

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Programa de Pós-graduação em Física**

Livia Maria Barros Campos

**RESVERATRONE:**  
**caracterização óptica e aplicação como marcador**  
**fluorescente em biomateriais.**

Belo Horizonte  
2024

Livia Maria Barros Campos

**RESVERATRONE:  
caracterização óptica e aplicação como marcador  
fluorescente em biomateriais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada e Interdisciplinar do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Ana Maria de Paula

Belo Horizonte

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C198r Campos, Livia Maria Barros.  
Resveratrone: caracterização óptica e aplicação como marcador  
fluorescente em biomateriais / Livia Maria Barros Campos. – 2024.  
56 f. : il.

Orientadora: Ana Maria de Paula.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Física.  
Bibliografia: f. 52-54.

1. Resveratrol. 2. Propriedades ópticas. 3. Fotoluminescência. I. Título.  
II. Paula, Ana Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Física.

CDU – 535 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

A presente dissertação, intitulada “**Resveratrone: caracterização óptica e aplicação como marcador fluorescente em biomateriais**”, de autoria de **LÍVIA MARIA BARROS CAMPOS**, submetida à Comissão Examinadora, abaixo-assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM FÍSICA** em vinte um de agosto de 2024.

Belo Horizonte, 21 de agosto de 2024.

Profa. Ana Maria de Paula  
Orientadora da aluna  
Departamento de Física/UFMG

Profa. Karla Balzuweit  
Departamento de Física/UFMG

Profa. Danielle Cristina Teles Ferreira  
Instituto Federal de Minas Gerais



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karla Balzuweit, Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Cristina Teles Ferreira, Usuária Externa**, em 26/08/2024, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3485904** e o código CRC **DE3CAB8A**.



# AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Maria de Paula, não só pela orientação, mas por ser uma grande inspiração na carreira científica. Obrigada pelos conselhos e por me fazer colocar os pés no chão.

Agradeço aos meus pais, Simone e Salatiel, por sempre colocarem meus estudos e os da minha irmã em primeiro lugar. E também à minha irmã Julia, pela parceria e pelo caminho que me ajudou a trilhar mesmo de longe.

Ao Pedro, pelo companheirismo, paciência e cuidado comigo. Aos meus sogros pelo acolhimento durante esses anos de mestrado e fim da graduação.

Ao meu professor do ensino médio Toninho Costa, sem ele eu não estaria cursando o caminho científico.

Aos meus amigos da graduação e pós-graduação: Doris, Ana, De Leo, Álvaro, Rasta, Paulista, Natália, Thiago, João Márcio, Gabriel, Bruno, e vários outros que foram meu suporte nesses longos anos.

À Barbara e Laura, sinônimos de amizade. A todos do laboratório de Biofotônica, em especial Gladystone e Barbara, pelos desabafos e conversas. Ao Mychel, pela orientação e conhecimento.

Agradeço ao Laboratório de Física Biológica por fornecer o Resveratrol e outros insumos, principalmente Profa. Livia, João Renato e Malu. À professora Karla por me ajudar nas medidas de Microscopia Eletrônica. Ao LCPnano pelos equipamentos e laboratório de química. Ao CTnano e Kennedy pela ajuda com o espectrofotômetro e medidas de absorção. Ao Instituto de Ciências Biológicas pelas nanofibras e culturas celulares, principalmente Profa. Luciana, Jorge, Nicolý e Ítallo.

Ao Departamento de Física e a Pós-graduação em Física por toda a infraestrutura disponível durante o mestrado.

Agradeço principalmente o CNPq, Capes e Fapemig pelo financiamento.

# RESUMO

Resveratrone é um novo composto fluorescente formado pela irradiação do trans-Resveratrol com luz UV. Já se foi determinada sua grande seção de choque de absorção, tornando-o adequado para marcação fluorescente em bioimagens. Neste trabalho, estudamos as propriedades ópticas não-lineares do Resveratrone e demonstramos sua aplicação na marcação de nanofibras de acetato de celulose. Estas fibras são usadas como “scaffolds” na engenharia de tecidos, onde a visualização por microscopia de dois fótons ganha vantagem pela melhor resolução tridimensional e menor fotodano para a amostra. O objetivo do trabalho é determinar propriedades ópticas do composto, visualizar o arranjo das fibras e medir a profundidade de penetração das células cultivadas no “scaffold”. A caracterização óptica foi feita por medidas de absorção para soluções de Resveratrone e de Resveratrol em três solventes diferentes (metanol, isopropanol e etanol) em diferentes concentrações. Destes resultados foi calculado o coeficiente de absorção molecular para ambos compostos, o valor encontrado para o Resveratrol foi próximo ao da literatura, e o do Resveratrone apresenta divergências por causa da possibilidade de geração de outros fotoprodutos durante a irradiação UV. Também foram obtidos espectros de fluorescência por excitação de dois fótons usando um laser de Ti-Safira pulsado, utilizando comprimentos de onda de excitação de 720-920 nm para cada uma das três soluções de Resveratrone. A curva de fotoluminescência de excitação obtida mostrou larga faixa de eficiência de excitação. Foi também determinado o deslocamento Stokes de aproximadamente 1 eV para o composto. Por fim, demonstramos o processo de marcação onde o Resveratrone é produzido diretamente nas nanofibras onde em seguida é feita a cultura de células. As imagens de fluorescência por excitação de dois fótons mostraram em detalhes os arranjos de células e nanofibras nas amostras de nanofibras coradas com Resveratrol em metanol, nas amostras coradas com outros solventes a cultura celular apresentou inconsistências.

**Palavras-chave:** Resveratrol, Resveratrone, Absorção Multifóton, Marcador, Nanofibras, Cultura Celular.

# ABSTRACT

Resveratrone is a new fluorescent compound formed by the UV irradiation of trans-Resveratrol. Its large absorption cross-section has already been determined, making it suitable for fluorescent labeling in bioimaging. In this work, we studied the nonlinear optical properties of Resveratrone and demonstrated its application in labeling cellulose acetate nanofibers. These fibers are used as scaffolds in tissue engineering, where two-photon microscopy visualization is advantageous due to better three-dimensional resolution and less photodamage to the sample. The aim of the work is to determine the optical properties of the compound, visualize the arrangement of the fibers and measure the penetration depth of cells cultured in the scaffold. The optical characterization was performed by absorption measurements of Resveratrone and Resveratrol in three different solvents (methanol, isopropanol, and ethanol) at different concentrations. From these results, the molecular absorption coefficient for both compounds was calculated; the value found for Resveratrol was close to the ones in the literature, and that of Resveratrone showed discrepancies due to the possibility of generating other photoproducts during UV irradiation. Fluorescence emission spectra by two-photon excitation were also obtained using a pulsed Ti-Sapphire laser, with excitation wavelengths in the range of 720-920 nm, for each of the three Resveratrone solutions. The obtained photoluminescence excitation curve showed a wide efficient excitation range. A Stokes shift of about 1 eV was also determined for the compound. Finally, we demonstrated the labeling process where Resveratrone is produced directly in the nanofibers, followed by cell culture. Two-photon excitation fluorescence images showed detailed arrangements of cells and nanofibers in samples stained with Resveratrol in methanol; in samples stained with other solvents, cell culture showed inconsistencies.

**Keywords:** Resveratrol, Resveratrone, Multiphoton Absorption, Marker, Nanofibers, Cell Culture.

# LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Estrutura molecular do trans-resveratrol, cis-resveratrol e resveratrone ("X") . . . . .	14
Figura 2 – Diagramas de Jablonksi comparando os fenômenos de absorção por um e dois fótons. . . . .	17
Figura 3 – Diagrama de níveis de energia em absorção de dois fótons . . . . .	19
Figura 4 – Imagens de emissão com absorção por um e dois fótons em solução de rodamina. . . . .	20
Figura 5 – Gráficos esquemáticos mostrando a diferença entre laser contínuo (CW) e laser pulsado em relação a potência de pico e potência média. . . . .	21
Figura 6 – Absorbância e emissão do resveratrol e resveratrone . . . . .	23
Figura 7 – Espectros das lâmpadas utilizadas para irradiação de resveratrol . . . . .	24
Figura 8 – Fotos mostrando a fluorescência visível para soluções de resveratrone gerado por lâmpada 311 nm e 364 nm. . . . .	24
Figura 9 – Espectros de absorção do resveratrone em função do tempo de irradiação. . . . .	25
Figura 10 – Espectros de absorção de várias soluções de resveratrone em isopropanol obtido através de irradiação com a lâmpada UVA em 364 nm por 12h. As curvas são para amostras obtidas de soluções de resveratrol em diferentes concentrações, como indicado por cada cor. . . . .	26
Figura 11 – Esquema da montagem experimental para medidas de fotoluminescência de excitação. . . . .	29
Figura 12 – Absorção e emissão do corante WGA Alexa Fluor™ 488 Conjugate. . . . .	31
Figura 13 – Absorção e emissão do corante Alexa Fluor™ 546 Phalloidin. . . . .	31
Figura 14 – Diagrama esquemático da montagem do microscópio de multifóton. . . . .	32
Figura 15 – Esquema de projeção tridimensional das imagens multifótons. . . . .	33
Figura 16 – Espectros de absorção do resveratrol em diferentes solventes. . . . .	35
Figura 17 – Espectros de absorção do resveratrone em diferentes solventes. . . . .	36
Figura 18 – Espectros de emissão do resveratrone em cada solvente. . . . .	38
Figura 19 – Espectros PLE para o resveratrone em cada solvente. . . . .	38
Figura 20 – Comparação entre os espectros PLE e absorção linear para o resveratrone em isopropanol. . . . .	39
Figura 21 – Deslocamento Stokes para o resveratrone em cada solvente. . . . .	40
Figura 22 – Imagens por MEV de fibras de acetato de celulose coradas e não coradas. . . . .	41
Figura 23 – Resultado das imagens de fluorescência. . . . .	42
Figura 24 – Imagem exemplo de relevo causado por dobras das CAN em imagem de fluorescência por absorção de dois fótons, excitado por 780 nm. . . . .	43

Figura 25 – Imagem de fluorescência por absorção de dois fótons para a amostra referêcia. . . . .	44
Figura 26 – Imagem de fluorescência por absorção de um e dois fótons para a amostra com CAN. . . . .	45
Figura 27 – Fluorescência por absorção de um fóton para a amostra com CAN coradas por resveratrone em isopropanol. . . . .	45
Figura 28 – Imagem de fluorescência por absorção de um e dois fótons para a amostra com nanofibras coradas com resveratrone em etanol. . . . .	46
Figura 29 – Fluorescência por absorção de dois fótons da amostra com CAN coradas por resveratrone em metanol. . . . .	47
Figura 30 – Projeção tridimensional das imagens da amostra de cultura celular em CAN coradas com resveratrone. . . . .	49

—

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAN	Cellulose Acetate Nanofibers (Nanofibras de acetato de celulose)
c.c.	Complexo Conjugado
CW	Continuos Wave (Onda Contínua)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
GM	Goppert-Meyer (Unidade de seção de choque de absorção de dois fótons, equivalente a $10^{-50} \frac{cm^4 s}{fóton}$ )
HPLC	High Performance Liquid Cromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTE	Meat Tissue Engineering (Engenharia de Tecido Muscular)
P.A.	Para Análise
PDA	Photodiode Array (Matriz de Fotodiodos)
PLE	Photoluminescence Excitation (Fotoluminecência de Excitação)
RF	Spectrofluorophotometer (Detector de fluorescência)
TPE	Two-Photon Excitation (Excitação por dois fótons)
TPF	Two-Photon Fluorescence (Fluorescência por dois fótons)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WGA	Wheat Germ Agglutinin

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>DESCRIÇÃO TEÓRICA</b>	<b>14</b>
2.1	Resumo bibliográfico sobre resveratrone	14
2.2	Nanofibras de acetato de celulose e engenharia de tecidos	16
2.3	Excitação por dois fótons	16
2.4	Laser pulsado	20
2.5	Absorção da luz por moléculas	21
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
3.1	Preparação das amostras	23
3.2	Espectro de absorção	27
3.2.1	Amostras para medidas de absorção	27
3.3	Espectros de fotoluminescência de excitação	28
3.4	Marcação das nanofibras e cultura celular	29
3.4.1	Imagens de fluorescência e profundidade	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1	Caracterização óptica do resveratrone	34
4.1.1	Efeito do solvente e da concentração no espectro de absorção	34
4.1.2	Espectro de fluorescência por excitação de dois fótons	37
4.2	Marcação em cultura celular	41
4.2.1	Imagens por microscopia eletrônica de varredura	41
4.2.2	Cultura celular e imagens de fluorescência	42
4.2.3	Imagens tridimensionais	48
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>55</b>
	<b>APÊNDICE A – PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS</b>	<b>56</b>

# 1 Introdução

Neste estudo, exploramos as características ópticas de fluorescência do composto resveratrone e sua potencial aplicação como marcador fluorescente em biomateriais, mais especificamente em nanofibras de acetato de celulose. Esse composto é derivado da molécula resveratrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ), uma fitoalexina polifenólica encontrada em uvas e castanhas, que ganhou destaque em 1997 devido a pesquisas sobre sua atividade na prevenção do câncer [1]. Posteriormente, foram conduzidas várias investigações que confirmaram seus benefícios anti-inflamatórios [2], cardioprotetores [3] e neuroprotetores [4]. Apesar de seus inúmeros benefícios, o resveratrol apresentou baixa biodisponibilidade devida a pequena meia vida biológica [5] e solubilidade limitada quando utilizado como fármaco. Entretanto, em solução alcóolica sob irradiação UV é capaz de gerar o fotoproduto resveratrone, que possui alta emissão de fluorescência [6].

Uma das principais vantagens da obtenção de compostos fluorescentes é o uso de moléculas fluorescentes como marcadores no imageamento de tecidos biológicos, onde desempenham um papel essencial em várias técnicas amplamente utilizadas nas ciências da vida. Apesar dos avanços na microscopia eletrônica e de raios X, a maior parte das imagens biológicas ainda é obtida por meio de luz visível e lentes convencionais, principalmente devido ao seu menor custo e à baixa interferência em fenômenos biológicos. No entanto, um dos desafios é que os tecidos biológicos são, em geral, o baixo contraste de fase na luz visível. Assim, a capacidade intrínseca dos corantes de se ligar a partes específicas de células e tecidos torna-se vantajosa, especialmente para a microscopia de fluorescência, permitindo a captura de imagens tridimensionais não invasivas do interior das células. Com essas técnicas, é possível detectar diversos componentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, por meio da marcação fluorescente [7].

As funcionalidades dos marcadores também podem ser aplicadas a biomateriais, que são materiais naturais ou sintéticos utilizados em aplicações médicas para apoiar, melhorar ou substituir tecidos danificados ou funções biológicas. Esses marcadores auxiliam no desafio de visualizar a dinâmica da proliferação celular e as características morfológicas em culturas de tecidos e células sob esses biomateriais.

Neste estudo, avaliamos o uso do resveratrone como um marcador fluoróforo em biomateriais, especificamente nas nanofibras de acetato de celulose usadas no cultivo de carne artificial pelo grupo da professora Luciana Andrade (ICB - UFMG). Em seguida, descrevemos os métodos teóricos e experimentais utilizados para caracterizar opticamente o resveratrone em solução, bem como a viabilidade biológica e sua influência no cultivo de tecidos musculares.



No Capítulo 2, apresentamos uma revisão teórica das técnicas utilizadas para caracterização do composto, principalmente a microscopia de fluorescência de dois fótons, o uso de lasers pulsados, a determinação do espectro de absorção e a utilização de nanofibras de acetato de celulose na engenharia de tecidos.

No Capítulo 3, é detalhada a abordagem metodológica adotada, abrangendo os procedimentos de preparação das amostras, montagem experimental das medidas ópticas e análise dos dados, marcação das fibras e cultura celular.

No Capítulo 4, apresentamos os resultados obtidos. A primeira seção dedica-se à análise óptica do resveratrone em solução com três solventes distintos, incluindo a determinação dos espectros de absorção do resveratrol e do resveratrone em diferentes concentrações. Também são discutidos os espectros de emissão de fluorescência gerados por absorção de dois fótons, espectros de fotoluminescência de excitação pela mesma técnica, onde foram identificados os comprimentos de onda de excitação que maximizam a emissão e o deslocamento Stokes em cada solução. Em seguida, abordamos a fabricação e as propriedades das fibras de acetato de celulose, avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Por último, o capítulo detalha o processo de marcação das fibras, tanto na presença quanto na ausência de culturas celulares. Para determinar a viabilidade do resveratrone como marcador de biomateriais, foram obtidas imagens tridimensionais, aproveitando a superior resolução espacial proporcionada pela microscopia multifóton. No capítulo 5, resumimos os resultados e apresentamos as conclusões finais dos experimentos realizados.

## 2 Descrição teórica

### 2.1 Resumo bibliográfico sobre resveratrone

Embora seja mais comumente encontrado em plantas na forma *3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene*, o resveratrol pode existir nas formas *cis* e *trans*, sendo a conversão da forma *trans* para *cis* induzida pela instabilidade da molécula em exposição à luz UV. Fora da incidência de luz, dados *in vitro* mostram que essa instabilidade provém da deprotonização em meio básico com consequente auto-oxidação e processos de degradação ou polimerização [8].

A irradiação UV da forma *trans* desencadeia uma série de reações fotoquímicas e não só conversão para a forma *cis*, influenciadas pelo comprimento de onda, tempo de exposição, pH e temperatura da solução [8]. Uma dessas reações, foi primeiramente relatada por Roggero e Garciaparrilla (1995) [9] onde foi observada uma isomerização da forma *trans* para *cis* e em seguida da forma *cis* para um composto desconhecido. Nos anos seguintes outros autores relataram esporadicamente ter observado um fotoproduto fluorescente do resveratrol, mas nenhum publicou uma análise estrutural da química do produto.

Posteriormente, esse composto foi identificado por Yang et al. (2012) [6], após a isomerização da solução alcoólica de *trans*-resveratrol em *cis*-resveratrol, resultando na formação de uma intensa fluorescência.

Neste estudo uma solução de resveratrol em metanol foi irradiado por uma lâmpada UV de 305 nm por 90 segundos e em seguida analisada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), onde confirmou-se a presença de três principais espécies, sendo elas: *cis*-resveratrol, *trans*-resveratrol e uma terceira. Esse novo composto foi denominado “resveratrone”, e o caminho da reação fotoquímica, visualizado de forma resumida na Figura 1, foi proposto como sendo decorrente de uma série de fotociclização, abertura de anel e deslocamento de hidrogênio na ausência de meio ácido.

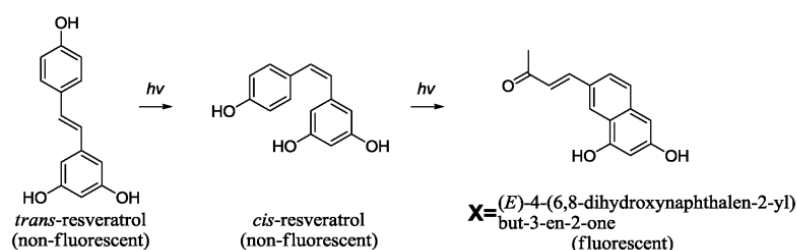


Figura 1 – Estrutura molecular do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e resveratrone ("X") [6]

O mesmo artigo também determinou a eficiência quântica do composto como 0,31 em isopropanol e 0,41 em DMSO, além da seção de choque de absorção de dois fótons, 132 GM, ou  $132 \times 10^{-50} \frac{\text{cm}^4\text{s}}{\text{fóton}}$ , o que é comparável aos valores de corantes conhecidos.

Já em 2018, Lorente *et al* [10] investigou os efeitos dos solventes alcóolicos na emissão e síntese do resveratrone a partir da solução de resveratrol. Foram comparadas amostras de resveratrol em água e em etanol irradiadas por iluminação UVA e também UVB. As soluções enquanto sob irradiação foram analisadas por HPLC com matriz de fotodiodos (PDA) e detectores de fluorescência (RF) em função do tempo de irradiação. Dessa forma observou-se, somente nas soluções etanólicas em ambas iluminações, variação no espectro de absorção em relação ao tempo de irradiação.

Nos primeiros momentos a banda de absorção do que seria o resveratrol sem fotoprodutos se encontra entre 250-350 nm, nesta faixa temporal a concentração de *trans*-resveratrol é máxima. Ao longo da irradiação surge um aumento de absorção na faixa de 400 nm enquanto a concentração da forma *cis* aumenta proporcionalmente a diminuição da de *trans*, em seguida as ambas decaem na mesma medida que esta nova banda de absorção surge, comprovando assim a geração de um terceiro composto distinto. A dependência de solventes menos hidrofóbicos foi atribuída pela presença de três grupos -OH nos anéis aromáticos, esse grupo contribui para a solubilidade em solventes mais polares como a família dos álcoois.

Apesar de consolidado seu potencial como fluoróforo, a razão fotofísica para o largo deslocamento de Stokes ainda está em pesquisa inicial. Felizmente, em 2023 Han *et al* [11] investigou a cinética geral das propriedades ópticas do resveratrone e encontrou evidência de envolvimento de transferência de prótons no estado excitado, mediado por solvente alcóólico, nas propriedades radiativas do composto.

A propriedade fluorófora do resveratrone abre novas perspectivas para aplicações além do resveratrol. No estudo que o identificou, foi observado um amplo deslocamento Stokes, juntamente com uma menor fotodegradação em solução, indicando seu potencial uso como marcador biológico. Em estudo seguinte [12], o mesmo grupo descreveu a tentativa de minimizar a toxicidade do resveratrone em solução alcoólica na marcação de tecidos biológicos. Para isso, desenvolveram o resveratrone-glicosídeo, composto gerado pela foto-reação da molécula existente naturalmente chamada resveratrol-glicosídeo, que foi separado do resveratrol-glicosídeo a partir de cromatografia em camada fina. Tanto este novo composto quanto o resveratrone, também separado do resveratrol por cromatografia em camada fina, foram utilizados para corar bactérias *E. coli*, levedura (*S. cerevisiae*), e células de mamíferos incluindo HeLa e MCF10A mostrando que ambos fluoróforos são adequados imagem de microscopia por absorção de dois-fótons.

Outra aplicação do resveratrone para além da marcação biológica foi descrita em estudo que utilizou a propriedade fluorófora do resveratrone para aplicação em ciências

forenses, Oliveira et. al. (2019) [13] utilizou o composto em pó de resveratrol na marcação óptica de impressões digitais em superfícies porosas. O contraste de imagem das impressões em madeira cobertas com pó de carbono sob luz branca e resveratrol visualizados sob luz ultravioleta foram comparadas e a eficiência do resveratrol foi mais satisfatória. Além da eficiência em contraste, em comparação ao pó de carbono o resveratrol apresenta menor custo e baixa toxicidade.

## 2.2 Nanofibras de acetato de celulose e engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos foi conceituada por Langer em 1993 e envolve a aplicação de princípios de biologia e engenharia para desenvolver substitutos funcionais para tecidos danificados e outras aplicações biomédicas. Geralmente envolve o isolamento de células saudáveis de um paciente, seguida de sua expansão *in vitro*, essas células são então semeadas em um biomaterial biodegradável que fornece suporte estrutural e com o tempo é substituído pelo novo tecido das células semeadas [14]. Atualmente, o termo também é usado na indústria alimentícia, especialmente com o cultivo de carne artificial, como demonstrado por Mark Post em 2012 [15].

O Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG está investigando o potencial das nanofibras de acetato de celulose (CAN) como estruturas transformadoras na engenharia de tecidos musculares (MTE), especificamente para a produção de carne cultivada. O uso das nanofibras como potencial biomaterial tem como uma de suas bases a alta relação entre área superficial e volume de CAN combinado com sua estrutura microporosa que favorece a adesão, proliferação, migração e diferenciação [16]. Nesse estudo, as CAN atuam como andaimes, ou no inglês *scaffold*, com o objetivo de apoiar o desenvolvimento de músculos, gordura e tecido conjuntivo, replicando a matriz extracelular presente nos tecidos humanos naturais. Para obter um produto cárneo estruturado semelhante a cortes de carne tradicionais, é necessário facilitar a proliferação celular, a diferenciação em tipos celulares essenciais e o arranjo espacial para alcançar a aparência e textura familiar [17].

## 2.3 Excitação por dois fótons

O fenômeno da excitação de um material por dois fótons (Two-Photon Excitation - TPE) é uma alternativa às espectroscopias e microscopias ópticas largamente utilizadas em biociências.

A existência da possibilidade de uma molécula absorver dois fótons quase simultaneamente estende à possibilidade de se ocorrer a chamada fluorescência por absorção de dois-fótons (Two-Photon Fluorescence, ou TPF) que tem uma série de vantagens sobre a

fluorescência convencional, baseada na absorção de um único fóton, que serão descritas neste capítulo. Em geral o fenômeno de fluorescência corresponde a uma transição entre estados singletos, que só é permitida devido a lei de conservação de spin e corresponde a estados com spin total nulo. A molécula transiciona do estado fundamental até um excitado absorvendo um fóton e, estando no estado excitado, pode retornar ao fundamental emitindo outro fóton com menor energia devido a perda para estados vibracionais [18].

Já na TPF, um fluoróforo (uma molécula capaz de fluorescer) é excitado não pela absorção de um único fóton de alta energia, mas pela absorção quase simultânea de dois fótons de menor energia. Estes dois fótons, cada um com aproximadamente metade da energia necessária para excitar o fluoróforo, interagem com a molécula em um intervalo de tempo extremamente curto, proporcionando a energia suficiente para promover a molécula a um estado excitado. Após a excitação, a molécula retorna ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de fluorescência com uma energia característica.

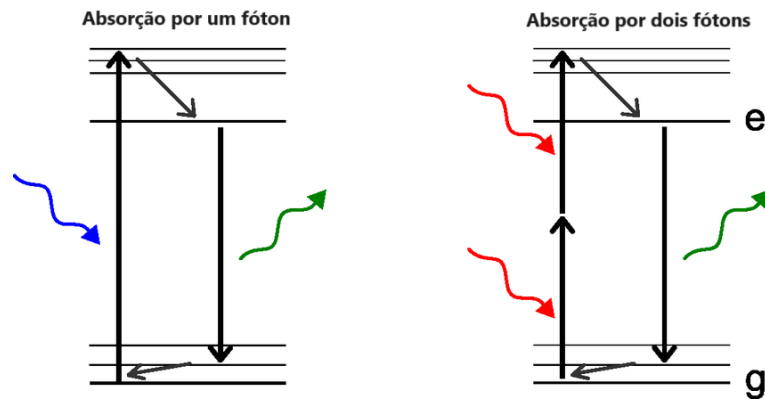


Figura 2 – Diagramas de Jablonski comparando os fenômenos de absorção por um e dois fótons.

A probabilidade do TPF ocorrer é não nula e foi prevista por [19] em 1931. Podemos determinar outras características deste fenômeno assumindo seu hamiltoniano da forma [20]:

$$i\hbar \frac{\partial \psi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = (\hat{H}_0 + \hat{V}(t))\psi(\mathbf{r}, t) \quad (2.1)$$

Em que  $\hat{H}_0$  é o hamiltoniano de um átomo livre e  $\hat{V}(t) = -\hat{\mu}\hat{E}(t)$  com  $\hat{\mu} = -e\hat{r}$  é a energia de interação do campo aplicado considerando uma onda monocromática  $\hat{E}(t) = Ee^{-i\omega t} + c.c.$

Assumimos em seguida que a solução para um átomo livre e as funções de onda associadas com os autoestados de energia são representados por:

$$\psi_n(\mathbf{r}, t) = u_n(\mathbf{r})e^{-i\omega_n t}, \text{ onde } \omega_n = E_n/\hbar$$

Em que satisfará a equação (2.1) (para potencial  $\hat{H}_0$ ) somente se  $\hat{H}_0 u_n(\mathbf{r}) = E_n u_n(\mathbf{r})$ .

Já a solução para o hamiltoniano na presença de potencial  $\hat{V}(t)$  pode ser dado pela combinação linear do conjunto completo de autoestados de energia determinados para  $\hat{H}_0$ , segundo o princípio de completeza:

$$\psi(\mathbf{r}, t) = \sum_l a_l(t) u_n(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t}$$

Substituindo em (2.1) e considerando que  $E_l = \hbar\omega_l$  chegamos a relação:

$$i\hbar \sum_l \frac{da_l(t)}{dt} u_l(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t} = \sum_l a_l(t) \hat{V} u_l(\mathbf{r}) e^{-i\omega_n t} \quad (2.2)$$

Multiplicando os dois lado por  $u_m^*(\mathbf{r})$  e fazendo uso de condições de ortonormalidade chegamos a forma matricial da equação de Schrodinger:

$$i\hbar \frac{da_l(t)}{dt} = \sum_l a_l(t) V_{ml} e^{-i\omega_{ml} t} \quad (2.3)$$

Onde  $V_{ml} = \int u_m^*(\mathbf{r}) \hat{V} u_l(\mathbf{r}) d^3r$  é o Hamiltoniano de interação. Para resolvermos a equação (2.3) necessitamos de técnicas de perturbação, assim expandimos  $a_m(t)$  usando o parâmetro  $\lambda$  para chegar às potências de interação:

$$a_m(t) = a_m^{(0)}(t) + \lambda a_m^{(1)}(t) + \lambda^2 a_m^{(2)}(t) \dots$$

Assim em conjunto com a equação (2.3) chegamos a série:

$$\frac{da_m^{(N)}(t)}{dt} = (i\hbar)^{-1} \sum_l a_l^{(N-1)} V_{ml} e^{-i\omega_{ml} t} \quad (2.4)$$

Sendo que o parâmetro N será 1 e 2 para encontrarmos a amplitude de probabilidade de absorção de dois fótons ( $a_n^{(2)}(t)$ ) para um átomo no nível  $n$ , representado na Figura 3 abaixo, em um tempo  $t$ .

Começamos usando N=1 e assumimos que na ausência de laser o átomo está no estado  $g$  e então podemos escrever o potencial  $V_{mg}$  como  $-\mu_{mg}(Ee^{-i\omega t} + E^*e^{i\omega t})$ . Substituindo na equação (2.4) e integrando, chegamos a amplitude de probabilidade para absorção de um fóton:

$$a_m^{(1)}(t) = \frac{\mu_{mg}E}{\hbar(\omega_{mg} - \omega)} [e^{i(\omega_{mg} - \omega)t} - 1] + \frac{\mu_{mg}E^*}{\hbar(\omega_{mg} + \omega)} [e^{i(\omega_{mg} + \omega)t} - 1]$$

O segundo termo não nos interessa visto que se o estado  $m$  estiver abaixo de  $g$  pode se tornar ressonante para processos de emissão estimulada. Usamos esta expressão no

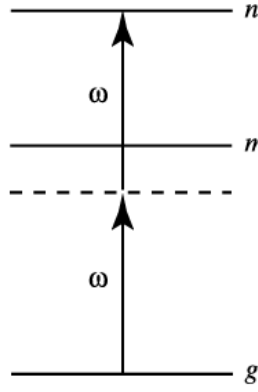


Figura 3 – Diagrama de níveis de energia em absorção de dois fótons [20].

lado direito de (2.4) para  $N=2$ , considerando o potencial  $V_{nm} = -\mu_{nm}(Ee^{-i\omega t} + E^*e^{i\omega t}) \simeq -\mu_{nm}Ee^{-i\omega t}$ , e em seguida integramos para assim chegarmos finalmente a:

$$a_n^{(2)}(t) = \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \left[ \frac{e^{i(\omega_{mg}-2\omega)t} - 1}{\omega_{ng} - 2\omega} \right] \quad (2.5)$$

Ou seja, a probabilidade de se estar no nível  $n$  para tempos maiores, e assumindo que o nível  $n$  está presente em certa densidade de estados  $\rho$ , será de:

$$p_n^{(2)} = |a_n^{(2)}(t)|^2 = \left| \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 2\pi t \rho_f(\omega_{ng} = 2\omega)$$

Como a probabilidade de um átomo estar em níveis excitados aumenta linearmente com o tempo, a taxa de transição para absorção de dois fótons é escrita como:

$$R_{ng}^{(2)} = \left| \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 2\pi \rho_f(\omega_{ng} = 2\omega)$$

Ja a seção de choque é obtida a partir de  $R_{ng}^{(2)} = \bar{\sigma}_{ng}^{(2)}(\omega)\bar{I}^2$  sendo  $\bar{I}$  a intensidade da luz incidente ( $\bar{I} = \frac{2n\epsilon_0 c}{\hbar\omega}|E|^2$ ).

A taxa de transição da absorção de dois fótons é proporcional ao quadrado da intensidade do feixe incidente. Isso significa que, diferentemente da excitação por um fóton, onde a absorção ocorre ao longo de todo o caminho óptico, a excitação por dois fótons acontece predominantemente na região focal. A Figura 4 exemplifica essa propriedade, a foto foi feita no Laboratório de Biofotônica utilizando uma lente objetiva de 5x para focalizar os laser em uma amostra de rodamina em cubeta de quartzo, para a excitação por um fóton foi utilizado laser 532 nm e para dois fótons o laser pulsado de Titânio:Safira de 800 nm. Foi utilizado um filtro para eliminar o espalhamento dos lasers e observar apenas a fluorescência da rodamina.

Devido a essa característica específica, a TPF em termos de imagem, permite uma resolução espacial aprimorada devido à capacidade de focalizar o laser em pontos

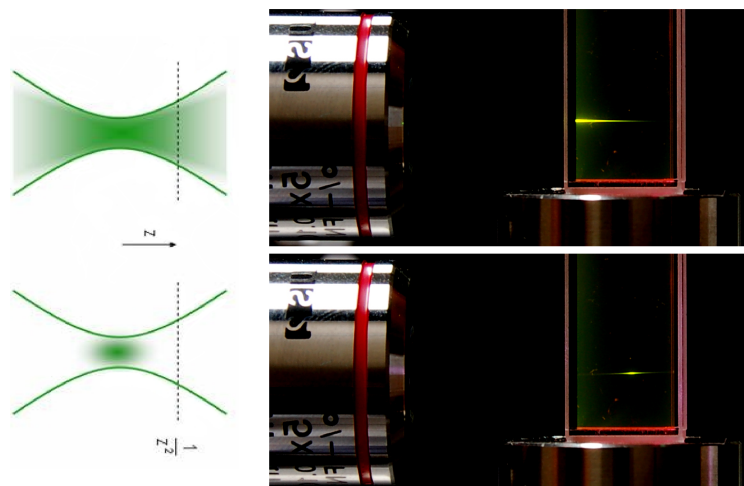


Figura 4 – Superior: Imagem de emissão com absorção por um fóton. Inferior: Imagem de emissão com absorção por dois fótons em solução de rodamina. As imagens mostram a emissão apenas no foco para a excitação por dois fótons (Imagem de arquivo do Laboratório de Biofotônica da UFMG.)

muito pequenos da amostra, o que permite a observação de estruturas intracelulares em detalhes. Como a excitação ocorre apenas no ponto focal do laser, há também menos fotodano às áreas envolta da amostra, tornando adequado para a observação de amostras vivas e sensíveis. Por isso também, gera menos dispersão de luz nos tecidos, permitindo a observação de estruturas mais profundas em tecidos biológicos. Por fim, a TPE causa menos *photobleaching*, o que significa que as amostras fluorescentes mantêm sua fluorescência por mais tempo, permitindo observações mais prolongadas. Por isso, foi a técnica escolhida e estudada na obtenção dos dados da caracterização do composto resveratrone.

## 2.4 Laser pulsado

A verificação experimental do fenômeno da absorção de dois fótons só foi possível com o desenvolvimento de laser em 1961 por Kaiser e Garret [21].

A excitação de dois fótons requer que dois fótons individuais interajam com uma única molécula fluorescente ao mesmo tempo. Para que esta interação seja suficientemente provável, é necessária uma densidade de fótons muito alta. Nas ciências dos materiais, isso foi conseguido usando altas potências de laser, que destruiriam quase qualquer amostra biológica instantaneamente [22]. A maneira de contornar isso é simples: em vez de aplicar continuamente os níveis de potência necessários para uma excitação eficiente de dois fótons, eles são aplicados em pulsos muito curtos. Para durações de pulso na faixa de 100 a 150 fs, o nível de potência alcançado nesses pulsos (potência de pico) é várias ordens de magnitude superior à potência média, permitindo o uso de potências médias que são compatíveis com tecido biológico vivo. A Figura 5 demonstra graficamente a diferença entre potência de pico e potência média em cada tipo de laser.



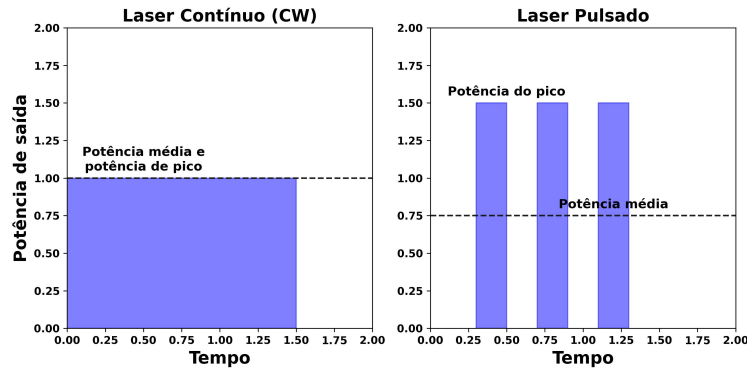


Figura 5 – Gráficos esquemáticos mostrando a diferença entre laser contínuo (CW) e laser pulsado em relação a potência de pico e potência média.

O laser de Titânio-Safira (Ti:Sapphire), desenvolvido em 1982 por Moulton [23] em sua forma contínua e em seguida aprimorado para pulsos ultracurtos por Spence e Sibbett [24], é um dos tipos de lasers pulsados mais empregados. Neste projeto, utilizamos o modelo “Chameleon” da Coherent, que opera com base na oscilação de mode-locking. Este sistema é composto por um cristal de safira ( $Al_2O_3$ ) dopado com íons  $Ti^{3+}$ , e é excitado por um laser de diodo em operação contínua (CW) em 532 nm. O laser Ti:Sapphire se destaca por sua capacidade de ajuste de frequência, variando entre 690 e 1080 nm, e gera pulsos de laser extremamente curtos, com duração na ordem de 140 fs.

## 2.5 Absorção da luz por moléculas

A espectroscopia de absorção funciona como ferramenta analítica da química do material. A fração de luz incidente absorvida pelo material é determinada pela composição molecular e atômica e funciona como uma assinatura da substância. Isso se deve a mudança de estado molecular resultante da absorção de energia, podendo afetar níveis eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Os níveis eletrônicos determinam as posições das bandas de absorção e os níveis vibracionais e rotacionais contribuem para os formatos das bandas [18].

Para determinação quantitativa da absorção de um material consideramos que a intensidade da luz, em determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ) que atravessa o meio é descrita pela relação:

$$I_\lambda(x) = I_0 10^{-\alpha x} \quad (2.6)$$

Em que  $I_0$  é a intensidade incidente,  $\alpha$  é o chamado coeficiente de absorção e  $x$  é a distância de propagação em um meio. Se  $\alpha > 0$  a intensidade da luz decresce ao longo da direção de propagação, já se  $\alpha = 0$  não haverá absorção.

Considerando que a absorção da luz ocorre a nível molecular, podemos usar a seção de choque  $\sigma$  para tornar mais prático a caracterização de uma molécula única. Utilizando  $l$  como o comprimento de absorção do meio e reajustando a equação 2.6:

$$\frac{I_{\lambda}(l)}{I_0} = 10^{-n\sigma l} \text{ ou seja, } \frac{I_{\lambda}(l)}{I_0} = 10^{-A}$$
$$A = -\log \frac{I_{\lambda}(l)}{I_0}$$

Sendo  $n$  a densidade de centros de absorção, obtemos assim a chamada absorbância (A). Se a concentração molar ( $c$ ) for usada para expressar a densidade de moléculas absorvendo luz, a característica de absorção de luz das moléculas é expressa pelo coeficiente de absorção molar  $\epsilon$  que depende do comprimento de onda ( $\lambda$ ) da luz absorvida, e é o coeficiente de proporcionalidade na relação chamada de Lei de Lambert-Beer [18]:

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)cl \tag{2.7}$$

Em equipamentos como espectrofotômetros, a absorbância é a grandeza real que obtemos. Na literatura, não há estudos que abordem a otimização da solução de resveratrone, demonstrando as variações de eficiência entre diferentes solventes alcoólicos e concentrações. Visando preencher essa lacuna, desenvolvemos um estudo sobre o efeito dos solventes e das concentrações na geração do espectro de absorção do resveratrone.

## 3 Metodologia experimental

### 3.1 Preparação das amostras

Antes de realizar a análise óptica do resveratrone, foi necessário refinar parâmetros de preparação de solução. Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram geradas a partir de trans-resveratrol em pó (Ningbo Vitax Biotech Co.) em solução alcóolica conforme discutido no capítulo 1.

A geração de resveratrone nestas soluções se dá por sua irradiação por luz ultravioleta, considerando que a faixa do ultravioleta corresponde aos comprimentos de onda entre 100-280 nm (UVC), 280-315 nm (UVB) e 315-400 nm (UVA) é necessário determinar qual a lâmpada com o melhor pico de emissão. Para isso leva-se em conta a banda de absorção do resveratrol, na Figura 6 estão os espectros de absorção e de emissão do cis-resveratrol, trans-resveratrol e resveratrone puros determinados por [6].

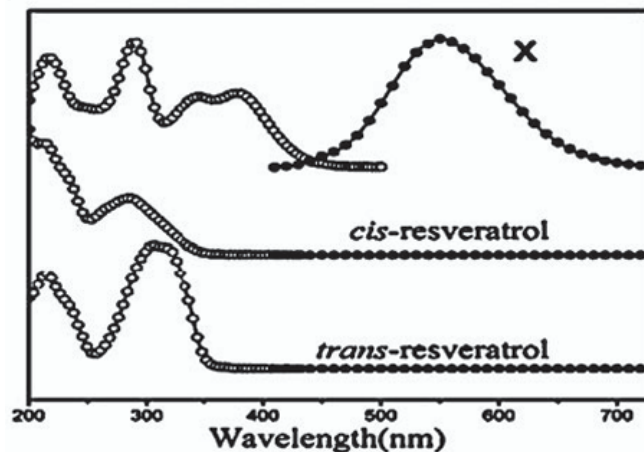


Figura 6 – Absorbância (círculo aberto) e emissão (círculo fechado) do trans-resveratrol, cis-resveratrol e resveratrone (X) [6].

Tanto o trans-resveratrol, quanto o cis-resveratrol possuem bandas de absorção na faixa de 210 nm e 300 nm e nenhuma emissão, esses resultados são esperados tendo em vista que nenhum deles apresenta fluorescência. Como estamos interessados na geração do resveratrone a partir do isômero trans, é de interesse utilizar lâmpadas que possuem pico de emissão aproximado a uma dessas bandas de absorção, ou seja, a otimização da geração de resveratrone ocorre idealmente com a irradiação por lâmpadas na faixa do UVB ou do UVC.

Podemos observar também que o resveratrone, diferente dos isômeros do resveratrol, contém uma banda de absorção por volta de 400 nm além das centradas por volta de 210 nm e 300 nm.

No entanto, a lâmpada disponível, com pico em UVB, apresentou baixa intensidade de emissão nessa faixa. Assim, foram realizados testes com outra lâmpada, um LED UVA com pico em 364 nm, que, apesar de ter um máximo distante do pico de absorção em comparação com o UVB, era mais intensa. Ambos os espectros de emissão não normalizados estão na Figura 7.

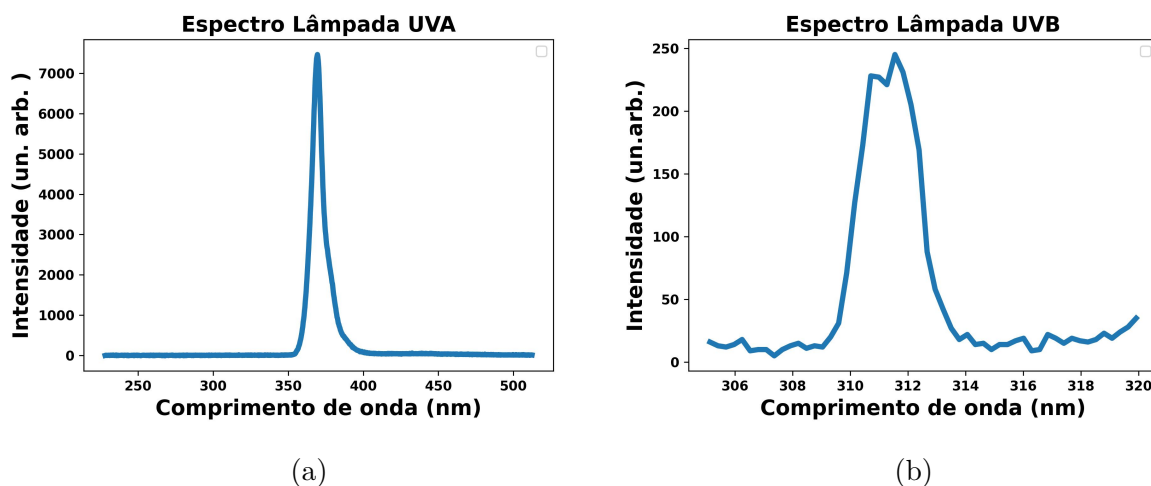


Figura 7 – Espectros das lâmpadas utilizadas para irradiação de resveratrol. a) Lâmpada LED UVB com pico em 364 nm. b) Lâmpada de mercúrio com pico em 311 nm.

A Figura 8 mostra que a solução gerada pela lâmpada de 311 nm gera maior fluorescência, na foto ambas as soluções foram irradiadas por UVA e é possível perceber maior intensidade na solução da esquerda. A cubeta da direita mostra mais a parte azul da lâmpada UV refletida.

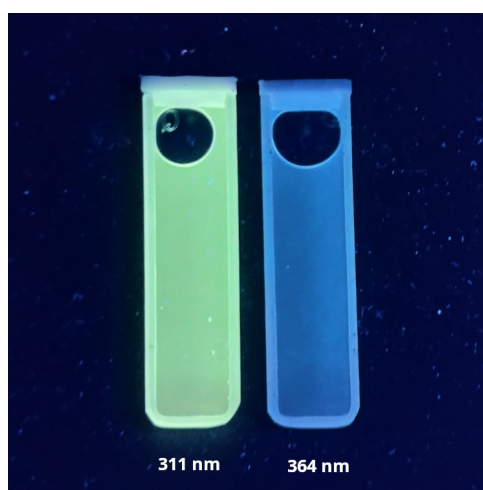


Figura 8 – Fotos mostrando a fluorescência visível para soluções de resveratrol gerado por lâmpada 311 nm (esquerda) e 364 nm (direita).

Em seguida foram preparadas soluções de resveratrol em isopropanol (0,5 mg/ml) irradiadas por ambas as lâmpadas por 1h, 2h e 3h, de forma que é possível comparar as

bandas de absorção que surgem com a geração de resveratrone a partir da absorção do comprimento de onda de cada lâmpada.

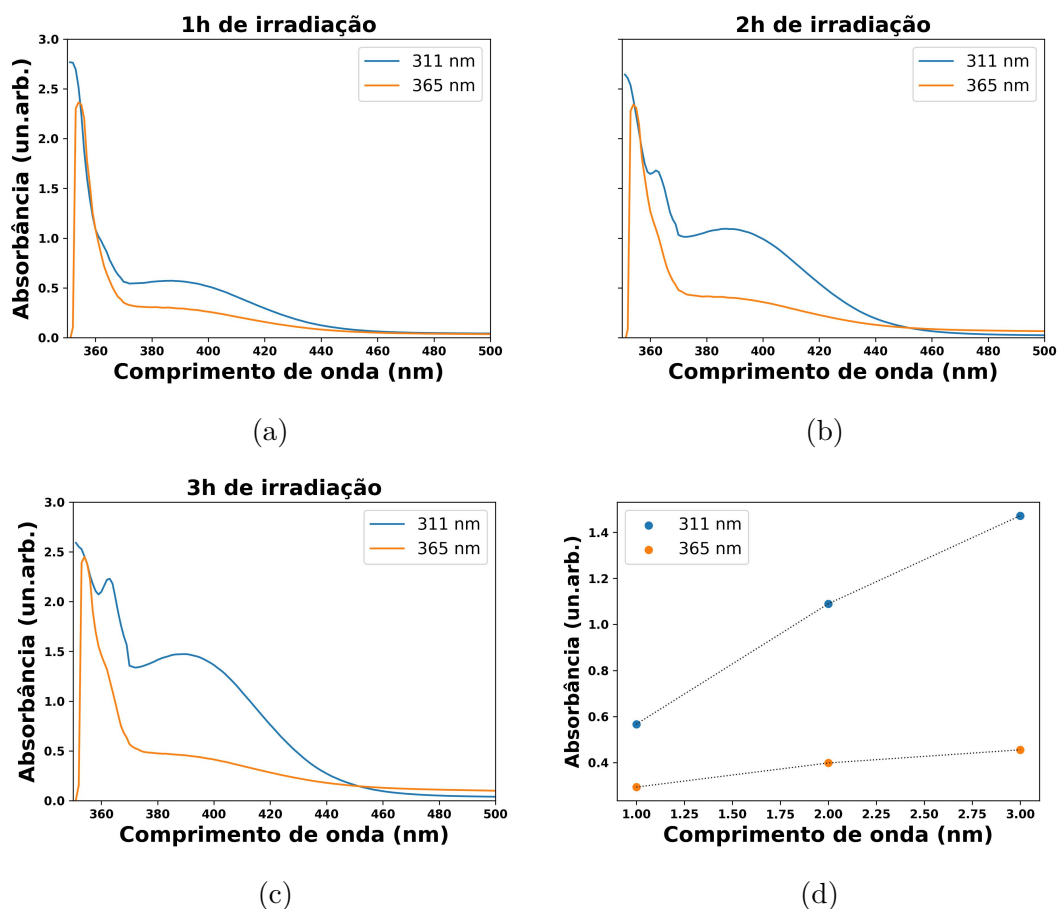


Figura 9 – Espectros de absorção do resveratrone em função do tempo de irradiação: a) após 1h de exposição, b) após 2h de exposição, c) após 3h de exposição e d) absorbância em  $\lambda = 390$  nm para cada lâmpada em cada tempo de exposição.

Pela análise do gráfico, ambas as lâmpadas geraram resveratrone pela existência de banda em 400 nm, não existente no resveratrol. Considerando o aumento desta banda como sendo indiretamente uma medida da geração de resveratrone, vemos que a lâmpada de 311 nm apesar de ter intensidade de emissão significativamente menor, gerou resveratrone de forma eficiente, além do surgimento de outro pico centrado em 363 nm possivelmente também do resveratrone.

Percebe-se que após 3h na lâmpada de 364 nm houve leve aumento de absorbância acima de 450 nm, a solução também foi colocada por 12h sob irradiação desta lâmpada e gerou o espectro de absorção na Figura 10. Ou seja, além do pico esperado do resveratrone também surgiu banda de absorção na faixa de 500 nm, além da coloração avermelhada diferente da amarelada gerada pela solução irradiada pela lâmpada de 311 nm. Um dos possíveis motivos para isso é que, como essa lâmpada está fora do pico principal de absorção do resveratrol, há a geração de outros fotoprodutos cujas bandas de absorção se deslocam

para esses picos. Esse comportamento pode ser consequência não só do tempo de exposição a UV quanto também do solvente utilizado.

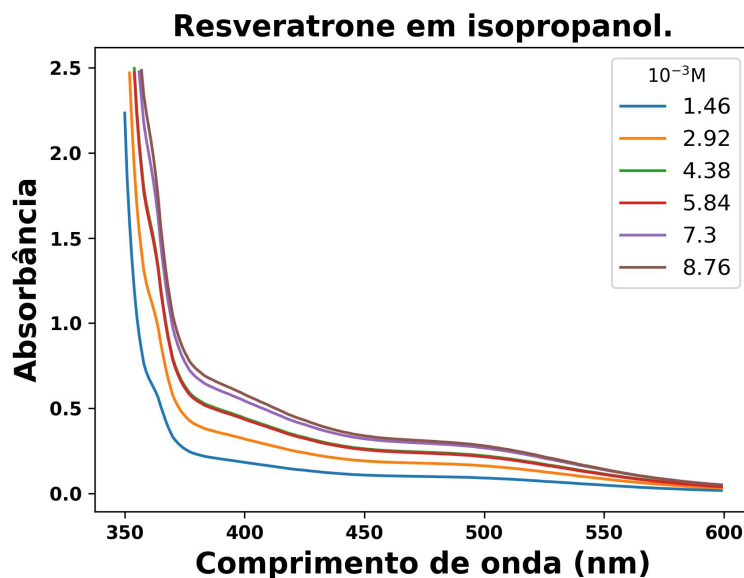


Figura 10 – Espectros de absorção de várias soluções de resveratrone em isopropanol obtido através de irradiação com a lâmpada UVA em 364 nm por 12h. As curvas são para amostras obtidas de soluções de resveratrol em diferentes concentrações, como indicado por cada cor.

Para a aplicação como marcador fluorescente, uma absorção larga não é ideal devido à sobreposição do sinal de emissão com o de outros corantes que possam estar presentes no conjunto do tecido analisado, por isso foi escolhida a lâmpada com pico em 311 nm como fonte de irradiação.

Também foi observada uma alta quantidade de resíduo do soluto (pó) quando a solução seca em concentrações acima de 2 mg/ml. Como o objetivo é aplicar em CAN e secar, esse resíduo poderia alterar a cultura de células, além de altas concentrações impossibilitarem a medida de absorbância devido à limitação do aparelho. Por isso, apesar das solubilidades do resveratrol em alguns solventes serem as descritas na tabela 1, utilizamos concentrações abaixo de 2 mg/ml para a análise óptica e de 0,5 mg/ml para marcação das fibras que seriam colocadas em cultura celular.

Solvente	Solubilidade (mg/ml)
Etanol	66,8 ± 0,3
Metanol	76,7 ± 0,3
Isopropanol	27,4 ± 0,3
Água	0,040 ± 0,008

Tabela 1 – Solubilidade do trans-resveratrol em metanol, etanol e isopropanol a 298,2 K. Informações retiradas de Sun et. al. [25]

## 3.2 Espectro de absorção

Apesar de já determinado pela literatura que o resveratrone surge a partir do solução alcoólica do resveratrol, não há uma análise sistemática da eficiência de diferentes solventes alcoólicos na conversão em resveratrone ou na intensidade de fluorescência. Com o objetivo de suprir em parte essa lacuna, as análises em seguida foram realizadas comparando solução de resveratrol em isopropanol, metanol e etanol (P.A. ACS 99,5%).

Inicialmente, foi utilizado o espectrofotômetro VARIOSKAN (UV-Vis) da Thermo-fisher para determinar o espectro de absorção do resveratrol nos três solventes utilizando seis concentrações distintas, em seguida do também os espectros do resveratrone. A preparação das amostras está descrita na seção 3.2.1.

Uma grandeza interessante de ser determinada para o resveratrone, visto a baixa descrição na literatura, é o coeficiente de absorção molecular ( $\epsilon$ ). Esse coeficiente demonstra a capacidade de um mol da substância atenuar a luz incidente em determinado comprimento de onda. Para calculá-lo, foi gerado o gráfico da absorbância máxima, em 309 nm para as soluções de resveratrol e 390 nm para as de resveratrone, para cada concentração. Em seguida foi realizada uma regressão linear conforme a equação (2.7) utilizando a biblioteca Numpy da linguagem de programação Python e a função Poly1d para determinação de polinômio de grau 1, o desvio padrão também foi calculado a partir da covariância determinada pela função.

Com a informação da inclinação, se dividida pela espessura da cubeta utilizada (0.877 cm) obtemos o  $\epsilon$  do resveratrol e do resveratrone, a incerteza foi calculada a partir da fórmula 3.1 de propagação de incertezas.

$$\sigma_f^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right)^2 \sigma_a^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right)^2 \sigma_b^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial z}\right)^2 \sigma_z^2 \quad (3.1)$$

Sendo  $f = f(a, b, \dots, z)$  uma função genérica.

### 3.2.1 Amostras para medidas de absorção

As amostras foram preparadas seguindo o seguinte procedimento:

- Determinamos seis concentrações de resveratrol para cada solvente citado, gerando um total de 18 soluções. O processo foi realizado utilizando balança de precisão para medir a massa do soluto e pipetas para determinar o volume do solvente. O procedimento foi realizado dentro de uma capela de exaustão.
- As amostras foram colocadas em placa de 96 poços com caminho óptico de  $l = 0,877$  cm e em seguida colocadas no espectrofotômetro para determinação do espectro.

- No próximo passo, foram geradas outras 3 concentrações de resveratrol nos três solventes.
- Em seguida as três soluções foram colocadas em uma caixa forrada com papel alumínio e sob irradiação UV em 311 nm por 2 horas, de forma a diminuir perda de irradiação para o ambiente.
- Também utilizando uma capela de exaustão, as soluções foram diluídas em outras 6 proporções para cada solvente acrescentando volume do álcool correspondente para cada solução. Ao final obtemos outras 18 soluções também colocadas em poços com caminho óptico  $l$ .
- As concentrações finais para cada amostra estão descritas na tabela 2.

Concentração	$c_1$	$c_2$	$c_3$	$c_4$	$c_5$	$c_6$
Resveratrone ( $10^{-3}M$ )	1,46	2,92	4,38	5,84	7,30	8,76
Resveratrol ( $10^{-5}M$ )	1,46	2,92	4,38	5,84	7,30	8,76

Tabela 2 – Concentrações das soluções geradas de resveratrone e resveratrol para medidas do espectro de absorção.

Neste procedimento não foi possível separar os resveratrone do resveratrol em cada solução devido a falta de equipamento adequado, ou seja, as concentrações estabelecidas nas soluções após irradiação são na verdade de resveratrol. Como são fluorescentes sabe-se que foi gerado resveratrone, situação será descrita em detalhes nas próximas seções.

### 3.3 Espectros de fotoluminescência de excitação

Ao absorver luz a excitação de uma molécula resulta na transição do estado fundamental para um estado excitado, ao relaxar a molécula perde energia para estados vibracionais e retorna ao estado fundamental emitindo um fóton de menor energia que o absorvido ou, no caso da absorção de dois fótons descrito no capítulo 2, menor que a soma dos fótons absorvidos [18].

Medimos a emissão de fluorescência nas soluções preparadas com os três solventes utilizados nas medidas de absorbância, contendo uma concentração de 0,5 mg/ml de resveratrol, após serem irradiadas por 2 horas com uma lâmpada UV de 311 nm. O experimento foi realizado utilizando um laser pulsado de Titânio-Safira da Coherent, com potência constante, incidindo na amostra contida em uma cubeta de quartzo. O feixe de laser foi refletido por um espelho dicróico e focalizado através de uma lente plano-convexa. A fluorescência foi coletada na mesma direção, mas no sentido oposto, pelo espectrômetro ANDOR, onde os espectros foram gerados. A montagem está representada na Figura 11.



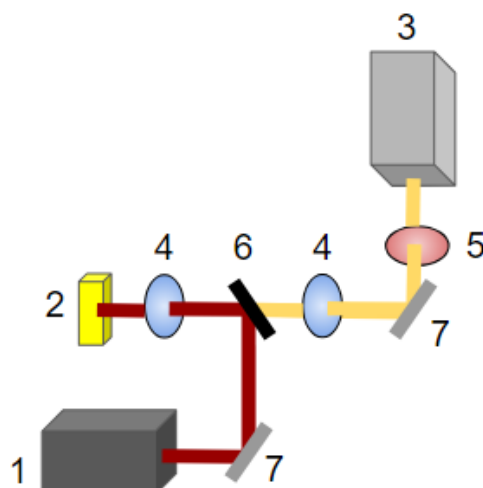


Figura 11 – Esquema da montagem experimental para medidas de fotoluminescência de excitação: 1 - Laser Ti-Safira Chamaleon Coherent. 2 - Amostra em cubeta de quartzo. 3 - Espectrômetro ANDOR SR-303i-B. 4 - Lentes Plano-Convexas THORLABS. 5 - Filtro NEWPORT BG40. 6 - Espelho Dicroico SEMROCK FF670 SDI01. 7 - Espelhos.

Em seguida, o laser foi sintonizado nos comprimentos de onda entre 720 e 910 nm, de 10 em 10 nanômetros, a uma potência constante de 50 mW calibrados após a lente focalizadora. Para cada comprimento de onda de excitação sintonizado foram feitas cinco medidas de intensidade de emissão, em seguida foi calculada a média da área integrada dessas intensidades entre os comprimentos de onda de emissão de 500 a 600 nm.

Dessa forma foi possível gerar o gráfico da intensidade média de emissão em função de cada comprimento de excitação, chamado de fotoluminescência de excitação ou PLE (Photoluminescence Excitation), que é uma medida indireta da curva de excitação de um composto.

Em seguida comparamos o PLE com o gráfico de absorção e também a curva de absorção com uma das curvas de emissão. Dessa forma foi possível determinar o Deslocamento Stokes do composto e também a eficiência de emissão entre as soluções com diferentes solventes.

### 3.4 Marcação das nanofibras e cultura celular

As nanofibras de acetato de celulose utilizadas, caracterizadas por uma distribuição aleatória, foram obtidas em colaboração com o Departamento de Morfologia da UFMG e o Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG. Foram produzidas por eletrofiação da solução de acetato de celulose dissolvida em *acetone-dimethylformamide* (3:1 v/v) para obter solução de 12% (p/v), foi utilizado tensão

de 16 kV, a uma distância de coleta de 14 cm com rotação do coletor a 400 rpm e solução alimentada por gravidade na temperatura ambiente.

Normalmente, a marcação das fibras seria realizada utilizando-se uma solução de resveratrone, aplicando-se alguns mililitros sobre as áreas desejadas. No entanto, o solvente alcoólico presente na solução pode ser prejudicial às células. Para superar essa limitação, as fibras destinadas à cultura celular foram embebidas em uma solução de resveratrol, e, em seguida, o conjunto foi irradiado com luz UVB, permitindo a conversão do resveratrol em resveratrone enquanto o álcool evaporava. Assim, obtivemos fibras coradas e secas, prontas para uso sem causar danos às células.

Para avaliar possíveis mudanças no diâmetro das fibras coradas em relação às não coradas, foram capturadas imagens usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Hitachi TM4000Plus. As imagens foram obtidas com elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE) a 5 kV, com diferentes ampliações.

Em seguida foram utilizadas 13 amostras de CAN em monocamada colocadas em placa de 24 poços, com especificação na tabela 3. Coramos CAN em triplicata de acordo com o método acima descrito para cada um dos solventes avaliados, além de uma amostra de nanofibra não corada para ser utilizada como referência e também uma amostra corada diretamente com resveratrone em solução.

Quantidade	Descrição
1	Fibra não marcada, usada para referência.
3	Fibras secas, previamente em solução de resveratrol em etanol (0,5 mg/ml)
3	Fibras secas, previamente em solução de resveratrol em isopropanol (0,5 mg/ml)
3	Fibras secas, previamente em solução de resveratrol em metanol (0,5 mg/ml)
3	Fibras secas, previamente em solução de resveratrone em isopropanol (0,5 mg/ml).

Tabela 3 – Especificações das amostras utilizadas. As amostras de fibras em solução foram colocadas sob irradiação UVB por 2h.

Em cada uma destas amostras foi feita a cultura de mioblastos de camundongos imortalizadas (C2C12) em fluxo laminar. Para isso, as fibras foram expostas a irradiação UVC germicida por 20 minutos, em seguida balanceadas em meio de cultura (DMEM-alta glicose (Corning), suplementado com 10% soro fetal bovino (Corning) e 1% pen-strep (Gibco)) por 15 minutos antes do depósito de  $1 \times 10^5$  células por poço da placa. Após este procedimento, foram incubadas por 48h a 37°C à 5%  $CO_2$ . As células presentes nas amostras foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos e foram coradas utilizando WGA Alexa Fluor™ 488 Conjugate (duas amostras de cada grupo) e Alexa Fluor™ 546 Phalloidin (uma amostra de cada grupo, além da referência) ambos da ThermoFisher.

A faloidina é uma toxina que se liga com alta afinidade aos filamentos de actina, e quando conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor™ 546, permite a visualização da estrutura

do citoesqueleto. Já o WGA (Wheat Germ Agglutinin) conjugado com Alexa Fluor™ 488 é amplamente utilizado para marcar glicoconjugados na membrana celular.

Os corantes usados possuem intensidade de absorção e emissão fornecidos pelo site da Thermofisher descritos na Figura 12 e 13. Podemos ver que o WGA Alexa Fluor™ 488 Conjugate possui absorção máxima por volta de 495 nm e emissão por volta de 519 nm, já o Alexa Fluor™ 546 Phalloidin absorve de forma mais eficiente por volta de 550 nm e emite em 565 nm. A partir de seus máximos escolhemos os filtros para a coleta da fluorescência das células separadamente da das fibras coradas com resveratrone.

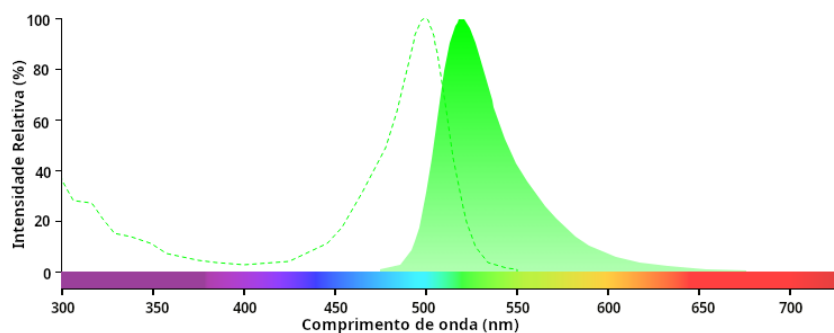


Figura 12 – Absorção (pontilhado) e emissão (preenchido) do corante WGA Alexa Fluor™ 488 Conjugate. Retirado do site da Thermofisher.

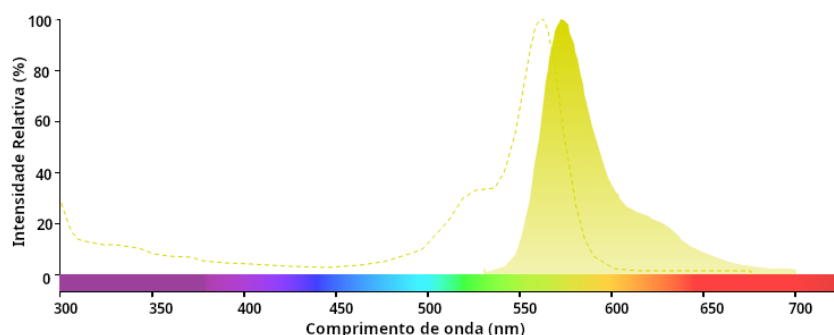


Figura 13 – Absorção (pontilhado) e emissão (preenchido) do corante Alexa Fluor™ 546 Phalloidin. Retirado do site da Thermofisher.

### 3.4.1 Imagens de fluorescência e profundidade

Além da utilização da excitação por dois fótons para obtenção do espectro de emissão, podemos utilizar a propriedade de melhor resolução espacial do TPF para obtenção de imagens de profundidade das amostras, desta forma obtemos uma reprodução tridimensional do volume do conjunto de CAN e células aderidas.

Foram obtidas imagens de fotoluminescência das amostras utilizando o microscópio confocal Fluoview da Olympus, conforme o arranjo experimental mostrado na Figura 14. O sistema óptico do microscópio é configurado com o laser de Titânio-Safira sintonizável, ou outro laser contínuo disponível, direcionado aos espelhos de varredura, que realizam a

análise da amostra, focada pela objetiva. A coleta do sinal de emissão ocorre no mesmo eixo de incidência, no sentido oposto à excitação, passando por filtros ópticos que bloqueiam o comprimento de onda do laser de excitação e permitem a seleção de comprimentos de onda específicos da emissão. O sistema conta com múltiplos fotomultiplicadores (PMTs), que possibilitam a detecção simultânea de diferentes faixas espectrais da emissão, além do sinal de transmissão.

O laser pulsado foi sintonizado em 780 nm, com potência de 240 mW antes da entrada do microscópio e 14 mW após a objetiva do microscópio, na amostra. O espelho dicróico da entrada do microscópio é otimizado para o visível, e com refletividade baixa no infravermelho. Além disso, foi utilizado um laser contínuo de 488 nm, com potência de 0,012 mW após a objetiva. Para cada amostra, foram obtidas imagens de fotoluminescência utilizando um filtro de 560-600 nm para a visualização das fibras coradas com resveratrone e um filtro de 510-540 nm para a visualização das células coradas com WGA, em todas as replicatas de cada grupo.

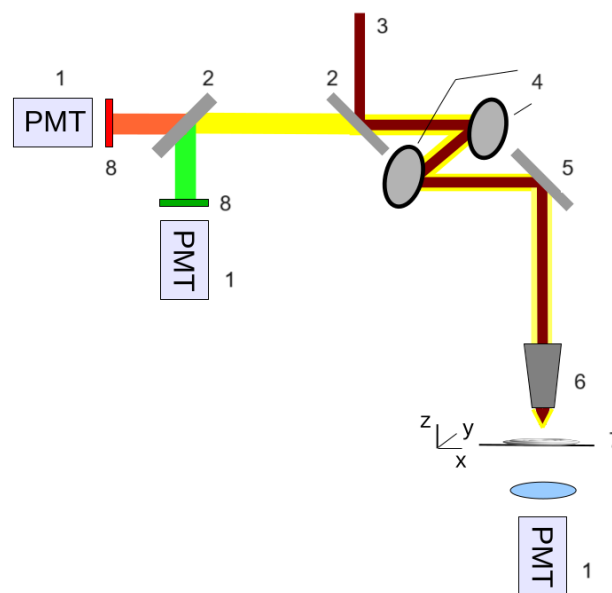


Figura 14 – 1 - Fotomultiplicadoras. 2 - Espelhos Dicróicos. 3 - Laser Ti-Safira Chamaleon Coherent. 4 - Espelhos de Varredura. 5 - Espelho. 6 - Objetiva 20x/0.95 W XLUMPlanFI Olympus. 7 - Amostras. 8 - Filtros.

Em seguida, foi realizada a reconstrução volumétrica a partir das imagens obtidas em diversos planos focais. As imagens dos planos focais foram reagrupadas tridimensionalmente utilizando o software de processamento de imagem ImageJ e o plugin Volume Viewer. Essa projeção tridimensional considera que cada imagem de plano focal atua como um corte transversal do conjunto, sendo também fornecidos os dados de escala e a distância vertical entre os planos. A Figura 15 ilustra esquematicamente o processo interpretado pelo plugin: primeiramente, ele coleta as imagens de cada plano, denominadas *stack*; em

seguida, combina essas imagens em relação ao eixo z do volume, permitindo, ao final, a interpolação e a reconstrução do resultado desejado.

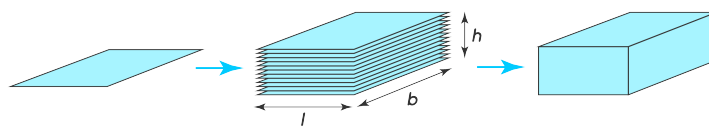


Figura 15 – Esquema de projeção tridimensional das imagens multifótons: imagens são obtidas em cada plano focal, reagrupadas de acordo com escala e separação vertical usando o software Image J e reconstruídas por interpolação recriando a tridimensionalidade.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização óptica do resveratrone

#### 4.1.1 Efeito do solvente e da concentração no espectro de absorção

Realizamos as medidas dos espectros de absorção para as três soluções de resveratrol e as seis concentrações descritas na seção 3.2. Nos gráficos da figura 16 estão apresentados os resultados obtidos, sendo 16a o espectro do resveratrol em etanol, 16b do resveratrol em metanol e 16c do resveratrol em isopropanol. Já o gráfico 16d apresenta distribuição da absorbância em 309 nm para cada concentração em cada um dos solventes. O valor  $\lambda = 309$  nm foi definido pela proximidade ao máximo de absorbância na faixa UVB além de apresentar correspondências na literatura.

Para os três existe uma larga banda de absorção do resveratrol por volta de 300 nm e outra em 200 nm com leve deslocamento dependendo de cada solvente, observou-se também a proporcionalidade diretamente linear entre a concentração e a absorção da solução. Tanto a solução em isopropanol quanto em etanol possuem maior absorção na segunda banda, enquanto em metanol a primeira banda possui maior absorbância.

A partir da figura 16d realizamos a regressão linear para determinar os valores de  $\epsilon$  e sua respectiva incerteza, descritos na tabela 4:

Solvente	Coefficiente de absorção molecular ( $cm^{-1}M^{-1}$ )
Etanol	$25967 \pm 296$
Isopropanol	$29175 \pm 333$
Metanol	$27751 \pm 317$

Tabela 4 – Coeficientes de absorção molecular por solvente para as soluções de resveratrol, determinados após ajuste polinomial.

Considerando que o soluto utilizado em todas as soluções era o mesmo e que a absorção dos solventes foi subtraída do gráfico, esperava-se que os valores de  $\epsilon$  apresentassem proximidade, com variações decorrentes das incertezas associadas ao equipamento e ao método de preparação das amostras. De acordo com Trela (1996) [26], o coeficiente de absorção molecular do trans-resveratrol em etanol a 309 nm foi determinado como  $29859 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . É importante destacar que, no estudo mencionado, o trans-resveratrol e o cis-resveratrol foram separados por cromatografia líquida, assegurando a pureza da solução. Embora este projeto tenha utilizado exclusivamente o trans-resveratrol, há a possibilidade de isomerização do composto para a forma cis devido à exposição à radiação

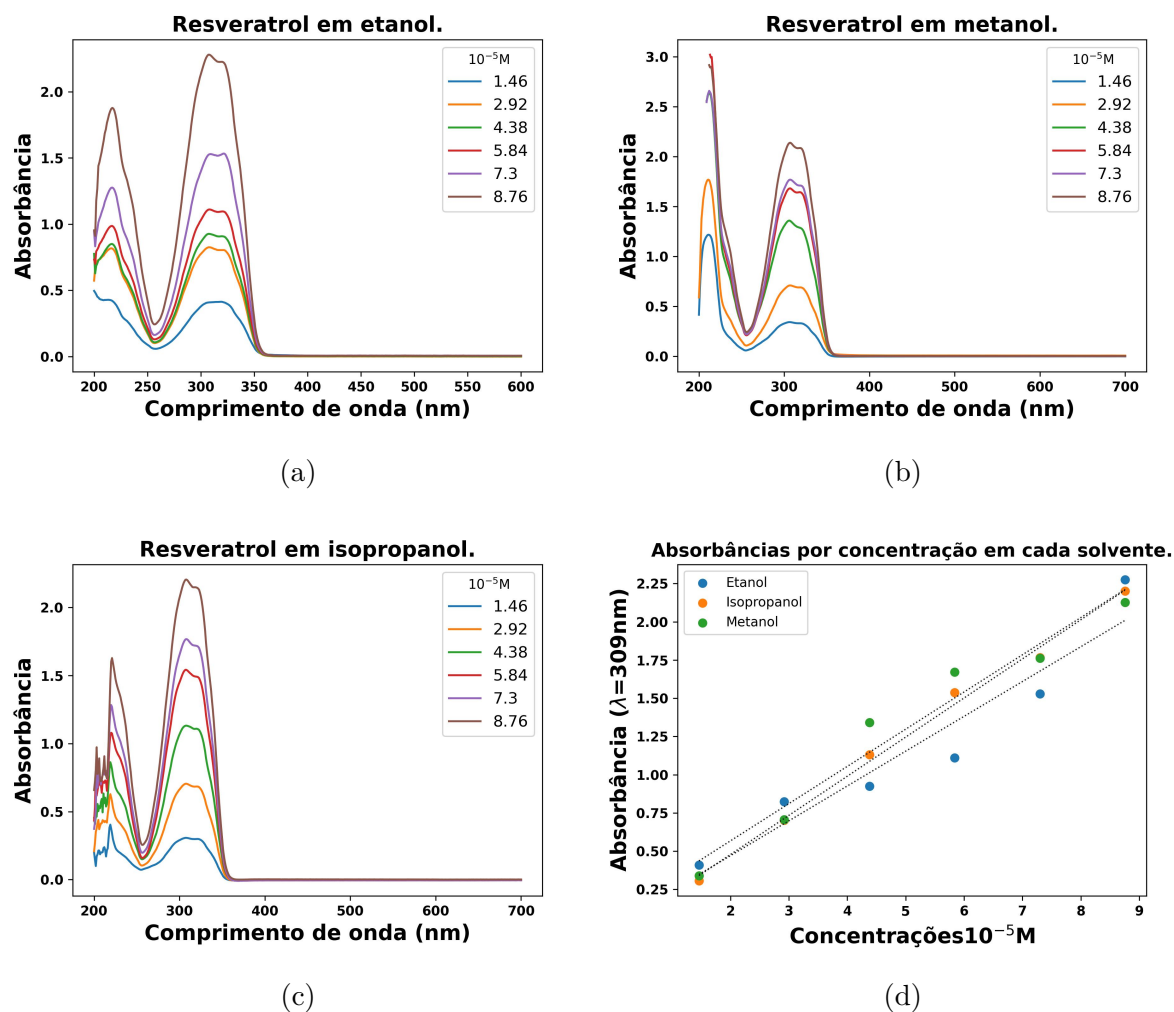


Figura 16 – Espectros de absorção do resveratrol em diferentes solventes para seis concentrações distintas: a) resveratrol em etanol, b) resveratrol em metanol, c) resveratrol em isopropanol, d) absorbâncias em 309 nm por concentração, para cada solvente.

ultravioleta da luz ambiente, o que pode resultar em valores que representem uma mistura dos isômeros, levando a discrepâncias nos resultados.

A mesma análise foi feita para o resveratrone gerado pela irradiação da solução de resveratrol nos três solventes acima utilizados, por 2h na lâmpada 311 nm. Os resultados estão descritos na Figura 17. A Figura 17a apresenta o espectro do resveratrone em etanol, 17b do resveratrone em metanol e 17c do resveratrone em isopropanol. Já o gráfico 17d apresenta distribuição da absorbância em 390 nm para cada concentração em cada um dos solventes. O valor  $\lambda = 390$  nm foi definido pela proximidade ao máximo de absorbância na banda característica do composto, não havendo referência na literatura.

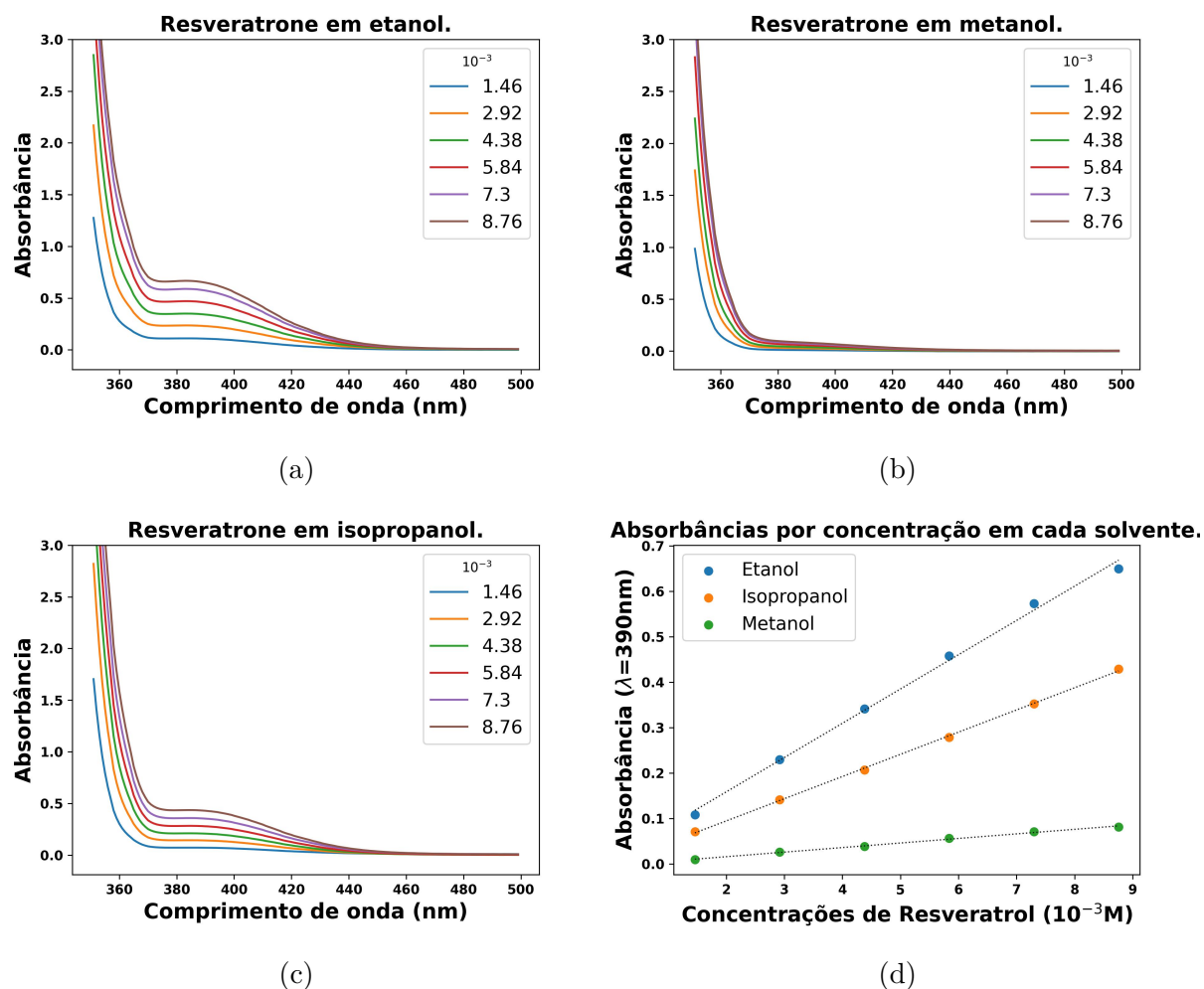


Figura 17 – Espectros de absorção do resveratrone em diferentes solventes para seis concentrações distintas de resveratrol: a) resveratrone em etanol, b) resveratrone em metanol, c) resveratrone em isopropanol, d) absorbâncias em 390 nm por concentração, para cada solvente.

Considerando o surgimento da banda centrada em 390 nm como um indicador indireto da formação de resveratrone, observa-se que a solução em metanol resultou na menor quantidade de resveratrone. Isso pode ser atribuído ao fato de que a banda de maior absorção da solução de resveratrol em metanol ocorreu na faixa de 200 nm, em contraste com as demais soluções, que apresentaram maior absorção na faixa de 300 nm. Isso se deve por que a lâmpada utilizada para irradiar a solução tinha um pico de emissão em 311 nm, sugerindo que sua eficiência na geração do novo composto pode ter sido reduzida.

Os coeficientes de absorção obtidos pela análise polinomial da Figura 17d e suas respectivas incertezas estão na tabela 5:



Solvente	Inclinação ( $cm^{-1}M^{-1}$ )
Etanol	$86 \pm 1$
Isopropanol	$55,6 \pm 0,6$
Metanol	$11,4 \pm 0,1$

Tabela 5 – Inclinação por solvente para as soluções de resveratrone determinados após ajuste polinomial.

Observa-se que os valores obtidos para cada solvente apresentaram divergências significativas. Uma das possíveis razões é de que o soluto não seria o mesmo, isso por que as soluções utilizadas não passaram por nenhum método de separação entre resveratrol e seus fotoprodutos, assim os resultados obtidos são consequência da mistura entre resveratrol, resveratrone e outros compostos desconhecidos. É possível que ao irradiar a solução de resveratrol, são gerados diversos fotoprodutos, e não apenas o resveratrone. Assim, em diferentes solventes, mesmo que a solução seja irradiada pelo mesmo comprimento de onda, a formação de diferentes fotoprodutos pode influenciar os resultados. Vale ressaltar que a literatura atual não documenta a identificação de todos os fotoprodutos derivados do resveratrol.

#### 4.1.2 Espectro de fluorescência por excitação de dois fótons

Foram obtidos os espectros de emissão por excitação de dois fótons das três soluções de resveratrone com respectivos solventes, a partir da Figura 18 concluímos que o composto apresenta intensidade de emissão considerável na faixa de 550 nm, concordando com dados da primeira produção de resveratrone em [6]. A Figura 18 mostra um dos espectros normalizados obtidos pela excitação por 760 nm da solução em isopropanol com concentrações de 0,5 mg/ml, também a curva corresponde a emissão da solução em etanol sob mesmas condições e da solução em metanol por excitação em 780 nm. A solução em metanol claramente apresentou menor fluorescência e menor definição entre sinal e ruído, visualmente também foi possível identificar a menor eficiência.

Para melhor avaliar qual comprimento de excitação permitiu maior intensidade de emissão em cada solução, foi gerado o gráfico PLE como descrito na sessão de métodos experimentais. A Figura 19 mostra as curvas para cada solvente, normalizadas de acordo com o máximo da solução de isopropanol. A solução onde o metanol foi utilizado não apresentou emissão considerável ao longo da faixa avaliada, por isso foram consideradas somente os pontos em que a excitação gerou emissão significativa.

O PLE demonstra uma emissão relevante para comprimentos de onda de excitação entre 720 nm e 850 nm, havendo uma diminuição na intensidade com excitação por volta de 730 nm. A solução de isopropanol obteve fluorescência significativamente maior que as soluções de metanol e etanol.

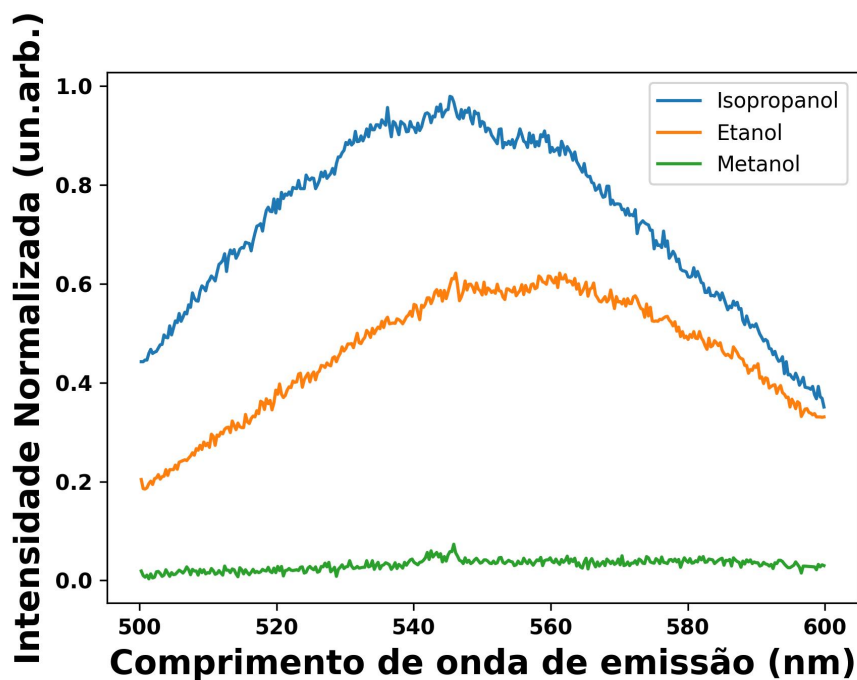


Figura 18 – Intensidade de emissão para cada comprimento de onda em cada uma das soluções utilizadas. Emissões normalizadas de acordo com o máximo da solução de isopropanol.

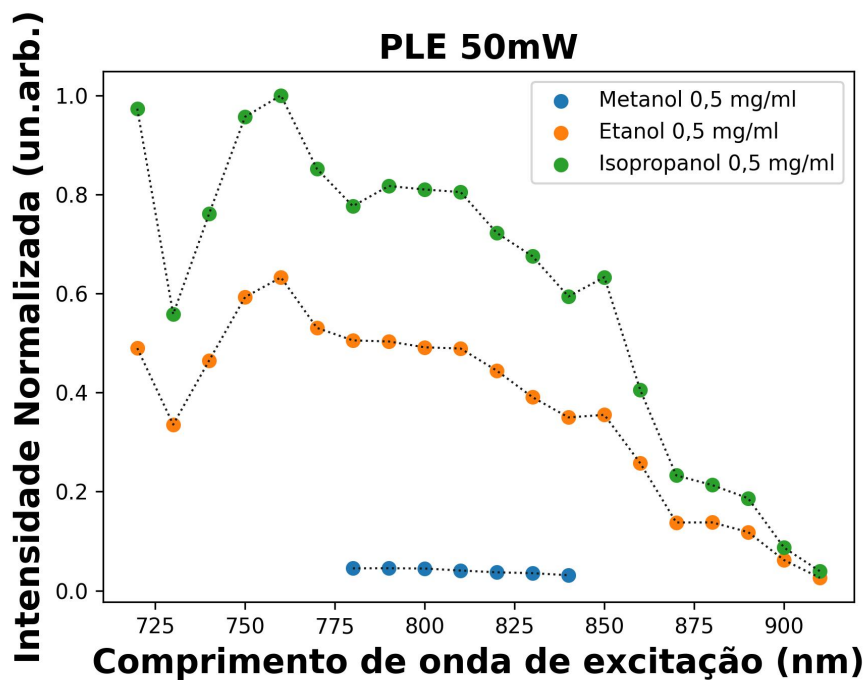


Figura 19 – Curvas de intensidade de emissão normalizadas para cada solução, de acordo com o máximo da emissão da solução de resveratrone em isopropanol, em função do comprimento de onda de excitação.

A larga faixa de excitação é vantajosa para um marcador por permitir flexibilidade, ou seja, permite que seja excitado por diferentes fontes de luz, o que é particularmente útil em experimentos que utilizam múltiplos marcadores com diferentes espectros de absorção, também pode ajudar a minimizar a interferência de outras fluorescências indesejadas, pois permite que a luz de excitação seja ajustada para evitar sobreposições com outras emissões fluorescentes.

Embora o PLE não seja uma medida direta da excitação de um composto, ele pode ser utilizado indiretamente para compreender seu comportamento de excitação. Abaixo, comparamos o PLE gerado por um fóton, estimado ao dividir o comprimento de onda pela metade, da solução em isopropanol com o espectro de absorção. Observa-se que o PLE obtido foi satisfatório, uma vez que a curva apresenta um comportamento consistente com a variação da banda de absorção na mesma faixa espectral.

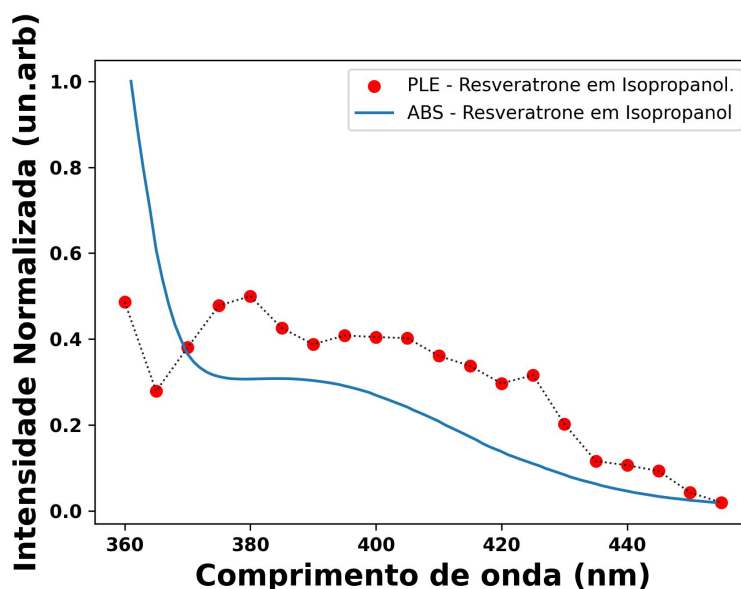


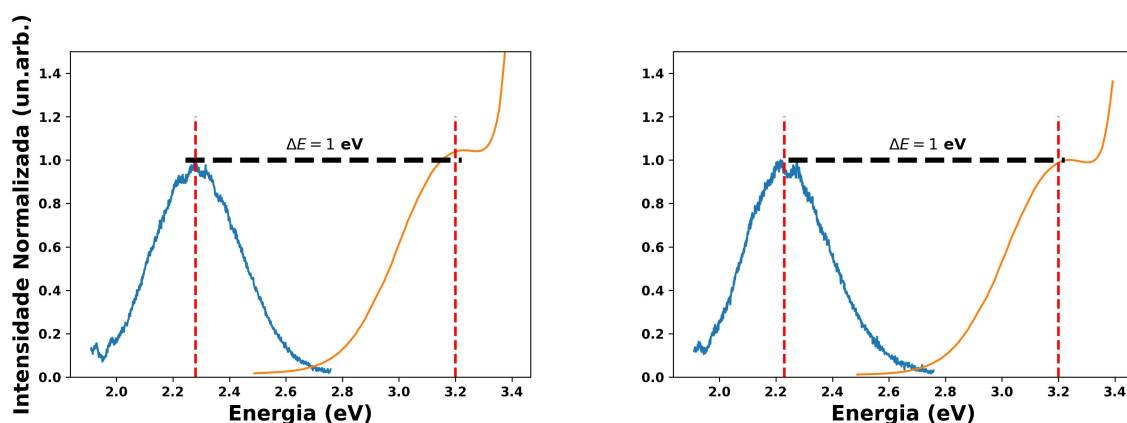
Figura 20 – Comparação entre os espectros PLE e absorção linear para o resveratrone em isopropanol. O comprimento de onda do PLE foi dividido por 2 para comparar com o de um fóton ( $\frac{\lambda}{2}$ ).

Em seguida na Figura 21, utilizamos para cada solução uma das curvas de emissão e comparamos com a curva de absorção. Dessa forma conseguimos determinar o chamado Deslocamento Stokes (ou *Stokes Shift*), essa grandeza compreende a diferença de energia entre o máximo do espectro de absorção e o máximo do espectro de emissão. Como o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia da radiação, a perda de energia desloca o espectro de emissão para comprimentos de onda mais longos do que o espectro de excitação. Quanto maior for o deslocamento Stokes mais simples se torna separar a luz de excitação da luz de emissão, isso reduz a interferência da luz de excitação, melhorando a relação sinal-ruído e permitindo uma detecção mais clara da fluorescência

emitida. Além disso, permite a identificação mais precisa de múltiplos marcadores em uma amostra.

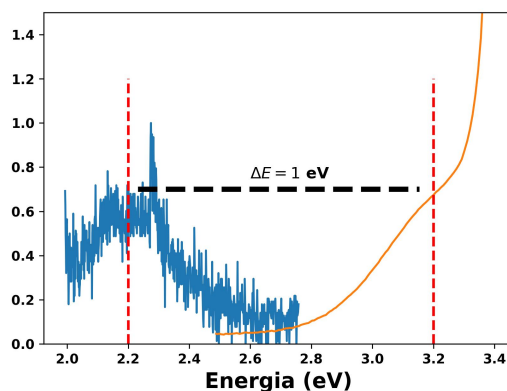
Neste caso, a máxima emissão de fluorescência ocorreu em 545 nm (2.2 eV), enquanto a máxima absorbância da banda principal foi definida em 385 nm (3.22 eV). Assim o deslocamento de Stokes encontrado foi de 160 nm com base na solução de isopropanol, o que é considerado largo para um fluoróforo e equivale a cerca de 1 eV em termos de energia. Não houve diferença significativa entre este deslocamento para as outras soluções.

Em termos da aplicação, um largo deslocamento Stokes é interessante por minimizar a interferência entre a fonte de excitação e a emissão permitindo melhores imagens. A título de comparação, a rhodamina 6G que é um corante extremamente eficiente e muito comum em biociências tem um comprimento de onda de excitação máximo em torno de 530 nm e um comprimento de onda de emissão máximo em torno de 550-560 nm, resultando em um deslocamento de Stokes de aproximadamente 20 a 30 nm que configura em energia por volta de 0,1 eV.



(a) Solução de resveratrone em isopropanol

(b) Solução de resveratrone em etanol



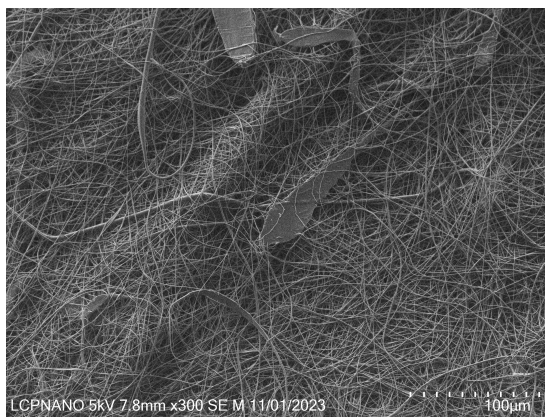
(c) Solução de resveratrone em metanol

Figura 21 – Deslocamento Stokes para o resveratrone em cada solvente.

## 4.2 Marcação em cultura celular

### 4.2.1 Imagens por microscopia eletrônica de varredura

Algumas das imagens de CAN coradas e não coradas feitas por MEV estão representadas na Figura 22. A partir de visualização simples não foram encontradas diferenças significativas entre as fibras, porém para uma avaliação quantitativa da morfologia das fibras com e sem resveratrone aderidos ao relevo são necessárias mais avaliações, possivelmente de comparação entre diâmetros das fibras e também de módulo elástico. Entretanto, um ponto importante acusado pelo grupo de pesquisa do ICB-UFMG é alta habilidade biomecânica das células que são cultivadas no *scaffold* de CAN, isso significa que mesmo com pequenas variações na mecânica das fibras de acetato essas células não teriam grandes problemas na proliferação e diferenciação.



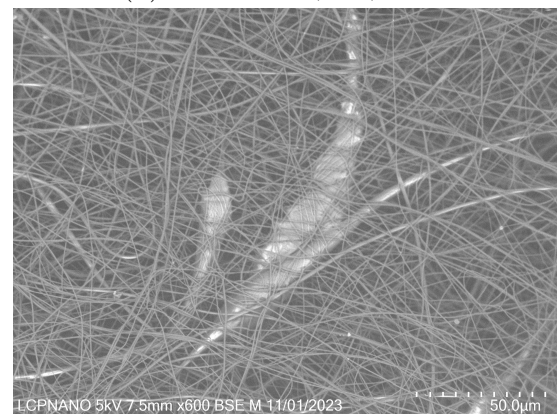
(a) Corada, SE, 300X



(b) Não corada, SE, 300x



(c) Corada, BSE, 600x



(d) Não corada, BSE, 600x

Figura 22 – Imagens por MEV de fibras de acetato de celulose coradas e não coradas.

### 4.2.2 Cultura celular e imagens de fluorescência

Inicialmente, foi realizado um pré-teste utilizando as mesmas condições descritas na Seção 3.4 com células coradas por Alexa Fluor 546 Phalloidin. Obtivemos imagens de fluorescência com excitação por laser contínuo em 546 nm e laser Ti:Safira pulsado sintonizado em 780 nm, com uma potência de 240 mW antes da objetiva e 14 mW após a objetiva.

Na Figura 23, em (a), observa-se a fluorescência por excitação em 780 nm, onde utilizamos um filtro de 560-600 nm. Tanto as fibras quanto as células se tornaram visíveis devido à proximidade dos picos de emissão entre o resveratrone e a Alexa Fluor. Em (b), vê-se a fluorescência por excitação com o laser contínuo em 543 nm, onde somente as células são visíveis. Sobreposemos esses resultados em (c) para separar as células e fibras conforme suas marcações, e em (d) está a imagem de transmissão. Isso demonstra que o resveratrone corou as fibras de forma satisfatória, e a otimização da imagem seria possível caso um corante com pico de emissão distinto do resveratrone fosse utilizado nas células.

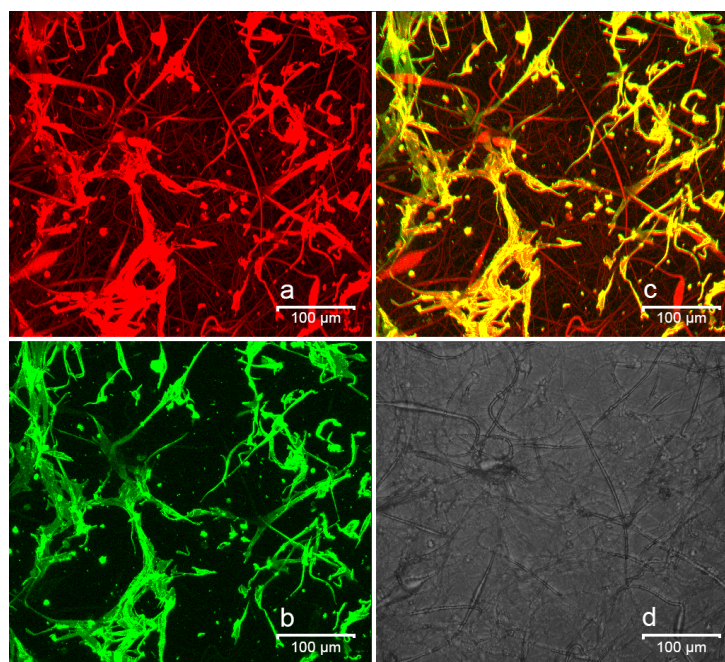


Figura 23 – a) Fluorescência por excitação de dois fótons, excitação de 780 nm. b) Fluorescência por excitação de 543 nm. c) Sobreposição de a e b. d) Imagem de transmissão do laser pulsado.

Com o objetivo de estabelecer medidas controladas e validar os resultados do pré-teste, realizamos a cultura celular nas amostras descritas na tabela 3. No entanto, essas amostras podem ter sido afetadas pela dificuldade na manipulação das fibras durante a troca de suporte, o que pode ter comprometido sua espessura. Em decorrência disso e das possíveis alterações na cultura celular, foi possível observar células apenas nas amostras geradas com fibras coradas por resveratrone em metanol, com algumas raras observações

nas amostras de fibras tratadas com resveratrone em isopropanol. É importante considerar que, mesmo após a secagem do álcool, pode ter ocorrido interferências se a evaporação não foi completa.

Outro aspecto importante na formação das imagens das fibras é que, devido à sua espessura extremamente fina, a transferência das mesmas de um suporte para outro, como de uma placa de 24 poços para lâminas, pode resultar em dobras e até sobreposição de fibras. A Figura 24 foi obtida utilizando os parâmetros descritos na seção 3.4.1, acumulando a intensidade em quatro vezes para melhorar a visualização do relevo gerado em algumas partes das amostras, resultante da manipulação das CAN. Como a microscopia por absorção de dois fótons produz uma imagem do plano focal, o que está logo acima ou abaixo do foco não é detectado. Assim, diferentes posições das fibras no eixo z (perpendicular ao plano da Figura) indicam que essas fibras não estão alinhadas em relação a esse eixo

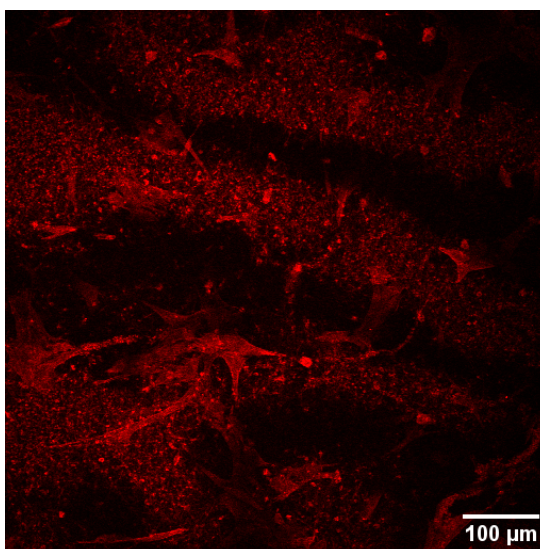


Figura 24 – Imagem exemplo de relevo causado por dobras das CAN em imagem de fluorescência por absorção de dois fótons, excitado por 780 nm.

Já a Figura 25 foi realizada utilizando uma excitação de 800 nm, com o laser pulsado, da amostra referência, onde as células foram coradas com Phalloidin 488 e as fibras não foram marcadas. Podemos observar que as nanofibras não fluoresceram naturalmente e que as células musculares estavam com morfologia prevista: apresentam um fenótipo alongado e afilado, melhor visualizados na Figura 25b com zoom digital de 4x.



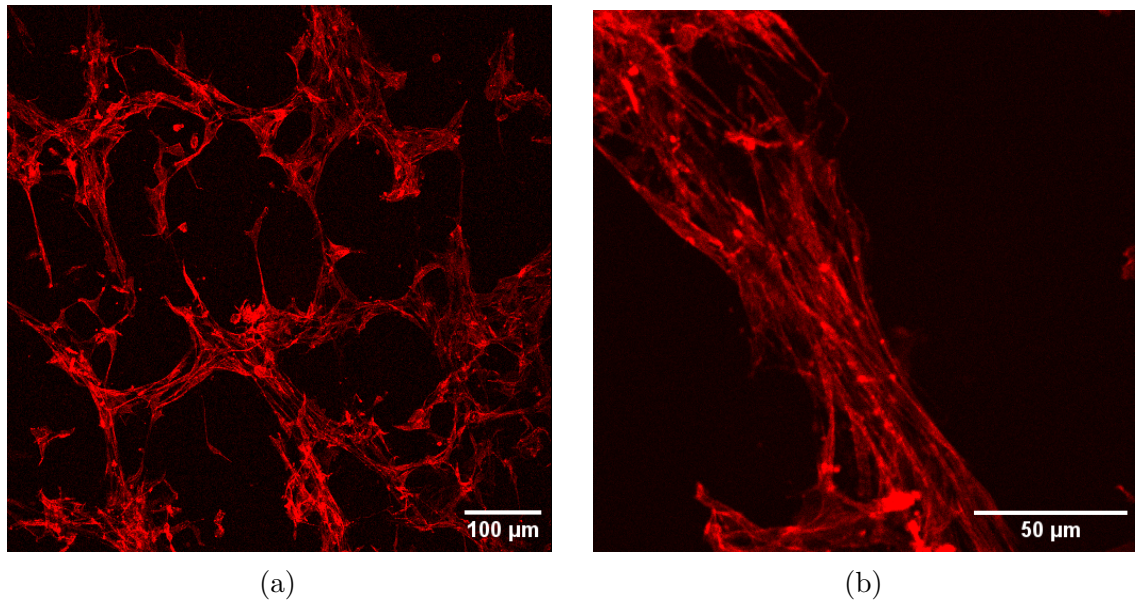


Figura 25 – Imagem de fluorescência por absorção de dois fótons para a amostra referência contendo células musculares coradas por Phalloidin, sendo ambas excitadas por 800 nm e b) imagem com zoom digital de 4x.

Em seguida avaliamos as fibras coradas com resveratrone em solução de isopropanol. Na Figura 26a, a amostra foi excitada por um laser contínuo de 488 nm, sendo essa uma das amostras em que as células foram marcadas com Phalloidin 546. Como podemos observar, não houve presença de células na imagem, possivelmente pelos motivos mencionados anteriormente. Já na Figura 26b, a mesma região de fluorescência foi coletada, mas com excitação por um laser pulsado de 780 nm. Observamos uma diferença no padrão das fibras, atribuída à melhor resolução espacial da técnica de excitação por dois fótons, enquanto o laser contínuo excitou fluorescência em um espaço amplo, coletando dispersões. Esta diferença também é atribuída a dependência do foco em relação ao comprimento de onda incidente, desta forma fibras de diferentes planos podem ter tido fluorescência coletada em cada imagem.



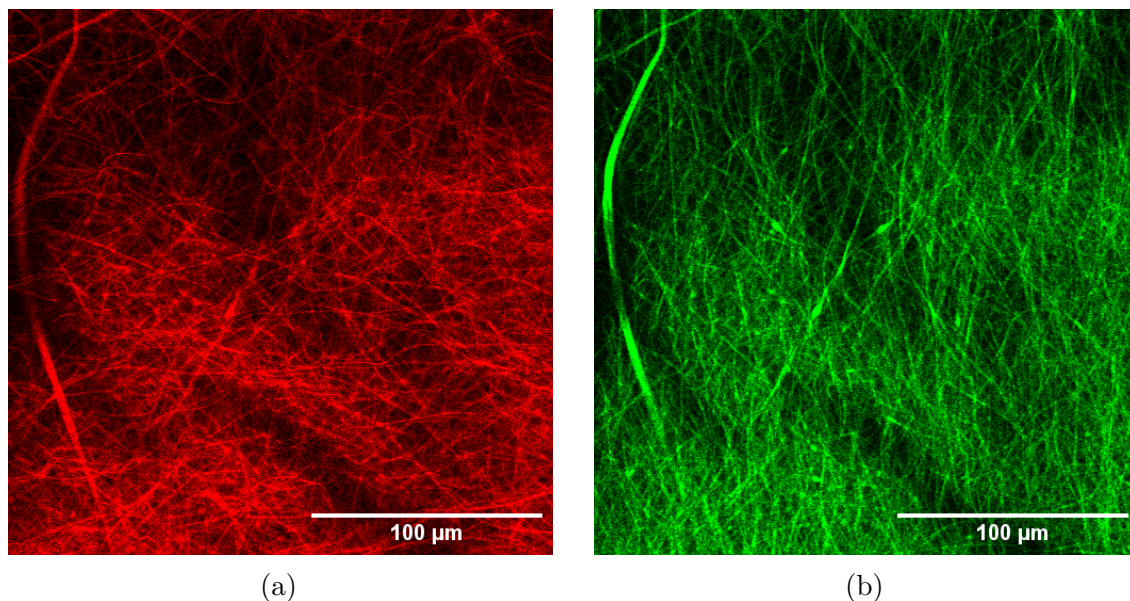


Figura 26 – Imagens de fluorescência por absorção de um e dois fótons de CAN coradas por resveratrone em isopropanol e excitadas por a) laser contínuo a 488 nm, b) laser pulsado a 780 nm.

Na Figura 27 as células nas amostras coradas com WGA, mas também em CAN coradas com resveratrone em isopropanol, puderam ser observadas por excitação por laser contínuo em 488 nm. Utilizando filtro entre 510-540 nm, Figura 27a, algumas células se sobressaíram de acordo com a máxima intensidade do corante em relação ao resveratrone, já com filtro de intensidade entre 560-600 nm, Figura 27b, as fibras ficam mais aparentes apesar de ainda ser possível ver as células, devido a sobreposição do gráfico de emissão do WGA e do resveratrone. Por isso sobrepomos ambas as imagens na Figura 27c, assim obtendo o resultado esperado para a visualização do conjunto células-fibras.

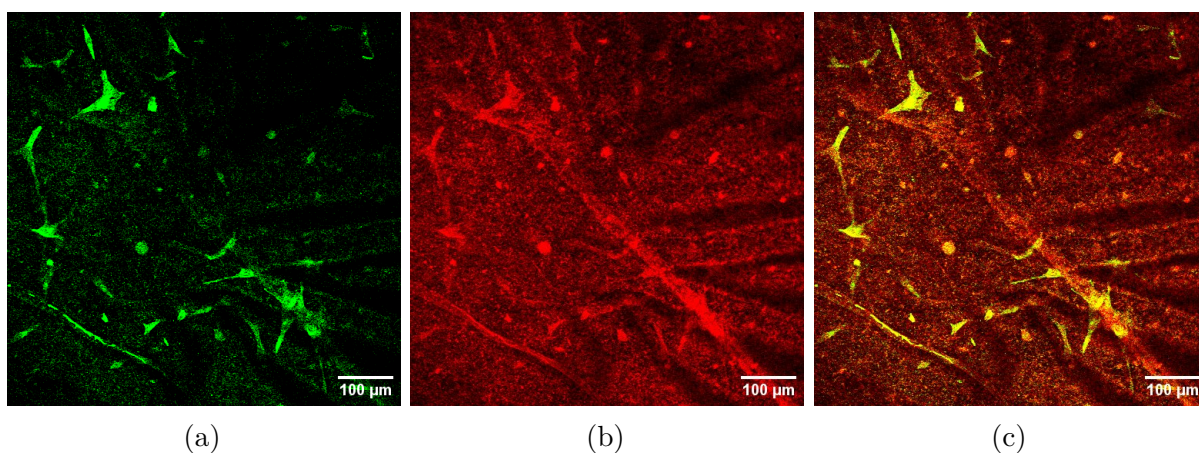


Figura 27 – Fluorescência por absorção de um fóton para a amostra com CAN coradas por resveratrone em isopropanol excitado por 488 nm. a) Filtro de intensidade entre 510-540 nm, b) Filtro de intensidade em 560-600 nm. c) Sobreposição.

Na Figura 28 vemos as imagens de duas amostras diferentes de células coradas com WGA em CAN coradas com resveratrone em etanol. A primeira imagem foi obtida por excitação com o laser pulsado em 780 nm e zoom digital de 2,5x e a segunda por excitação com o laser contínuo em 488 nm. Mais uma vez, não foram encontradas células saudáveis, e ainda podemos ver algumas circunferências que podem indicar células mortas. Entretanto, as nanofibras possuem bom contraste na imagem obtida por absorção de dois fótons, mostrando que o resveratrone aderiu satisfatoriamente às fibras, e a técnica promoveu o esperado em termos de resolução espacial. Note que para a excitação por um fóton as fibras não são claramente resolvidas na imagem.

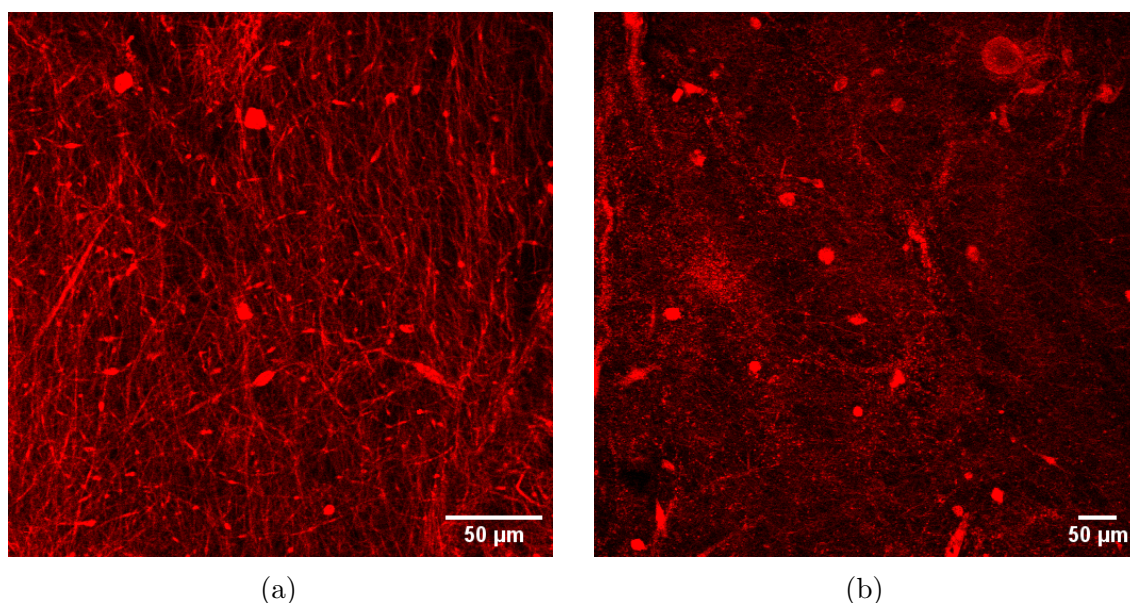


Figura 28 – Imagens de fluorescência de CAN coradas com resveratrone em etanol excitadas por a) laser pulsado a 780 nm, b) laser contínuo a 488 nm.

Por fim, as células coradas com WGA nas amostras em CAN coradas com resveratrone em metanol, foram melhor observadas em relação as outras amostras, como mostra a Figura 29. Essa imagens foram obtidas por excitação usando o laser pulsado também sintonizado em 780 nm. Utilizando filtro entre 510-540 nm, Figura 29a, algumas células se sobressaíram de acordo com a máxima intensidade do corante WGA em relação ao resveratrone, já com filtro de intensidade entre 560-600 nm, Figura 29b, as fibras ficam mais aparentes apesar de ainda ser possível ver as células, devido a sobreposição do gráfico de emissão do WGA e do resveratrone. Por isso sobrepomos ambas as imagens na Figura 29c, assim obtendo o resultado esperado para a visualização do conjunto células-fibras.

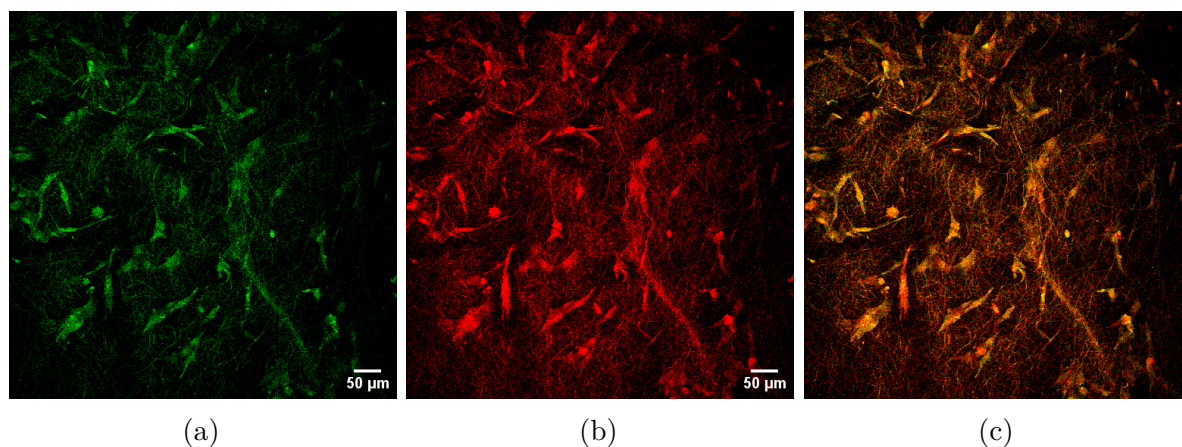


Figura 29 – Fluorescência por absorção de dois fótons para a amostra com CAN coradas por resveratrol em metanol excitado por 780 nm. a) Filtro de intensidade entre 510-540 nm, b) Filtro de intensidade em 560-600 nm. c) Sobreposição.

### 4.2.3 Imagens tridimensionais

Para determinação da profundidade do volume do conjunto de fibras e células cultivadas foram feitas imagens em diferentes distância focais, de forma a cobrir toda a altura do volume das amostras, consideramos que a fluorescência ocorre em toda a profundidade.

A Figura 30a contém a reconstrução tridimensional do volume da amostra referência utilizada na cultura celular. Podemos ver que não há presença de fibras, já que nesta amostra não haviam sido coradas, e as células apresentam formato alongado e afilado com tendência de orientação e formação de agrupamentos celulares também. A resolução espacial para a geração do volume só foi possível devido a dependência quadrática da intensidade de fluorescência à luz incidente que ocorre quando há absorção de dois fótons. Com essa representação também é possível observar a imagens das áreas fluorescentes em cortes nos planos  $xy$ ,  $yz$  e  $xz$ , representado na Figura à sua direita. Foram utilizados 47 planos focais distanciados em  $1\mu m$  ao longo do eixo  $z$  do microscópio (perpendicular ao plano da página), ou seja, uma profundidade de  $47\mu m$  foi encontrada.

Também foi reconstruído o volume da amostra de células com CAN coradas por resveratrone em solução de isopropanol, como mostra a Figura 30b. Foram utilizados 81 planos focais distanciados em  $1\mu m$  ao longo do eixo  $z$  do microscópio, correspondendo a  $81\mu m$ . Apesar de não apresentar muitas células, nessa reconstrução pudemos ver a organização das fibras, assim como relevo desigual e possíveis células mortas sobrepostas as CAN. Os cortes dos planos mostram que a fluorescência ocorreu somente nas fibras, não apresentando dispersão de fundo.

Por fim, na Figura 30c vemos a projeção tridimensional de amostra de células em CAN marcadas com resveratrone em metanol, que apresentou melhor aderência das células. É possível ver os mioblastos em melhor destaque na superfície, apesar de não ser possível a visibilidade delas nos cortes dos planos à direita do volume. Foram utilizados 39 planos focais distanciados em  $1\mu m$  ao longo do eixo  $z$  do microscópio, correspondendo a  $39\mu m$  de profundidade.

A diferença entre as espessuras encontradas deve-se a heterogeneidade das folhas de nanofibras, bem como do número de células presentes. Outro ponto a se considerar são partes das amostras que não fluoresceram, impedindo a formação de imagem no plano focal.

Importante ressaltar que as profundidades não podem ser aumentadas indefinidamente somente por aumentar a eficiência de excitação. Em grandes profundidades, há aumento significativo da fluorescência de fundo uniforme (fora de foco) e, como consequência, um perda de contraste da imagem [27].



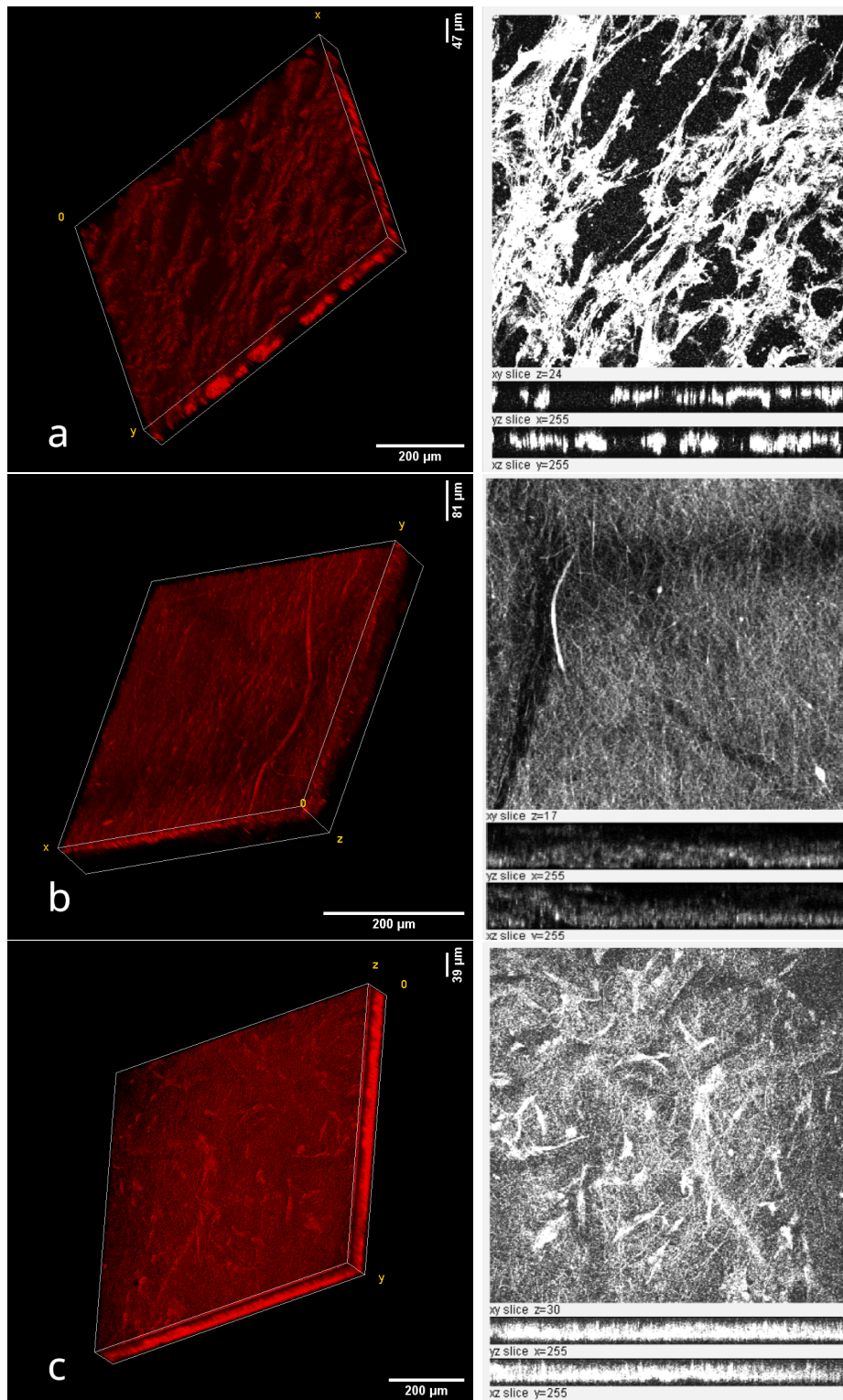


Figura 30 – Projeção tridimensional das imagens da amostra de cultura celular em CAN coradas com resveratrone: a) Projeção da amostra de referência com profundidade de  $47 \mu\text{m}$  (esquerda) e seções transversais da amostra (direita). b) Projeção da amostra de CAN corada com isopropanol com profundidade de  $81 \mu\text{m}$  (esquerda) e seções transversais da amostra (direita). c) Projeção da amostra de CAN corada com metanol com profundidade de  $39 \mu\text{m}$  (esquerda) e seções transversais da amostra (direita).

## 5 Conclusão

Ao longo do projeto, realizamos a caracterização óptica do composto resveratrone em solução alcoólica utilizando três solventes diferentes: etanol, metanol e isopropanol. Para garantir a completude dos dados, medimos o espectro de absorção de seis diferentes concentrações de resveratrol em cada um dos solventes, determinando, em seguida, o coeficiente de absorção molecular de cada solução. A mesma análise foi repetida para as soluções de resveratrone nos mesmos solventes e nas mesmas seis concentrações. Essas soluções foram obtidas após a exposição das soluções de resveratrol à radiação UV por uma lâmpada com pico em 311 nm durante 2 horas. Os coeficientes de absorção molecular do resveratrol encontrados foram compatíveis com a literatura e apresentaram variações mínimas, mesmo com a diferença de solvente, o que era esperado. No entanto, os coeficientes de absorção do resveratrone variaram entre as soluções, possivelmente devido à formação de novos fotoprodutos específicos para cada solvente. A presença desses fotoprodutos impediu o cálculo preciso do coeficiente de absorção do resveratrone isolado.

Em seguida, determinamos os espectros de emissão de fluorescência por excitação de dois fótons em três soluções de resveratrone, cada uma em concentração de 0,5 mg/ml nos mesmos solventes utilizados nas medidas de absorção. Ao excitar as amostras com diferentes comprimentos de onda utilizando um laser pulsado de Ti:Safira, geramos as curvas de fotoluminescência de excitação, ou seja, a relação entre comprimento de onda de excitação e intensidade de emissão. Constatamos que o isopropanol foi o solvente que produziu a emissão mais eficiente, seguido pelo etanol e, por fim, pelo metanol. Também comparamos as curvas de absorção e emissão de cada solução para determinar o deslocamento Stokes, que foi de aproximadamente 160 nm ou 1 eV, um valor extremamente elevado em comparação com corantes conhecidos.

Utilizamos imagens MEV para observar possíveis alterações na morfologia das CAN coradas com resveratrone em comparação com CAN não coradas. Não foram observadas modificações significativas entre as amostras. Esse teste, no entanto, requer análises mais detalhadas e apresenta-se como um procedimento potencial para a continuidade do projeto.

Por fim, realizamos culturas de mioblastos de camundongo sobre nanofibras coradas com resveratrone gerado em cada um dos três solventes. Infelizmente, as culturas celulares não foram satisfatórias em todas as amostras, e será necessário repetir o experimento em etapas futuras. Entretanto, observamos que o resveratrone corou adequadamente as fibras, proporcionando boa resolução do relevo, espaçamento e diâmetro das mesmas. Em especial, nas amostras com metanol, notamos células mais espaçadas em comparação com a referência.

Como o objetivo deste trabalho era avaliar o resveratrone como um potencial marcador fluorescente em biomateriais, concluímos que a solução em isopropanol foi a mais eficiente em termos de fluorescência, e que as nanofibras utilizadas foram coradas de forma satisfatória. Este resultado foi confirmado pelas imagens de fluorescência obtidas por microscopia de absorção de dois fótons, que, além de fornecerem boa resolução espacial, permitiram a determinação da profundidade das amostras.

Dessa forma, a próxima etapa necessária será repetir as culturas celulares para confirmar a biotoxicidade do resveratrone em relação às células.

## Referências

- [1] JANG, M. et al.: *Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes*. **Science Reports**, 275:218–220, 1997. Citado na página 12.
- [2] VÁZQUEZ-AGELL, M.; SACANELLA, E. et al.: *Inflammatory markers of atherosclerosis are decreased after moderate consumption of cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk*. **Journal of Nutrition**, 137:2279–2284, 2007. Citado na página 12.
- [3] WONG, RH. et al.: *Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes*. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, 21:851–6, 2010. Citado na página 12.
- [4] KIM, YH.; KIM, YS. et al.: *Resveratrol Inhibits Neuronal Apoptosis and Elevated Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activity in Diabetic Mouse Retina*. **Diabetes**, 59:1825–1835, 2010. Citado na página 12.
- [5] ASENSI, M. et al.: *Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability*. **Free Radic Biol Med.**, 3:387–398, 2002. Citado na página 12.
- [6] YANG, I. et al.: *Photochemical generation of a new, highly fluorescent compound from non-fluorescent resveratrol*. **Chemical Communications**, 48:3839–3841, 2012. Citado 4 vezes nas páginas 12, 14, 23 e 37.
- [7] SEDNEV, V.M.; BELOV, V.N.; HELL S.W.: *Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review*. **Methods Appl. Fluoresc.** , 3:042004, 2015. Citado na página 12.
- [8] FRANCIOSO, A. et al.: *Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol*. **Medicinal Chemistry**, 10:237–245, 2014. Citado na página 14.
- [9] ROGGERO, JP; GARCIA-PARRILLA, C.: *Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes*. **Science des Aliments**, 15:411–422, 1995. Citado na página 14.
- [10] LORENTE, C.; TOSATO, M.G. et al.: *Clearing up the photochemistry of resveratrol: Effect of the solvent*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** , 367:327–331, 2018. Citado na página 15.
- [11] HAN, G.R. et al.: *Alcoholic Solvent-Mediated Excited-State Proton Transfer Dynamics of a Novel Dihydroxynaphthalene Dye*. **Journal of Physical Chemistry**, 127:7884–7891, 2023. Citado na página 15.



- [12] YANG, I. et al.: *Live bio-imaging with fully bio-compatible organic fluorophores*. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, 166:52–57, 2017. Citado na página 15.
- [13] OLIVEIRA, A.C.X; et al.: *Fluorescence of a Natural Fluorophore as a Key to Improve Fingerprint Contrast Image*. **Journal of Forensic Sciences** , 64:327–331, 2019. Citado na página 16.
- [14] LANGER, R.; VACANTI, J.P.: *Tissue Engineering*. **Science**, 260:920–926, 1993. Citado na página 16.
- [15] POST, M.J.: *Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects*. **Meat Science**, 92:297–301, 2012. Citado na página 16.
- [16] VASITA, R.; KATTI, D.S.: *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. **International Journal of Nanomedicine** , 1:15–30, 2006. Citado na página 16.
- [17] DOS SANTOS, A. L. A.; GUADALUPE, J. L.: *Random cellulose acetate nanofibers: a breakthrough for cultivated meat production*. **Frontiers Nutrition**, 10:1297926, 2023. Citado na página 16.
- [18] TKACHENKO, N.V.: ***Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentation***, volume 1ed. Elsevier, Países Baixos, 2006. Citado 4 vezes nas páginas 17, 21, 22 e 28.
- [19] GOPPERT-MAYER, M.: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. **Annalen der Physik**, 401:273–294, 1931. Citado na página 17.
- [20] BOYD, W.R.: ***Nonlinear Optics***, volume 4ed. Elsevier, Estados Unidos, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 19.
- [21] KAISER, W.; GARRET C.G.B.: *Two-Photon Excitation in CaF<sub>2</sub>: Eu<sup>2+</sup>*. **American Physical Society**, 7:229, 1961. Citado na página 20.
- [22] DENK, W.; STRICKLER, J.H.; WEBB W.W.: *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. **Science**, 248:73–76, 1990. Citado na página 20.
- [23] MOULTON, P. F.: *Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. **Journal of the Optical Society of America** , 3:125–133, 1986. Citado na página 21.
- [24] SPENCE, D.E.; SIBBETT, W.: *60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser*. **Optics Letter** , 16:42–44, 1991. Citado na página 21.
- [25] SPENCE, D.E.; SIBBETT, W.: *Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K*. **The Journal of Chemical Thermodynamics** . , 40:735–738, 2008. Citado na página 26.

- 
- [26] TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L.: *Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability*. **J. Agric. Food Chem.**, 44:1253-1257, 1996. Citado na página 34.
- [27] THEER, P.; DENK, W.: *On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy*. **Journal of the Optical Society of America A**, 23:3139–3149, 2006. Citado na página 48.

# Apêndices

## APÊNDICE A – Participação em Eventos

- **VII Workshop da Pós-Graduação em Física da UFMG**

Apresentação do poster: "Microscopia multifóton para imagens 3D de nanofibras coradas com Resveratrone."

*Universidade Federal de Minas Gerais - 05 a 08/03/2024.*

- **47th Annual Meeting of the Brazilian Biophysical Society**

Apresentação do poster: "Multiphoton microscopy for 3D imaging of nanofibres stained with Resveratrone."

*Universidade de Campinas - 19 a 22/10/2023.*

- **51st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) 46th Congress of Brazilian Biophysical Society (SBBf).**

Apresentação do poster: "Two-photon Fluorescence Excitation Cross Sections of Resveratrone Compound."

*Águas de Lindoia - 05 a 08/09/2022\**

\* Apresentação feita na graduação.