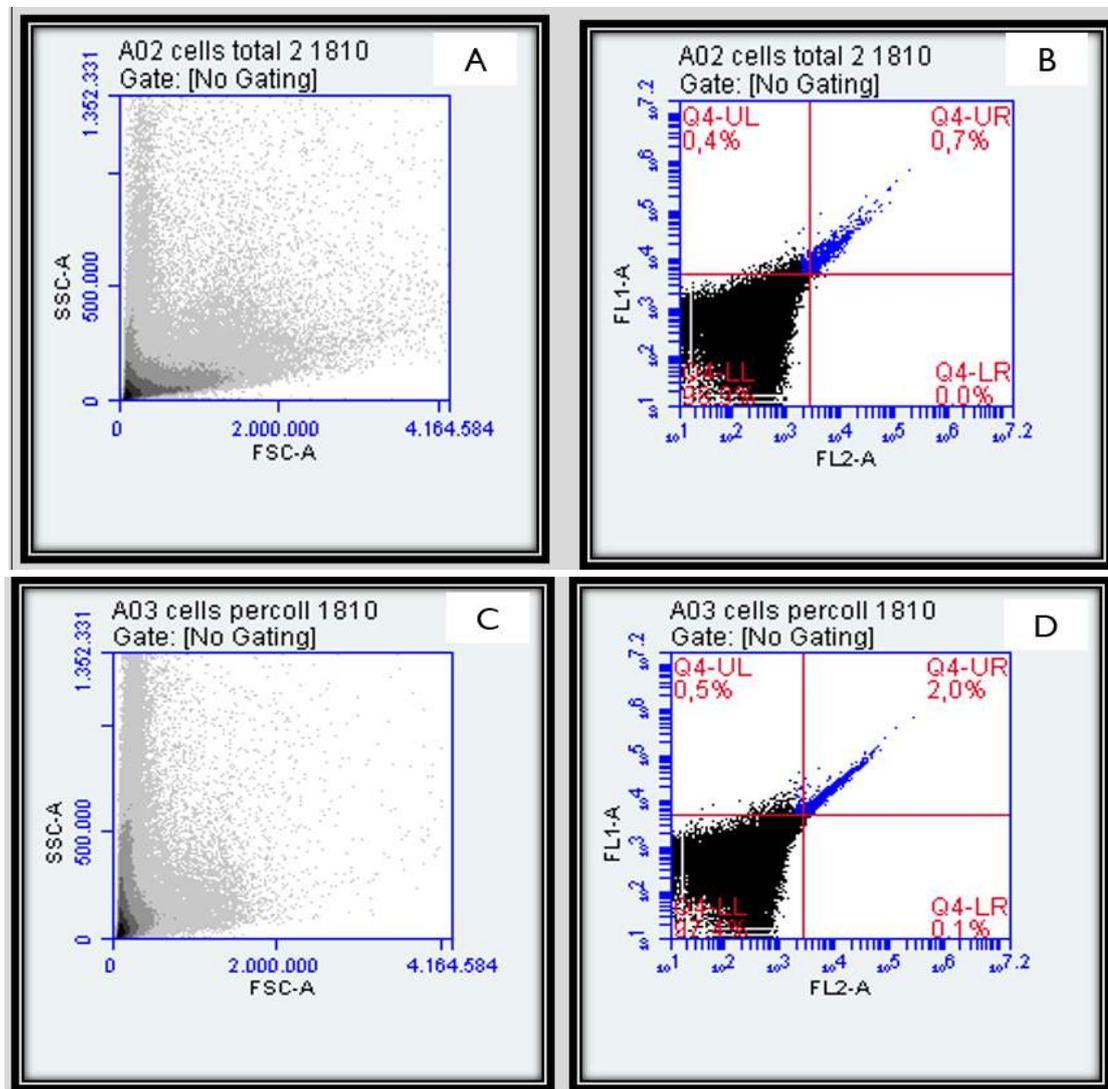
Pretende-se em trabalho posterior à tese imprimir esses cristais em templates que imponham uma organização com parâmetros compatíveis aos cristais fotônicos que resultam em iridescência pela ordem, para se confrontar com padrões desordenados, e posteriormente em substratos flexíveis para simular o efeito de ordem/desordem proposto para a explicação da iridescência dos peixes do gênero *Paracheirodon*.

5.2 CULTURA CELULAR DO PEIXE *PARACHEIRODON AXELRODI*

Em paralelo à impressão de fluido bioinspirado nos cristais presentes nas células iridóforas, procedeu-se com a tentativa de cultura dessas células para se avaliar a possibilidade de se produzir um fluido imprimível com elas.

Para obtenção das células totais, contendo as células iridescentes, foi realizado primeiramente um processo de dissociação celular da faixa lateral do peixe *P. axelrodi*. As células totais foram analisadas por citometria de fluxo, onde foi observado diferentes tipos celulares, tanto em tamanho/volume (FSC-dispersão frontal) quanto por complexidade (SSC-dispersão lateral) (figura 34A). Na figura 34B pode ser visto a dispersão celular utilizando dois canais de fluorescência, FL1 (verde) e FL2 (laranja).

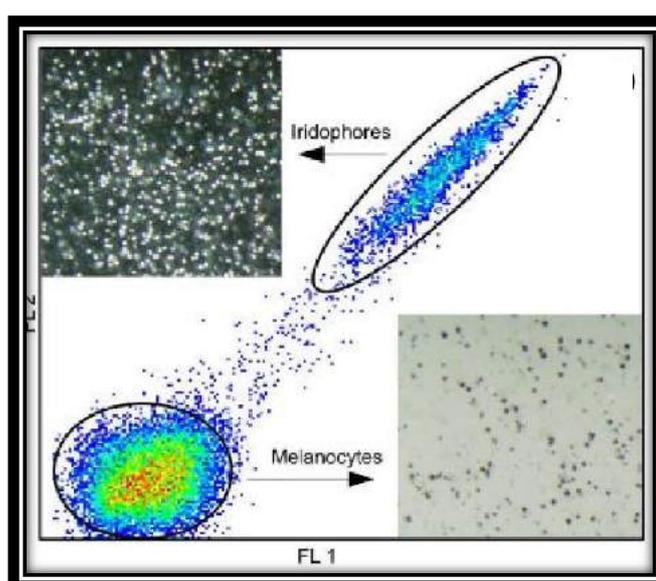
Figura 34– Visualização das células totais e iridescentes obtidas após dissociação tecidual da faixa lateral do peixe *Paracheirodon axelrodi*. Células totais após dissociação tecidual, SSC-A representa a complexidade celular e FSC-A o tamanho/volume celular (A); estratégia de análise de células iridescentes, canal FL1 (verde) e canal FL2 (laranja) (B); Células totais após dissociação tecidual e uso de gradiente de Percoll, SSC-A representa a complexidade celular e FSC-A o tamanho/volume celular (C); estratégia de análise de células iridescentes, após isolamento por gradiente de percoll, canal FL1 (verde) e canal FL2 (laranja) (D)



Fonte: Imagem da autora (2020).

Essa estratégia de visualização de células iridescentes foi previamente utilizada por Higton e colaboradores, a partir da fluorescência emitida por estas células (figura 35). Foi encontrado 0.7% de células iridóforas do total celular obtido (figura 34A). Utilizando gradiente de Percoll, para melhor purificação destas células, observou-se um aumento das células emissoras de fluorescência, 2% no quadrante positivo para as duas fluorescências (figura 34C e 34D), quando comparado com o extrato celular total.

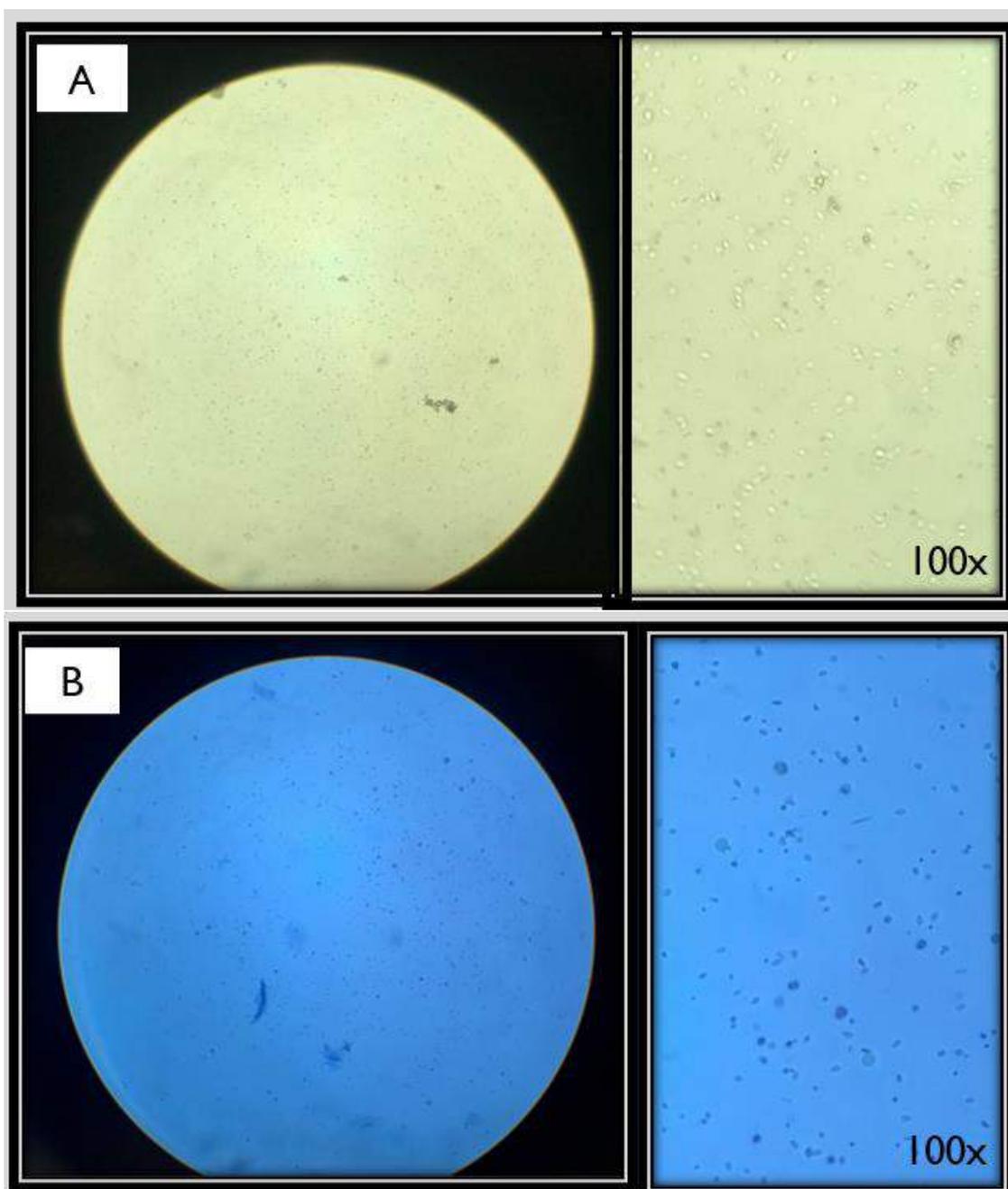
Figura 35– Estratégia de visualização de células iridescentes, utilizada por Higton e colaboradores, a partir da fluorescência emitida por estas células



Fonte: Higton et al (2013).

Após a dissociação das células da faixa letal do peixe *Paracheirodon axelrodi*, como descrito anteriormente, as células foram observadas no microscópio (figura 36A) e foi verificada a viabilidade celular através do Azul de Tripán (figura 36B).

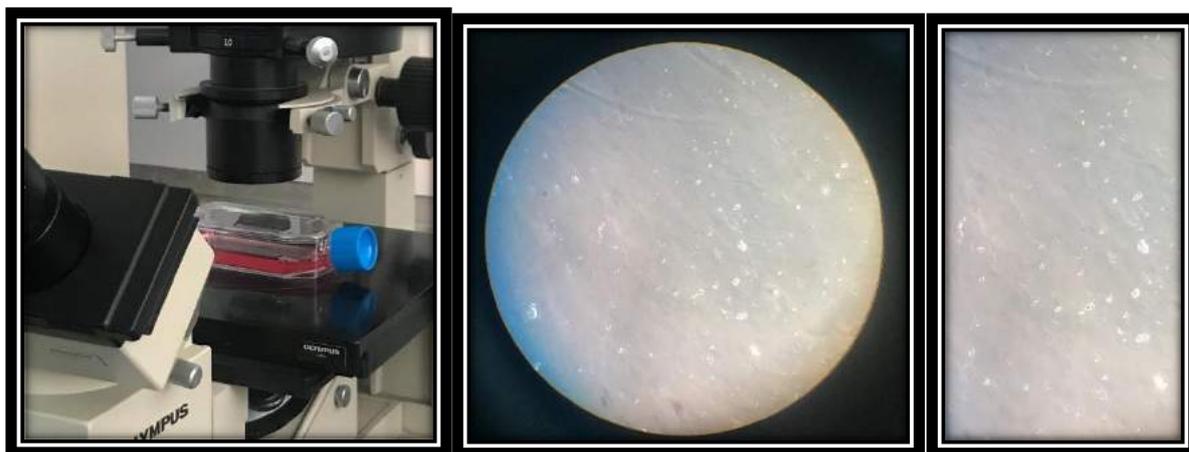
Figura 36– Análise das células após dissociação celular da faixa lateral. Visualização das células totais da faixa lateral do peixe *Paracheirodon axelrodi*, aumento de 100x (A) e análise de viabilidade celular colorida com solução de Azul de Tripán, com 98% de células viáveis (B)



Fonte: Imagem da autora (2020).

As células totais foram ressuspensas em meio L-15 Medium Leibovitz contendo 1% de antibiótico e solução antimicótica (1.000 U de penicilina, 1.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B mL⁻¹; Invitrogen) e 20% de soro fetal bovino (FBS) (Kapoor et al., 2013 e Avella et al., 1994) e em seguida foram colocadas em cultura (figura 37).

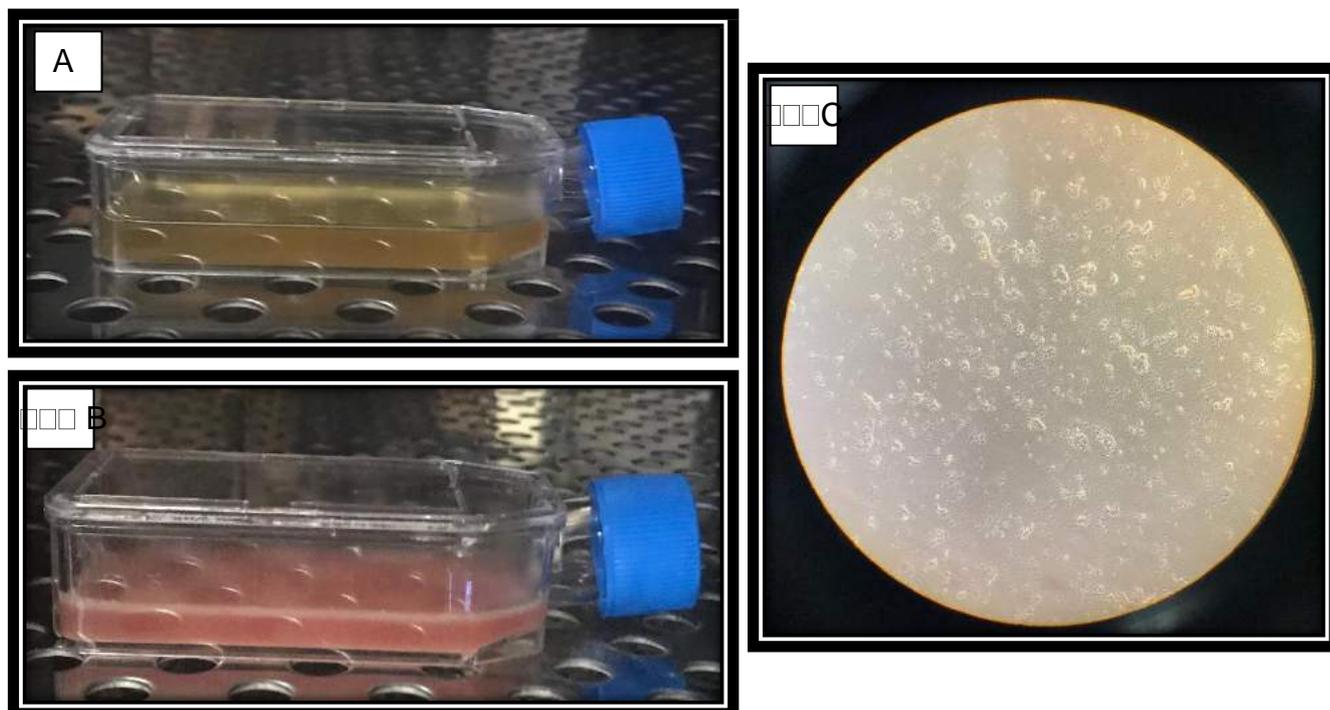
Figura 37– Cultura das células totais extraídas da faixa lateral do peixe *Paracheirodon axelrodi*. Visualização das células totais em garrafa de cultura através do microscópio invertido (Olympus)



Fonte: Imagem da autora (2020).

No segundo dia de cultura as células já consumiram quase todo o meio, o que pode ser observada pela coloração amarelada do meio de cultura (figura 38). Desse modo, de dois em dois dias as células eram observadas com auxílio de microscópio invertido (Olympus), o meio de cultura sobrenadante era removido e um novo era adicionado na garrafa de cultura. Após 2 dias, notou-se uma expansão celular (figura 38B e 38C).

Figura 38– Acompanhamento do cultivo celular das células totais obtidas da faixa lateral do peixe. Garrafa mostra o meio consumido pelas células a pois dois dias de cultura (A); expansão celular após uma semana de cultivo (B); visualização das células no microscópio após uma semana de cultivo (C)



Fonte: Imagem da autora (2020).

Pelo aspecto da cultura, ao final desse teste de cultivo, não se pode descartar que possa ter ocorrido contaminação por algum microrganismo. Assim, há necessidade de melhor padronização da cultura celular das células totais provenientes da faixa lateral do peixe *P. axelrodi*. Adicionalmente, para purificação e isolamento das células iridescentes será fundamental novas estratégias metodologias ainda não abordadas nesse trabalho, que como produto final resultou no fluido imprimível bioinspirado nas células do peixe, e não no fluido contendo essas células.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Após estudo da iridescência dos peixes do gênero *Paracheirodon*, conseguiu-se otimizar os primeiros fluidos bioinspirados nas células iridóforas observadas no peixe *Paracheirodon axelrodi*, que apresenta cristais de guanina no interior dessas células, como parte ativa do mecanismo de iridescência, e otimizou-se os parâmetros de microfluídica para impressão *Drop-on-Demand* através de superposição de camadas e posterior controle de cristalização.

A cristalização da guanina foi estudada a partir de soluções aquosas utilizando um ácido e uma base, e as condições ótimas de pH e concentração foram estabelecidas, a partir da caracterização por Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios-X (DRX) dos cristais de guanina formados.

Os Números de Reynolds (Re), Weber (We) e Ohnesorge (Oh) foram calculados para otimização da composição do fluido, e imagens de formação das gotas pela câmera *Drop Watcher* embarcada na impressora *DoD* permitiram a otimização dos parâmetros de impressão.

Com a dissociação das células da faixa lateral e a utilização do citômetro de fluxo, foi identificada uma distribuição de células iridescente no decido trabalhado.

Foi iniciada os primeiros testes de cultivo de células iridóforas do peixe *Paracheirodon axelrodi* em incubadora de CO₂, para serem incorporados em futuros fluidos imprimíveis, previsto como perspectivas decorrentes deste trabalho.

Fruto dos resultados desta tese, foi depositada no INPI uma patente intitulada: “Recobrimento iridescente imprimível contendo guanina cristalizada e respectivo processo de preparação”, BR1020200036033.

REFERÊNCIAS

ARNOTT, H. J.; PAUTARD, F. G. E. em **Biological Calcification**; Schraer, H., Ed.; Appleton-Century Crafts.; p 375, 1970.

ALVES E. A. e GUIMARÃES A. C. R. **Coleção Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde trata dos temas: biologia celular e ultraestrutura, histologia, técnicas histológicas, técnicas citológicas e cultivo celular.** volume 2, Capítulo 5, Cultivo celular, 2010.

AFS. **Guidelines for the use of fishes in research.** American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 90p. 2014.

BAR-COHEN, Y. **Biomimetics—using nature to inspire human innovation.** Bioinsp. Biomim. 1, 1-12, 2006.

BAAR, Y.; ROSEN, J.; SHASHAR, N. **Circular Polarization of Transmitted Light by Sapphirinidae Copepods.** Plos One. E86131, 2014.

BERGER, O.; YOSKOVITZ E.; ADLER-ABRAMOVICH L.; GAZIT E. **Spectral Transition in Bio-Inspired Self-Assembled Peptide Nucleic Acid Photonic Crystals** Adv Mater. Mar 16;28(11):2195-200, 2016.

BUCKUP, P.; MENEZES, N.; GHAZZI, M. **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil, Série Livros 23, UFRJ, Museu Nacional, 2007.**

CHAE, J. e NISHIDA, S. **Integumental ultrastructure and color patterns in the iridescent copepods of the Family Sapphirinidae (Copepoda: Poecilostomatoidea).** Marine Biol 119, 205-210. 1994.

CHAE, J. e NISHIDA, S. **Vertical distribution and diel migration in the iridescent copepods of the family Sapphirinidae: a unique example of reverse migration?** Mar. Ecol.: Prog. Ser. 119, 111-124, 1995.

HAE, J. e NISHIDA, S. **Spectral patterns of the iridescence in the males of Sapphirina (Copepoda: Poecilostomatoidea).** J Mar Biol Ass UK 79:437-443, Qualificação de Doutorado em Ciência de Materiais – UFPE, 1999.

CHAE, J. e NISHIDA, S. **Swimming behaviour and photoresponses of the iridescent copepods, *Sapphirina gastrica* and *Sapphirina opalina* (Copepoda: Poecilostomatoida).** J. Mar. Biol. Assoc. UK, 84, 727–731, 2004.

DENTON, E. J. **Review lecture: On the organization of reflecting surfaces in some marine animals.** Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, 258, DOI: 10.1098 / rstb.1970.0037, 1970.

E. J. DENTON, F. R. S. e M. F. LAND **Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods** Proc. R. Soc. London, Ser. B, 178, 43. DOI: 10.1098/rspb.1971.0051, 1971.

DE SÁ, G. F.; MALTA, O. L.; DE MELLO DONEGÁ, C.; SIMAS, A. M.; LONGO, R. L.; SANTA-CRUZ, P. A.; SILVA JR, E.F. **Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes.** Coordination Chemistry Reviews, v. 196, n. 1, 165-195. 2000.

DERBY, B. **Inkjet Printing of Functional and Structural Materials: Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution.** Annual Review of Materials Research, v. 40, 395-414. 2014.

DORNELAS C. B.; RESENDE D. K.; ROCHA H. V.; GOMES A. S.; TAVARES M. I. B. **Evaluation of use of organophilic montmorillonite and its polymeric intercalated derivatives in preparation of new pharmaceutical materials,** Polímeros, <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282008000300007> 18, 222, 2008.

DOUCET, S. M. e MEADOWS, M. G. J. R. **Iridescence: a functional perspective.** Soc. Interface, 6, S115, 2009.

DUINEVELD, P.C.; DE KOK, M. A.; BUECHEL, M.; SEMPEL, A. H.; MUTSAERS, K. A. H.; DE WEIJER, P.; CAMPS, I. G. J.; VAN DE BIGGELAAR, T. J. M.; RUBINGH, J.-E. J. M.; HASKAL, E. I. **Ink-jet printing of polymer light-emitting devices.** Proc. Conf. Org. Light-Emit. Mater. Devices, v. 4464, 59–67, 2002.

FOX, D. L. em **Animals Biochromes and Structural Colours;** Cambridge University Press: Cambridge. 449p, 1953.

FRANCESCHI V. R. e HORNER Jr. H. T. **Calcium oxalate crystals in plants.** Bot Rev 46: 361-427. 1980.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** 4. ed. Nova York: Wiley-Liss,. 397 p. 1994.

M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G. A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H. P. HRATCHIAN, A. F. IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J. L. **SONNENBERG, M. Had, “Gaussian 09, Revision D.01.”** 2009.

GALUSHA, J. W.; RICHEY, L. R.; JORGENSEN, M. R.; GARDNER, J. S.; BARTL, M. H. **Study of natural photonic crystals in beetle scales and their conversion into inorganic structures via a sol-gel bio-templating route.** J. Mater. Chem., 20, 1277, 2010.

GUIDARA S.; BEN AHMED A.; ABID Y.; e FEKI H.; “**Molecular structure, vibrational spectra and nonlinear optical properties of 2,5-dimethylanilinium chloride monohydrate: A density functional theory approach,**” Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc., vol. 127, pp. 275–285, 2014.

GUILLE K. e CLEGG W. “**Anhydrous guanine: A synchrotron study,**” Acta Crystallogr, Sect. C Cryst. Struct. Commun., vol. 62, no. 8, pp. 515–517, 2006.

GUR D.; POLITI Y.; SIVAN B.; FRATZL P.; WEINER S.; ADDADI L. **Guanine-based photonic crystals in fish scales form from an amorphous precursor.** Chem., Int. Ed., 52, 388, 2013.

GUR, D.; LESHEM, B.; PIERANTONI, M.; FARSTEY, V.; ORON, D.; WEINER, S.; ADDADI, L. **Structural Basis for the Brilliant Colors of the Sapphirinid Copepods.** J. Am. Chem. Soc. 137, 8408, 2015.

GUR, D.; PIERANTONI, M.; DOV, E.N.; FELDMAN, Y.; WEINER, S.; ADDADI, L. **Guanine crystallization in aqueous solutions enables control over crystal size and polymorphism.** Cryst. Growth Des., 16 (9), 4975–4980, 2016.

HILL, G. E. e MCGRAW, K. J. **Bird Coloration; Function and evolution,** Vol II, Harvard University Press, 2006.

HIRATA, M.; NAKAMURA, K.; KANEMARU, T.; SHIBATA, Y.; KONDO, S. **Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish.** Developmental Dynamics, 227,497–503, 2003.

HOGERS B.; GROSS D.; LEHMANN V.; DE GROOT H. J. M.; GITTENBERGER-DE GROOT A. C.; OELMANN R. E. **Magnetic resonance microscopy at 17.6-Tesla on chicken embryos *in vitro*.** J Magn Reson Imaging; 14:83–86, 2001.

HOOKE, R. **Micrographia,** reprinted by Dover Publications, Inc., New York. 2003.

JOHNSEN, S. **Hide and Seek in the Open Sea: Pelagic Camouflage and Visual Countermeasures.** Annu. Rev. Mar. Sci. 6, 9.1-9.24, 2014.

KESONG, L. e JIANG, L. **Bio-inspired design of multiscale structures for function integration.** Nano Today 6, 155-175, 2011.

KESSENTINI, A.; BEN AHMED, A.; DAMMAK, T.; BELHOUCHE, M. **DFT computations on: Crystal structure, vibrational studies and optical**

investigations of a luminescent self-assembled material, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc., vol. 191, 241–248, 2018.

KINOSHITA, S.; YOSHIOKA, S.; KAWAGOE, K. **Mechanisms of structural colour in the Morpho butterfly: cooperation of regularity and irregularity in an iridescent scale**. Proc. R. Soc. London Ser. B 269, 1417, 2002.

KINOSHITA, S. e YOSHIOKA, S. **Structural Colors in Nature: The Role of Regularity and Irregularity in the Structure**. ChemPhysChem. 6, 1442-1459, 2005.

KINOSHITA, S. e YOSHIOKA, S. **Structural Colors in Biological Systems: Principles and Applications**; Osaka University Press: Osaka, Japan. 2005b.

KINOSHITA, S.; YOSHIOKA, S.; MIYAZAKI, J. **Physics of structural colors**. Rep. Prog. Phys.71, 076401. 2008.

LAND, M. F. **The physics and biology of animal reflectors**. Prog. Biophys. Molec. Biol. 24, 75- 106. 1972.

LEE, E.; MIYAZAKI, J.; YOSHIOKA, S.; LEE, H.; SUGITA, S. **The Weak Iridescent Feather Color in the Jungle Crow *Corvus macrorhynchos***. Ornithol Sci. 11, 59. 2012.

LEMOS J. R. G.; Oliveira A. T.; Santos M. Q. C.; Pereira C. N.; Nascimento R. B.; Tavares-Dias M. **Influência do transporte na relação peso-comprimento e fator de condição de *Paracheirodon axelrodi* (Characidae)**. Biota Amazonia, 2015.

LEVY-LIOR, A.; POKROY, B.; LEVAVI-SIVAN, B.; LEISEROWITZ, L.; WEINER, S.; ADDADI, L. **Biogenic Guanine Crystals from the Skin of Fish May Be Designed to Enhance Light Reflectance**. Crystal Growth & Design, 8, 2, 508-511, 2008.

LIU, K. e JIANG, L. **Bio-inspired design of multiscale structures for function integration**. Nano Today, 6, 155-175, 2011.

LI, Q.; ZENG, Q.; SHI, L.; ZHANG, X.; KE-QIN ZHANG. **Bio-inspired sensors based on photonic structures of Morpho butterfly wings: a review**. Journal of Materials Chemistry C. DOI: 10.1039/c5tc04029a, 2016.

LAND M. F. **A Multilayer Interference Reflector in the Eye of the Scallop, *Pecten Maximus*** Journal of Experimental Biology, 45: 433-447. 1966.

LAND M. F. **The physics and biology of animal reflectors**. Prog. Biophys. Mol. Biol. 24, 75. 1972.

LAUDER G. V.; MADDEN P.G.A.; TANGORRA J.L.; ANDERSON E. e BAKER, T. V. **Bioinspiration from fish for smart material design and function**. Smart Materials and Structures, 20, 9, 2011.

LOCKET, N. A. **Deep-sea fish retinas**. Br. Med. Bull., 26, 107, 1970.

LOWENSTAM, H. A. e WEINER, S. In: **Biom mineralization**; Oxford University Press: New York. 1989.

LYTHGOE, J. N. e SHAND, J. **Changes in spectral reflexions from the iridophores of the neon tetra**. f. *Physiol.* 325,23-34, 1982.

LYTHGOE, J. N. **The ecology, function and phylogeny of iridescent multilayers in fish corneas**. In **Light as an Ecological Factor II** (G. C. Evans, R. Bainbridge and O. Rackham, eds), pp. 21 1-247. Oxford: Blackwell Scientific, 1976.

MARTIN, G. D.; HOATH, S. D.; HUTCHINGS, I. M. **Inkjet printing: the physics of manipulating liquid jets and drops**. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 105, n. 1, 14. 2008.

MCKENZIE, D. e LARGE, M. **Multilayer reflectors in animals using green and gold beetles as contrasting examples**. *J. Exp. Biol.* 201, 1307. 1998.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel Análise Química Quantitativa**, 6a. ed., LTC. 2008.

MERRIFIELD D.; MULLIN J.; GALLAGHER L.; TUCKER C.; JANSEN M. A.; DENVIR M.; HOLMES W. M. **Rapid and Recoverable *in vivo* Magnetic Resonance Imaging of the Adult Zebrafish at 7 T**, *Magnetic Resonance Imaging* doi: 10.1016/j.mri.2016.10.013, 2016.

MILLOT, J. **Le pigment purique chez les vertebres inferieurs**. *Bull. Biol. France et Belgique*, lvii, pp. 261-363, pls. 9-12, 1923.

OOSTENBRINK, C.; SOARES, A.T.; VAN DER VEGT, A. F. N.; VAN GUNSTEREN, F. W. **Validation of the 53A6 GROMOS force field**. *Eur. Biophys. J.*, 273–284, 2005.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. **A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6**. *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, 1656–1676, 2004.

ORTMANN F.; HANNEWALD, K. e BECHSTEDT F. **Guanine Crystals: A First Principles Study** *J. Phys. Chem. B*, 112, 1540-1548, 2008.

OXFORD, S. G.; GILLESPIE, G. R. **Evolution and ecology of spider coloration**. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 619-643, 1998.

PARKER A. R., **“515 million years of structural color,”** *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2, R15–R28, 2000.

PARKER, A. R.; WELCH, V. L.; DRIVER, D.; MARTINI, N. **Structural colour: Opal analogue discovered in a weevil**. *Nature*, 426, 786. 2003.

PAVARINI, E.; ANDREANI, L. C.; SOCI, C.; GALLI, M.; MARABELLI, F.; COMORETTO, D. **Band structure and optical properties of opal photonic crystals**. Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys., 72, 045102, 2005.

PRUM R.O. **Anatomy, physics and evolution of avian structural colours**. In: Hill G.E, McGraw K.J, editors. Bird coloration, vol. I: mechanisms and measurements. Harvard University Press; Boston: pp. 295–353, 2006.

REIS, N. e DERBY, B. **Ink jet deposition of ceramic suspensions: modelling and experiments of droplet formation**. MRS Proceedings, 625, 2000.

RESENDE D. K.; DORNELAS C. B.; TAVARES M. I. B.; GOMES A. S.; MOREIRA L. A.; CABRAL L. M.; SIMEONI L. A.; **Preparation of modified clay with cetylpyridinium chloride and evaluation of their interaction with PVC** Polímeros, 20, 3 São Carlos jul./set. 2010, Epub 20-Ago, 2010.

RU, C.; LUO, J.; XIE, S. e SUN, Y. **A review of non-contact micro- and nano-printing technologies**. Journal of Micromechanics and Microengineering, 24, 5, 1 – 11, 2014.

SABBATINI, N.; GUARDIGLI, M. e LEHN, J. M. **Luminescent lanthanide complexes as photochemical supramolecular devices**. Coordination Chemistry Reviews, 123, 1-2, 201–228, 1993.

SARANATHAN, V.; OSUJI, C. O.; MOCHRIE, S. G. J.; NOH, H.; NARAYANAN, S.; SANDY, A.; DUFRESNE, E. R.; PRUM, R. O. **Structure, function, and self-assembly of single network gyroid (I4132) photonic crystals in butterfly wing scales**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 11676, 2010.

SHARMA, V.; CRNE, M.; PARK, J. O. e SRINIVASARAO, M. **Structural Origin of Circularly Polarized Iridescence in Jeweled Beetles**. Science, 325, 449, 2009.

SILVA, K. M. S.; SANTA-CRUZ, P. A., **Recobrimento iridescente imprimível contendo guanina cristalizada e respectivo processo de preparação**, Patente depositada no INPI BR1020200036033, 20/02/2020.

SMITH B. R.; JOHNSON G. A.; GROMAN E. V. e LINNEY E. **Magnetic resonance microscopy of mouse embryos**. Proc Natl Acad Sci U S A 91,3530–3533, 1994.

SOUSA, F. L. N. **Filmes super-hidrofóbicos biomimetizados a partir de estruturas hierárquicas de superfície de folhas de espécies vegetais da Caatinga**. Dissertação de Mestrado. 72p. 2017.

STAVENGA, D. G.; WILTS, B. D.; LEERTOUWER, H. L.; HARIYAMA, T **Polarized iridescence of the multilayered elytra of the Japanese jewel beetle, Chrysochroa fulgidissima**. Philos. Trans. R. Soc.366, 709. 2011.

STUART-FOX, D. e MOUSSALLI, A. PHILOS. **Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms.** Trans. R. Soc., B, 364, 463, 2009.

SOUZA SILVA, S. T.; SANTA-CRUZ, P. A., **Dispositivo pré-concentrador com parte ativa viva para análise de traços de micropoluentes em água e respectivo processo de funcionamento**, Patente depositada no INPI BR102020003546-0, 20/02/2020

TEYSSIER, J.; SAENKO, S. V.; VAN DER MAREL, D.; MILINKOVITCH, M. C. **Photonic crystals cause active colour change in chameleons.** Nat. Commun., 6,6368, 2015.

THEWALT, U.; BUGG, E. C. e MARSH, E. R. **The crystal structure of guanine monohydrate.** Acta Cryst. B27, 2358-2363, 1971.

KATE D. L. UMBERS, SCOTT A. FABRICANT, FELIPE M. GAWRYSZEWSKI, AINSLEY E. SEAGO, MARIE E. **Herberstein Reversible colour change in Arthropoda.** Biological Reviews, 89(4) Version of Record online: 4 FEB, 2014.

VIGNOLINI, S.; RUDALL, P. J.; ROWLAND, A. V.; REED, A.; MOYROUD, E.; FADEN, R. B.; BAUMBERG, J. J.; GLOVER, B. J.; STEINER, U. **Pointillist structural color in Pollia fruit.** Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 15712., 2012.

VUKUSIC, P.; SAMBLES, J. R.; LAWRENCE, C. R.; WOOTTON, R. J. **Quantified interference and diffraction in single Morpho butterfly scales.** Proc. R. Soc. London, Ser. B 1999, 266, 1403.

VUKUSIC, P.; SAMBLES, J. R.; LAWRENCE, C. R. **Structural colour: Colour mixing in wing scales of a butterfly.** Nature, 404, 457. 2000.

WILTS, B. D.; MICHIELSEN, K.; DE RAEDT, H.; STAVENGA, D. G. **Sparkling feather reflections of a bird-of-paradise explained by finitedifference time-domain modeling.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111, 4363. 2014.

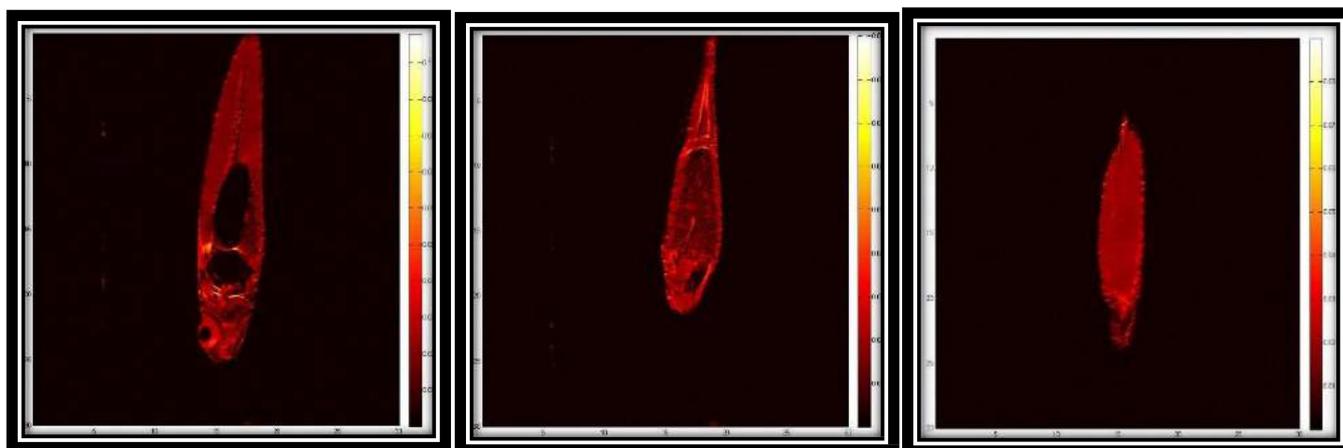
YOSHIOKA, S.; MATSUHANA, B.; TANAKA, S.; INOUYE, Y.; OSHIMA, N.; KINOSHITA, S. **Mechanism of variable structural colour in the neon tetra: quantitative evaluation of the Venetian blind model.** J. R. Soc. Interface 8, 56-66. 2011.

ZI, J.; YU, X.; LI, Y.; HU, X.; XU, C.; WANG, X.; LIU, X.; FU, R. **Coloration strategies in peacock feathers.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 12576, 2003.

ANEXO A – IMAGEAMENTO POR RMN

Estudos iniciais pioneiros de imageamento da banda lateral do peixe por RMN resultaram nas imagens apresentadas na figura 39, obtidas com o peixe levado a óbito imediatamente antes da inserção no magneto do equipamento, no entanto havia-se o objetivo de se tentar registrar imagens em tempo real com o peixe sendo levado a óbito dentro do magneto do equipamento, porém, devido a problemas técnicos na instrumentação, as medidas foram interrompidas.

Figura 39– Primeiras imagens obtidas por RMN do peixe *Parecheirodon axelrodi*, analisado três profundidades de corte longitudinais diferentes, sendo a terceira, mais próxima do tecido subepitelial onde se encontram os iridóforos da banda lateral nanoestruturada

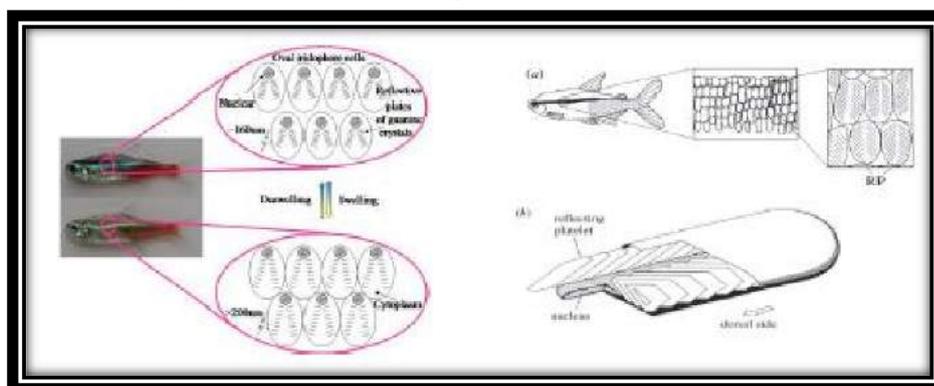


Fonte: Imagem da autora (2020).

ANEXO B – MECANISMOS PROPOSTO PARA IRIDESCÊNCIA DA BANDA LATERAL DOS GENERO PARACHEIRODON (Interações com o estágio Pós-doutoral do Dr. José Lúcio Bezerra Jr.).

Segundo a literatura (YOSHIOKA et al., 2011.) o mecanismo de iridescência presente na linha lateral dos peixes do gênero *Paracheirodon* está associado à variação de pressão osmótica no interior das células iridóforas, por abertura e fechamento de canais iônicos induzidos por estímulos externos ou do sistema nervoso central do peixe. A variação da pressão osmótica levaria a mudança no espaçamento nanométrico de estruturas lamelares de cristais de guanina, alterando o comprimento de onda associada à interferência construtiva da luz, e a cor da iridescência, conforme mostrado na figura. 40.

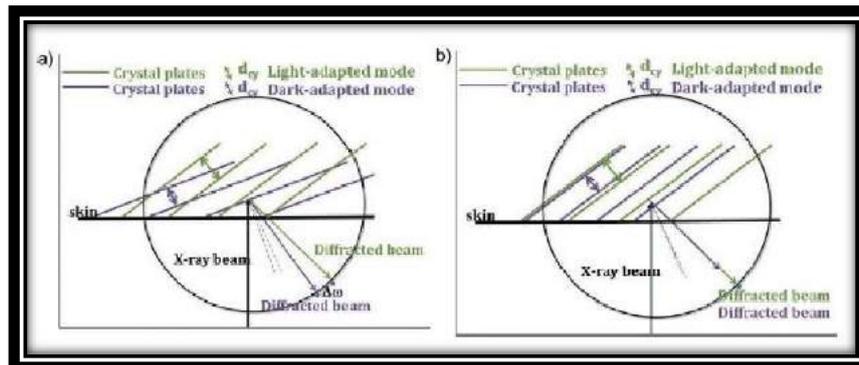
Figura 40– Aumento da pressão osmótica nos iridóforos levaria o espaçamento de 160 nm para 200 nm entre as palhetas de cristais de guanina, alterando a cor da iridescência



Fonte: YOSHIOKA et al., 2011.

Dois modelos passaram a ser apresentados para explicar a variação de cor nos peixes desse gênero, o modelo de venezianas (Venetian blind), mostrado na figura 41 (a), e o modelo de acordeon, associado à pressão osmótica, mostrado na figura 41 (b).

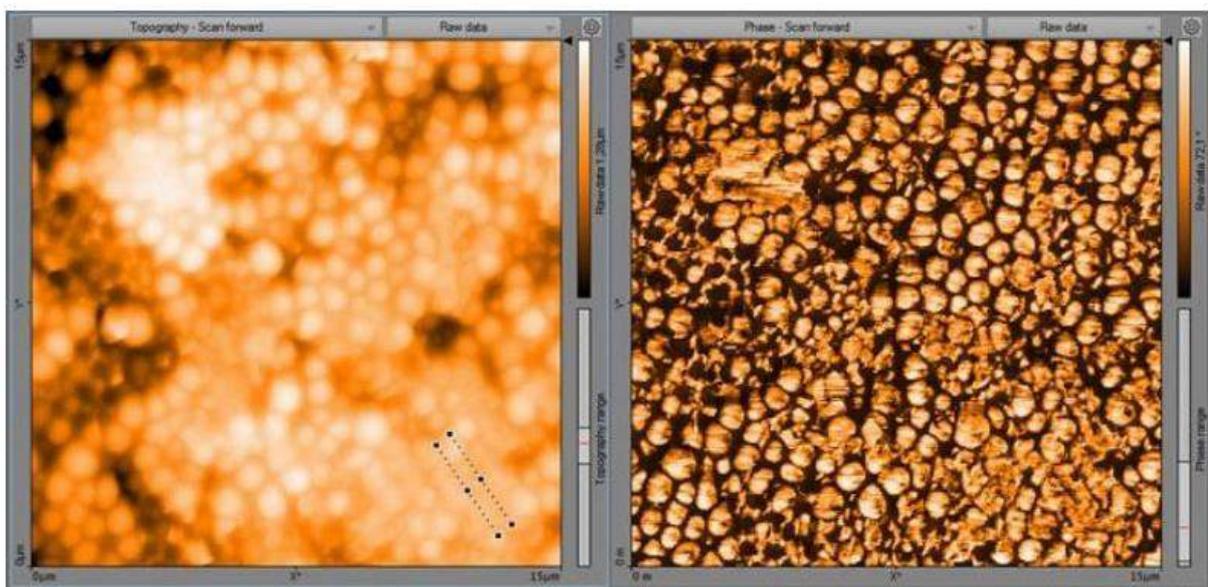
Figura 41– Modelos para iridescência dos peixes *Paracheirodon* (a) Modelo “veneziana” e (b) Modelo “acordeon”



Fonte: GUR et al., 2015.

No entanto, medidas de microscopia de força atômica obtidas durante o estágio pós-doutoral do Dr. José Lúcio Bezerra Júnior no nosso Grupo levaram a uma proposta de novo modelo, apresentado na 10th *International Conference of Nanophotonics*. Este modelo baseia-se em mecanismos de ordem-desordem de cristais fotônicos de guanina dispersos na forma de nanopartículas esféricas, conforme imagem obtida por AFM do tecido subepitelial da banda lateral do peixe, mostrado na figura 42.

Figura 42– AFM do tecido subepitelial da banda lateral do *Paracheirodon axelrodi*



Fonte: Bezerra Jr. J. L, Santa-Cruz, P.A. ICNP 2018.

Neste novo modelo proposto, a variação do espaçamento entre as nanoestruturas estaria associada à variação de cor, como cristais fotônicos em Opalas. Um efeito ordem- desordem associado a este modelo levaria ao desaparecimento da cor da linha lateral do peixe após óbito, observado em nosso grupo figura 43.

Figura 43– Imagem do *Paracheirodon axelrodi* com desaparecimento da iridescência azul associada aos iridóforos, após óbito. A cor vermelha do ventre é atribuída a absorção, por pigmento de cromóforos



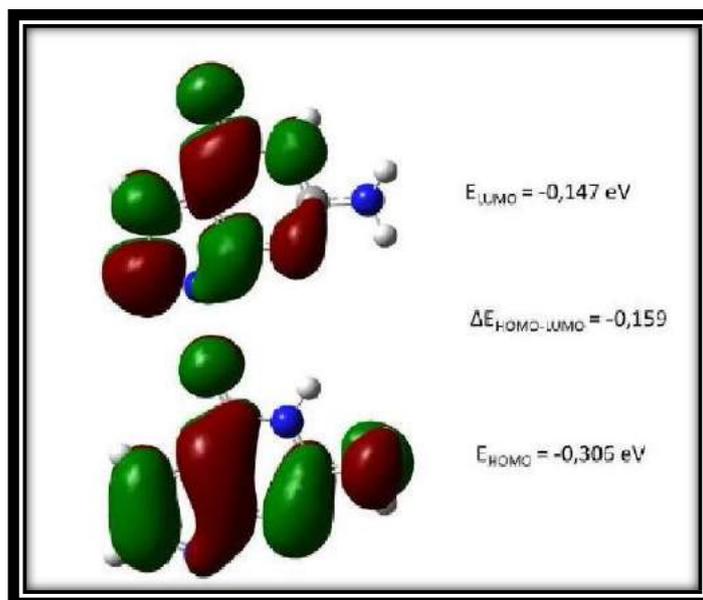
Fonte: Imagem da autora (2020).

ANEXO C – MÉTODOS COMPUTACIONAIS E CRISTAIS DE GUANINA

(Interações com o estágio Pós-doutoral da Dra. Daniela Nadvorny).

A representação dos orbitais de fronteira para a guanina anidra está apresentada na figura 44. Os valores das energias para os orbitais HOMO e LUMO calculados foram, -0,306 e -0,147 eV respectivamente, sendo o gap -0,159 eV (figura 44).

Figura 44– superfície dos orbitais HOMO e LUMO da guanina anidra calculada pelo método DFT B3LYP/6-31++G(d,p)



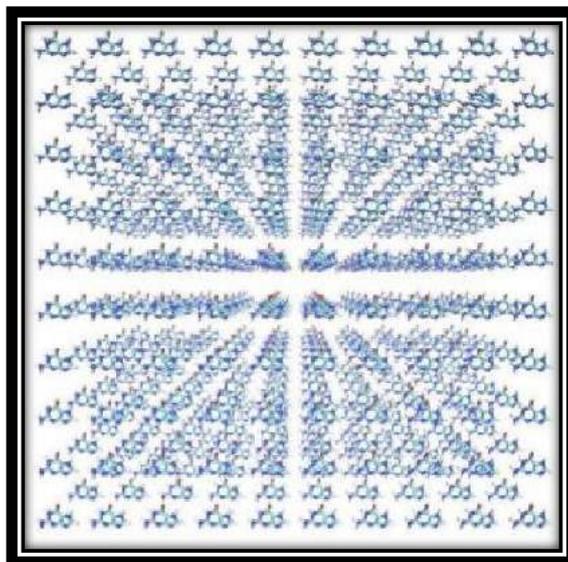
Fonte: Imagem da autora (2020).

Esta diferença de energia entre os orbitais de fronteira é uma característica importante para determinação de propriedades de transporte elétrico molecular, pois é uma medida relacionada à transferência de carga (Guidara et al., 2014). Desta forma, o entendimento destes parâmetros pode auxiliar na compreensão do comportamento das moléculas inseridas nos cristais de guanina, pois a forma de interação no interior do cristal reflete diretamente na auto-organização dos cristais entre si.

Outra abordagem que pode possivelmente apontar diferentes aspectos referente às interações da guanina e a auto-organização dos cristais envolve a

dinâmica molecular. A figura 45 apresenta o sistema simulado com representação implícita das moléculas do solvente (água).

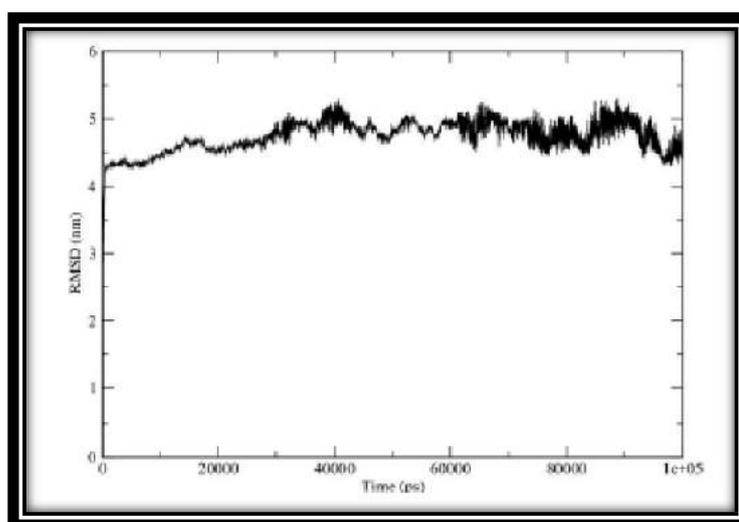
Figura 45– Representação do sistema guanina anidra simulado por dinâmica molecular



Fonte: Imagem da autora (2020).

Inicialmente verificamos o desvio médio quadrático (RMSD) das coordenadas ao final da simulação, onde é possível observar que o equilíbrio foi atingido figura 46.

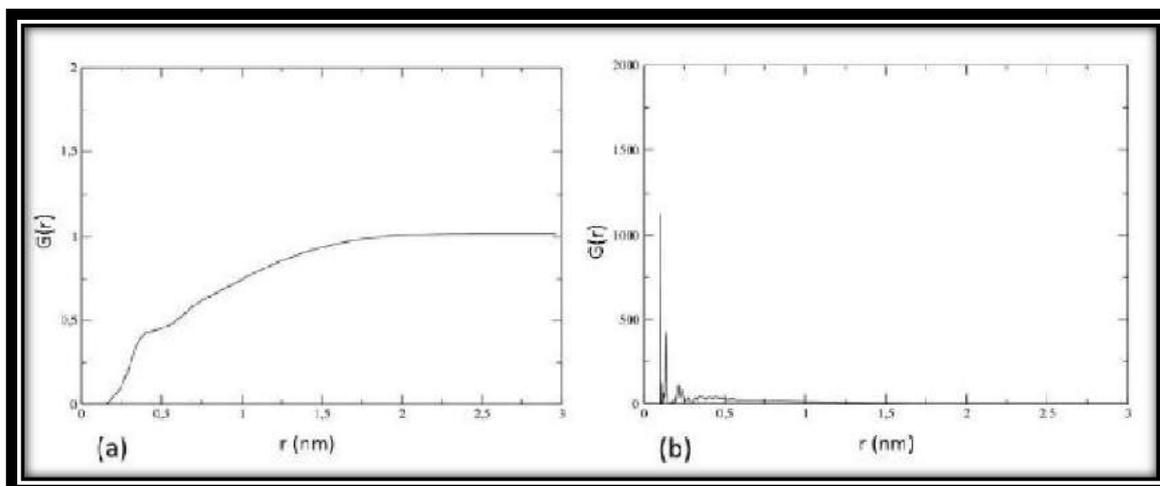
Figura 46– RMSD calculado para o sistema simulado incluindo a guanina anidra e solvente



Fonte: Imagem da autora (2020).

Em seguida, foram avaliadas as funções de distribuição radial (RDF) da guanina anidra tanto em relação ao solvente quanto entre suas próprias moléculas (figura 47e 47b).

Figura 47– RDF da guanina em relação a água (a) e suas próprias moléculas (b)



Fonte: Imagem da autora (2020).

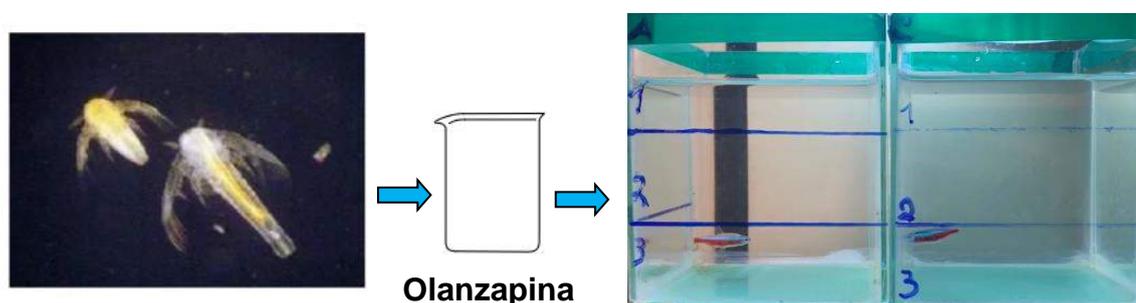
Foi observado que não há interação entre o solvente e a guanina, diferente do que ocorre quando a mesma propriedade é calculada entre suas próprias moléculas. Este comportamento já é esperado, uma vez que a guanina se encontra num ambiente aquoso na natureza, e seu caráter hidrofóbico deve ser evidenciado. Ao contrário, o que ocorreria seria uma dispersão da sua estrutura cristalina no meio fisiológico. No entanto, é interessante verificarmos que entre si, a guanina é capaz de formar camadas de empacotamento, o que é um importante indício de sua auto-organização e a partir destes resultados é possível se compreender de forma mais precisa este processo.

ANEXO D - ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS PEIXES, INICIADO COM A DROGA OLANZAPINA

Pretende-se dar continuidade a um estudo comportamental dos peixes já iniciado, e acompanhar a dinâmica da faixa lateral onde essas células iridóforas se encontram em função da presença de nanocontaminantes da água. Nesta primeira etapa iniciou com a droga olanzapina, com atividades neurológicas, vetorizadas através de artêmias vivas, alimentos naturais dos peixes. Também pretende-se avaliar protocolos para neuroxicidade usando a observação da linha lateral iridescente dos peixes do gênero *Paracheirodon*, alimentados por náuplios dessas artêmias expostos a nanoestruturas de carbono.

O objetivo desses ensaios envolve uma segunda prova de conceito, para avaliar possíveis aplicações dos sistemas imprimíveis em dispositivos bioinspirados para monitoramento ambiental e a partir da correlação entre a neurotoxicidade e mudanças na coloração de faixa lateral iridescente e motilidade alterada dos peixes, a figura 48 ilustra os experimentos em andamento do início desta segunda etapa.

Figura 48– Exposição dos náuplios de artêmias à olanzapina para vetorização do fármaco aos peixes do gênero *Paracheirodon*, para análise comportamental objetivando a bioinspiração de dispositivos imprimíveis



Fonte: Imagem da autora (2020).