

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

(POSMAT)

Mateus Dassie Maximino

**Interação entre modelos de membrana biológica e poluentes
emergentes**

Presidente Prudente/SP

2018

Mateus Dassic Maximino

Interação entre modelos de membrana biológica e poluentes emergentes

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob orientação do Profa. Dra. Priscila Aléssio.

Orientador: Profa. Dra. Priscila Aléssio

Presidente Prudente

2018

Dassie Maximino, Mateus.
Interação entre modelos de membrana biológica e
poluentes emergentes / Mateus Dassie Maximino, 2018
125 f.

Orientador: Priscila Aléssio

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciência e Tecnologia,
Presidente Prudente, 2018

1. Modelos de membrana. 2. Poluentes emergentes.
3. Mistura de poluentes. I. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciência e Tecnologia. II.
Título.

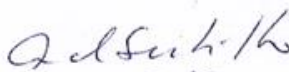
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE MATEUS DASSIE MAXIMINO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 23 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Campus de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. AMANDO SIUITI ITO do(a) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo - USP, Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA do(a) Depto. de Física / UNESP-Câmpus de São José do Rio Preto, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de MATEUS DASSIE MAXIMINO, intitulada **Interação entre modelos de membrana**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO



Prof. Dr. AMANDO SIUITI ITO



Prof. Dr. ELOI DA SILVA FEITOSA



Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a toda a minha família, pelo amor incondicional e suporte, especialmente ao meu pai (Arnaldo) e minha mãe (Liliane), que sempre me ajudaram em tudo que eu sempre fiz.

Gostaria de citar todos colegas do NOIX: Ao Rafa companheiro de muitos anos, ao Diego pelas ideais filosóficas, a Gilia pela sinceridade e mais absoluta espontaneidade, ao Wallance pela imensa ajuda com os conceitos deste trabalho e bolos deliciosos, ao Tib pelas “aulas” particulares de inglês, ao Matheusinho pela amizade desde o início de iniciação, quando fazíamos tudo junto, ao João Domingos pelas dicas de português, ao Pedro e a Sabrina pelos conselhos dados. E especialmente ao Luis e a Cibely, eu não consigo mensurar quão importante esses dois são importantes para mim. O Luis que sempre foi o amigo que eu pude conversar de absolutamente tudo, sempre perguntando, respondendo, estando sempre de prontidão para ajudar. E a Cibely que sempre foi o primeiro alvo das minhas perguntas, que desde da graduação me ajudou em tudo, acho que sem ela me ajudando diariamente, não seria metade do que sou hoje.

Agradeço ao Casé não só por me aceitar no grupo, mas também pelos preciosos conselhos que ele sempre me deu, orientando-me da melhor maneira possível, além é claro de ser um exemplo a ser seguido. Sendo aquele tipo de pessoa que te faz pensar e refletir sobre tudo na vida.

Em especial gostaria de agradecer a Priscila, que foi quem me abraçou nesta jornada, orientando, dando ideias, broncas, mas sempre com o intuito de fazer o melhor trabalho possível. Mostrando sempre grande aplicação e dedicação em tudo o que fazia, sendo um exemplo de pessoa.

“O mundo não é um mar de rosas. É um lugar muito cruel e sórdido, e não importa o quão durão você seja, o mundo vai te bater até você ficar de joelhos e vai te manter assim permanentemente se você deixar. Nem você, nem eu, nem ninguém bate mais forte que a vida. Mas a questão não é quão forte você bate. A questão é o quanto você aguenta apanhar e continuar seguindo em frente; quanto você suporta e continua indo em frente. É disso que as vitórias são feitas! “

Rocky Balboa

Resumo

O presente trabalho trata do estudo da interação entre os poluentes emergentes amoxicilina (AMX) e azul de metileno (AM) com modelos-simples de membrana biológica compostas de fosfolipídios zwitteriônicos (DPPC e DOPC), através de filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs). As membranas foram expostas aos poluentes de forma individual e também misturados (MIX) para que se aproximasse de uma situação real, neste caso, o chamado efeito coquetel, no qual os poluentes são encontrados misturados no ambiente. O objetivo principal foi investigar as possíveis interações entre os poluentes e os fosfolipídios e os consequentes efeitos nas membranas. Nos filmes de Langmuir, as isotermas π -A (pressão superficial por área molecular média) de DPPC revelaram que a AMX e o AM são expulsos da interface ar-água conforme a fase condensada é atingida. O DOPC demonstrou ser menos afetado pela AMX, uma vez que a isoterma não apresentou deslocamento. Contudo, o DOPC se mostrou mais susceptível a interagir com o AM, visto que um deslocamento significativo foi observado. Para ambos os lipídios a MIX causou maiores efeitos, evidenciados por deslocamentos maiores nas isotermas. Análises de módulo compressional mostraram um pequeno aumento na fluidez do filme de DPPC, não observado para o DOPC. As medidas de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) na presença dos poluentes revelaram mudanças na morfologia dos filmes, afetando a formação dos domínios de DPPC e impedindo a formação dos mesmos nas monocamadas de DOPC. Os espectros de PM-IRRAS para o DPPC indicaram possíveis interações eletrostáticas dos poluentes com a cabeça polar do lipídio, assim como uma desordem na região da sua cauda apolar. A monocamada de DOPC foi bastante afetada pois ocorreram mudanças nas vibrações de quase todos os grupos químicos do lipídio, apresentando inclusive mudanças na região da cauda do lipídio. Os espectros de emissão da sonda LAURDAN nas LUVs revelaram um

aumento da rigidez para ambos os lipídios, diferentemente do observado pelas análises de elasticidade da monocamada de Langmuir. As GUVs para ambos os fosfolipídios, ao contrário das monocamadas, apresentaram maior efeito sobre os poluentes aplicados de forma individual, visto que para os poluentes avaliados individualmente foram observados a perda de contraste de fase para os lipídios na presença do AM, assim como mudanças na estabilidade para as GUVs de DOPC em AMX. Tais efeitos não foram observados para a MIX, devido as diferenças estruturais dos modelos de membrana.

Palavras-chave: amoxicilina, azul de metileno, mistura de poluentes, filmes de Langmuir, BAM, PM-IRRAS, GUVs, contraste de fase.

Abstract

The present work is about the interaction between the emerging pollutants amoxicillin (AMX) and methylene blue (MB), with biological membrane models of zwitterionic phospholipids (DPPC and DOPC), through Langmuir films and giant unilamellar vesicles (GUVs). The membrane was exposed to the presence of the pollutants individually, still being performed the analysis with the mixture (MIX) of both in order to get closer to a real situation, in which the pollutants are found mixed in the environment. The main goal was to investigate the possible interactions between the pollutants and phospholipids. The π -A (surface pressure by mean molecular area) isotherms of DPPC reveal that in the condensed phase the lipid expelled the AMX and MB of the air-water interface. The DOPC showed to be less affected by the AMX, once the isotherm did not present a displacement. However, the DOPC showed to be more susceptible to interact with the MB, since significant displacements were observed. In both lipids, the MIX showed to be more effective, causing bigger displacements. The analysis of compressional modulus showed a small increase of the fluidity of the DPPC film, which was not observed to the DOPC. The Brewster Angle Microscopy (BAM) measurements in the presence of the pollutants revealed changes in the morphology, affecting the domains formation of DPPC and inhibiting the formation of the same in monolayers. The PM-IRRAS specters to the DPPC indicated possible electrostatic interactions with the head, as well as a disorder in the tail. The DOPC monolayer was quite affected because there have been changes in almost all chemical groups of lipid, including changes in the tail region of the lipid. The emission spectrum from the dye LAURDAN in the LUVs revealed an increase in the rigidity for both lipids, different from the observed in the analysis of elasticity in the Langmuir monolayers. The GUVs for both phospholipids, unlike the monolayers, showed a major effect on the pollutants applied

individually since that were observed losses of phase contrast for the lipids in the presence of MB, such as changes in the stability of the DOPC GUVs in AMX. Such effects were not observed in the MIX, due to the structural differences in the membrane models.

Keywords: amoxicillin, methylene blues, pollutants mixture, Langmuir film, BAM, PM-IRRAS, GUVs, phase contrast.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química da amoxicilina.

Figura 2: Estrutura química da azul de metileno.

Figura 3: Isoterma esquemática mostrando as três fases de compressão até a formação do filme de Langmuir.

Figura 4: Diagrama da teoria do ângulo de Brewster para (a) um feixe p-polarizado, (b) uma feixe p-polarizado sobre um filme e (c) um feixe de luz não-polarizado incidindo sobre a interface ar-água.

Figura 5: Diagrama esquemático do funcionamento de um sistema de PM-IRRAS em uma cuba de Langmuir.

Figura 6: Ilustração da relação entre a orientação do momento dipolo de transição (M) e o sinal das bandas de absorção nos espectros de PM-IRRAS: (a) bandas positivas, (b) bandas negativas e (c) ausência de bandas.

Figura 7: Ilustração de algumas possíveis formas geométricas de moléculas anfifílicas e possíveis tipos de organização.

Figura 8: Esquema de funcionamento do microscópio de contraste de fase.

Figura 9: Representação esquemática da estrutura molecular dos fosfolípidios DPPC e DOPC, além dos poluentes emergentes amoxicilina e azul de metileno.

Figura 10: Foto da cuba de Langmuir utilizada nas isotermas π -A para a (a) metodologia aplicada nos experimentos e (b) metodologia descartada.

Figura 11: Fotos da cuba de Langmuir com o PM-IRRAS acoplado, com subfase de azul de metileno.

Figura 12: (a) Aparato completo para a realização da extrusão e (b) base e seringas por onde passam as LUVs.

Figura 13: Fotos dos (a) substratos de ITO e o espaçador de teflon e (b) célula de eletroformação pronta para hidratação.

Figura 14: (a) Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-4} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (b) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 15: (a) Esquema representativo da estruturação das monocamadas de DPPC nas fases líquida e condensada para as subfases de (a) AMX, (b) AM e (c) MIX.

Figura 16: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DPPC para as subfases aquosa, AMX, AM e MIX.

Figura 17: (a) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-4} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (b) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 18: (a) Esquema representativo da estruturação das monocamadas de DOPC nas fases líquida e condensada para as subfases de (a) AMX, (b) AM e (c) MIX.

Figura 19: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC para as subfases aquosa, AMX, AM e MIX.

Figura 20: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases aquosa (a)(b)(c) e AMX (d)(e)(f).

Figura 21: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases de AM (a)(b)(c) e MIX (d)(e)(f).

Figura 22: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases aquosa (a)(b)(c) e AMX (d)(e)(f).

Figura 23: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases de AM (a)(b)(c) e MIX (d)(e)(f).

Figura 24: (a) Espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosas e dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) ilustração representativa dos principais grupos químicos das fosfatidilcolinas. As marcações indicadas nas bandas correspondem aos grupos de mesma cor na estrutura química do lipídio.

Figura 25: (a) Espectro PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosa, AMX, AM e MIX na região da cauda do fosfolipídio, obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas do estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 para cada uma das subfases estudadas.

Figura 26: (a) Espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosas e dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio, obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) ilustração representativa dos principais grupos químicos das fosfatidilcolinas. As marcações indicadas nas bandas correspondem aos grupos de mesma cor na estrutura química do lipídio.

Figura 27: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosa, AMX, AM e MIX na região da cauda do fosfolipídio obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas do estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 para a AMX.

Figura 28: (a) Espectros de FTIR para os filmes *cast* para os poluentes AMX, AM e MIX e (b) ilustração representativa dos grupos químicos envolvidos nas interações químicas entre os poluentes.

Figura 29: Espectros FTIR dos filmes *cast* de DPPC na presença dos poluentes AMX, AM e MIX.

Figura 30: Espectros FTIR dos filmes *cast* de DOPC na presença dos poluentes AMX, AM e MIX.

Figura 31: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (a) água ultrapura e (b) AMX. As regiões circuladas em azul representam as possíveis interações secundárias, os vermelhos as interações eletrostáticas.

Figura 32: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (a) AM e (b) MIX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas, e em verde.

Figura 33: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (a) água ultrapura e (b) AMX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

Figura 34: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (a) AM e (b) MIX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

Figura 35: (a) Espectro de emissão da LAURDAN nas LUVs de DPPC em água ultrapura, AMX, AM e MIX e (b) espectro emissão normalizado. Espectros coletados a 23 °C.

Figura 36: (a) Espectro de emissão da LAURDAN nas LUVs de DOPC em água ultrapura, AMX, AM e MIX e (b) espectro emissão normalizado. Espectros coletados a 23 °C.

Figura 37: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC do poluente AMX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 38: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC do poluente AM nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 39: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC do poluente MIX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min

Figura 40: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC para a MIX nas concentrações de 8×10^{-5} , 2×10^{-4} e 8×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 41: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente AMX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 42: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente AM nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 43: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente MIX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 44: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC para a MIX nas concentrações de 8×10^{-5} , 2×10^{-4} e 8×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Lista de tabelas

Tabela 1: Atribuições das bandas nos espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases de AMX, AM e MIX.

Tabela 2: Atribuições das bandas nos espectros PM-IRRAS do DOPC nas subfases de AMX, AM e MIX.

Tabela 3: Atribuições das bandas nos espectros FTIR para AMX, AM e MIX dos picos que tiveram mudanças.

Tabela 4: Atribuições das bandas nos espectros e FTIR para os fosfolipídios DPPC e DOPC.

Tabela 5: Valores de polarização generalizada do DPPC para os diferentes poluentes.

Tabela 6: Valores de polarização generalizada do DOPC para os diferentes poluentes.

Tabela 7: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AM após o intervalo de 30 min.

Tabela 8: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AMX após o intervalo de 30 min.

Tabela 9: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AM após o intervalo de 30 min.

Tabela 10: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 8×10^{-4} mol/L da MIX após o intervalo de 30 min.

Lista de siglas

AC	Corrente alternada
AMX	Amoxicilina
AM	Azul de metileno
BAM	Microscopia de ângulo de Brewster
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfocolina
DPPC	L- α -1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -3-Glicero-Fosfatidilcolina
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
GP	Polarização generalizada
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho
ITO	Óxido de zinco dopado com estanho
LUV	Vesículas unilamelares grandes
L β	Fase gel
L α	Fase líquido-cristalina
M	Momento de dipolo de transição
MIX	Mistura
PC	Fosfatidilcolinas
PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
T $_c$	Temperatura de transição de fase
USGS	United States Geological Survey

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	20
1.1. Poluentes Emergentes	20
1.2. Amoxicilina	21
1.3. Azul de Metileno	22
1.4. Modelos de Membrana Biológica	23
Capítulo 2 – Objetivos	27
Capítulo 3 - Conceitos Teóricos	30
3.1. Filmes de Langmuir	30
3.2. Elasticidade da monocamada.....	32
3.3. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	32
3.4. PM-IRRAS.....	33
3.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	36
3.6. Vesícula Unilamelares Grandes e Gigantes (LUVs e GUVs).....	37
3.7. Medidas de LAURDAN-GP	40
3.8. Microscopias de Contraste de Fase	41
Capítulo 4 - Materiais e Métodos	44
4.1. Compostos.....	44
4.2. Filmes de Langmuir	44
4.3. Módulo compressional.....	46
4.4. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	46
4.5. PM-IRRAS.....	47
4.6. FTIR de filmes <i>cast</i>	48
4.7. Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)	49
4.8. Espectroscopia de Emissão de Fluorescência	50
4.9. Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	51
4.10. Microscopia de Contraste de Fase	52
Capítulo 5 – Resultados e Discussão	55
5.1. Filmes de Langmuir	55
5.2. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	64
5.3. PM-IRRAS.....	70
5.4. FTIR.....	81
5.5. Estruturação das monocamadas.....	85

5.6. Análise de fluidez LAURDAN-GP.....	93
5.7. Microscopia de Contraste de Fase.....	97
Capítulo 6 – Conclusões.....	113
Referências.....	117

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Poluentes Emergentes

A preservação ambiental e da saúde humana sempre foram focos de diversos estudos. Dentre estas áreas, uma das vertentes de estudo está na presença de contaminantes em rios e afluentes. Tais contaminantes podem ser chamados de “poluentes emergentes”, compostos estes que englobam uma gama de diversos resíduos que não deveriam ser encontrados no meio ambiente. Segundo a agência norte-americana USGS (do inglês, *United States Geological Survey*), um contaminante emergente pode ser definido como “uma substância química, de ocorrência natural ou antrópica, ou qualquer microrganismo que não é normalmente controlado no ambiente, mas que tem potencial para entrar no ambiente e causar efeitos adversos ecológicos e (ou) sobre a saúde humana, sendo estes efeitos conhecidos ou suspeitos” [1]. Os exemplos mais comuns de poluentes encontrados na natureza são os pesticidas, herbicidas, produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos, solventes, e outros contaminantes orgânicos que provêm de indústrias. Tais compostos podem causar vários tipos de efeitos colaterais negativos tanto para o meio ambiente [2, 3], quanto para o ser humano [4, 5].

Com o crescimento populacional e a alta densidade demográfica, a geração de resíduos domésticos aumenta a cada ano, as grandes cidades produzem diariamente diversos tipos de produtos químicos que contribuem para a poluição de rios e afluentes, que vem sofrendo com o despejo que insumos industriais, esgotos domésticos, pesticidas agrícolas, entre outros possíveis contaminantes. No Brasil, 50,3% do esgoto gerado é coletado e, desse total, apenas 74% é tratado em estações de esgoto adequadas [6]. Tendo em vista tais números, e sabendo que a maioria das estações de esgoto não estão preparadas para o tratamento ideal [7] devido a maior parte dos poluentes emergentes não serem removidos pelo tratamento de esgoto tradicional empregado na maioria das cidades

[8, 9], concluímos que podemos estar ingerindo uma gama de diversos compostos em baixas concentrações, sobre os quais temos pouco conhecimento em relação aos efeitos causados ao organismo humano quando exposto durante um longo período de tempo. Em particular, existe uma necessidade de se estudar os efeitos “coquetel” (resultado do efeito de compostos de diferentes ações no organismo) e “aditivo” (resultado do efeito de compostos de mesma ação no organismo), ou seja, a maneira como diferentes contaminantes emergentes podem interagir para produzir efeitos adversos. [10].

Se por um lado o tratamento dos efluentes não é adequado, por outro lado, o consumo mundial de medicamentos cresce de forma preocupante, sendo que a população ingere uma quantidade cada vez maior de remédios. Se olharmos para a situação do Brasil, nota-se um crescimento significativo. Em 2006, o Brasil ocupava a 10ª posição no ranking mundial em gastos com medicamentos, em 2011 a 6ª e em 2016 subiu novamente, agora para 4ª posição, ficando à frente de países como Alemanha, França, Índia e Canadá [11]. Assim sendo, os fármacos contribuem de forma significativa para a poluição de rios e afluentes, e os efeitos que estes podem causar aos organismos vivos uma vez que as consequências não são conhecidas.

Dentre os vários fármacos amplamente consumidos no Brasil, a amoxicilina, um antibiótico semissintético do grupo das penicilinas, e o azul de metileno, um derivado fenotiazínico utilizado pela indústria farmacêutica como antisséptico e pela indústria têxtil como corante foram empregados neste estudo.

1.2. Amoxicilina

A amoxicilina (Figura 1) é um dos antibióticos mais produzidos e consumidos no mundo [12], pertencendo ao grupo dos antibióticos penicilínicos. A amoxicilina é usada no tratamento

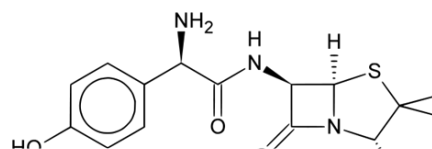


Figura 1: Estrutura química da amoxicilina.

de uma gama de infecções causadas por bactérias que podem manifestar-se nos pulmões (pneumonia e bronquite), nas amígdalas (amigdalite), nos seios da face (sinusite), no trato urinário e genital, na pele e nas mucosas [13]. Atua matando as bactérias que causam essas infecções, agindo diretamente na parede das células, destruindo a membrana celular. É um medicamento administrado via oral ou intravenosa, levemente solúvel em água e pouco solúvel em álcool metílico e etílico. Um fator a se levar em consideração é que grande parte das doses ingeridas é excretada pelo organismo em sua forma ativa pela urina [14], Cerca de 60% a 70% de amoxicilina são excretadas inalteradas pela urina durante as primeiras seis horas após a administração de uma dose padrão [15]. Nos animais a amoxicilina é amplamente utilizada na medicina e nutrição, implicando diretamente em quantidades preocupantes deste composto, sendo inclusive encontrada no leite e em carne de frango e peixe [16].

1.3. Azul de Metileno

O azul de metileno pertence a uma classe de compostos chamados de fenotiazinas, sendo amplamente estudado na literatura nas mais diversas áreas e aplicações. Dentre suas diversas aplicações farmacológicas estão o tratamento de

meta hemoglobinemia [17], além de recentes aplicações como antifúngico [18] e no tratamento do mal de Alzheimer [19]. Na China, o azul de metileno é utilizado no tratamento de algumas doenças de peixes [20], entretanto seu uso foi banido em alguns países como Estados Unidos e Japão [21]. Além disso, é reportado na literatura que a exposição ao azul de metileno em altas concentrações pode acarretar efeitos adversos à saúde, tais como vômitos e necrose de tecidos [22, 23]. Uma das características

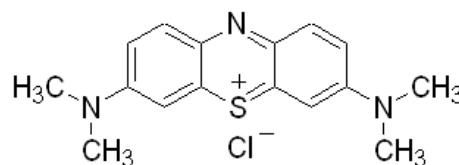


Figura 2: Estrutura química do azul de metileno.

interessantes é a afinidade que derivados fenotiazínicos têm pela membrana celular [24]. O azul de metileno é um sólido de cor verde escura, solúvel em água, que além de suas aplicações farmacológicas, também é utilizado como corante, destacadamente em tinturas de cabelos, tecidos e madeiras [25]. Na literatura, o estudo da interação do azul de metileno com modelos de membranas biológicas é bem difundido, principalmente devido à sua utilização como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, incluindo trabalhos que avaliam a interação através de filmes de Langmuir [26, 27] e de vesículas unilamelares gigantes [28, 29].

A respeito da mistura dos poluentes e sua pertinência, a Organização Mundial da Saúde admite que há uma lacuna de conhecimento quando se trata da avaliação dos riscos associados à exposição a baixas concentrações de drogas a longo prazo [30]. No meio ambiente, tais poluentes são encontrados em baixas concentrações e misturados, porém na literatura são apresentados somente estudos com apenas um analito por vez, existindo, portanto uma lacuna de trabalhos que abordam misturas de poluentes.

1.4. Modelos de Membrana Biológica

Historicamente, os primeiros estudos que evidenciaram a existência de uma barreira que separava o interior do exterior da célula foram realizados por volta do século XIX, principalmente pelo botânico alemão Wilhelm Pfeffer. Foi descoberto que existia uma fina camada que permitia a entrada da água por osmose, porém não de moléculas, tal como a glicose. Esta barreira osmótica foi nomeada de membrana plasmática [25]. Desde então, uma série de outros estudos desencadearam descobertas que nos levaram ao que entendemos hoje como membrana citoplasmática [31], dentre os mais notáveis estão Overton, Langmuir, Nicholson e Singer [32].

A membrana celular é composta basicamente de lipídios e proteínas, que se mantêm devido a interações físicas. Os lipídios se arranjam na forma de uma bicamada lipídica, resultando em uma estrutura dinâmica com espessura de 6 a 10 nm, enquanto as proteínas assumem diversas funções, dentre elas a entrada e saída de moléculas da célula. Outra característica interessante reside no fato de os lipídios das membranas celulares estarem empacotados e possuírem uma pressão lateral em torno de 30 mN/m [33]. Por esse motivo, a maioria das análises relacionadas aos filmes de Langmuir neste trabalho foi realizada utilizando esta pressão de superfície.

Os fosfolipídios presentes na membrana apresentam caráter anfifílico, ou seja, parte da estrutura química apresenta uma afinidade com a água (hidrofílica) e outra parte repulsão (hidrofóbica). Estas moléculas possuem duas cadeias de hidrocarbonetos e terminação com cabeça-polar, que inclui um grupo fosfato [34]. Dentre os tipos de fosfolipídios, as fosfatidilcolinas (PC) representam a maior porcentagem na composição da membrana celular dos mamíferos [35, 36, 37], sendo assim, sua aplicação em estudos de membranas biológica é muito importante e bastante reportada na literatura [38, 39, 40].

O estudo dos poluentes emergentes e modelos de membrana celular são de grande interesse, uma vez que podem contribuir para elucidar efeitos destas moléculas na saúde humana [41] levando em consideração o fato de que a membrana celular é o primeiro ponto de interação com tais moléculas [42, 43, 44, 45].

A membrana celular é um sistema biológico bastante complexo. Sendo assim, estudos específicos *in vivo* se tornam muito complicados, assim como estudos *in vitro*. Busca-se então meios que possam mimetizar a membrana celular de forma mais simples, onde se possa observar uma interação mais específica. Por esse motivo, os sistemas miméticos são importantes, pois podem contribuir para elucidar reações que acontecem

na membrana. Por essa razão, filmes de Langmuir e GUVs (do inglês, *giant unilamellar vesicles*) são amplamente utilizadas como modelos miméticos da membrana celular.

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar a interação entre os poluentes emergentes amoxicilina e azul de metileno, simulando o efeito coquetel em modelos simples de membrana biológica, utilizando para isso as técnicas de filmes de Langmuir (monocamadas) e GUVs (bicamadas) dos fosfolipídios DPPC e DOPC. Os objetivos específicos do trabalho contemplam as seguintes atividades:

1. Estudo da interação entre os fosfolipídios DPPC e DOPC com os poluentes emergentes amoxicilina e azul de metileno via isotermas π -A utilizando filmes de Langmuir para o fosfolipídio na ausência e presença dos poluentes de forma individual e também para a mistura dos mesmos.

2. Avaliação das mudanças morfológicas dos filmes de Langmuir para os fosfolipídios DPPC e DOPC através de medidas de microscopia BAM, para o fosfolipídio na ausência e presença dos poluentes de forma individual e também para a mistura dos mesmos.

3. Identificação dos grupos químicos das moléculas de DPPC e DOPC envolvidos nas interações com os poluentes emergentes de forma individual e com a mistura dos mesmos via PM-IRRAS em filmes de Langmuir.

4. Identificação de uma possível interação entre os fosfolipídios DPPC e DOPC com os poluentes amoxicilina e azul de metileno via medidas de FTIR de filmes *cast*, assim como avaliar uma possível interação que possa estar ocorrendo entre os poluentes quando misturados.

5. Preparar GUVs dos fosfolipídios DPPC e DOPC para observar através de imagens de microscopia de contraste de fase os efeitos dos poluentes emergentes nas bicamadas lipídicas de forma individual e com a mistura dos mesmos.

Capítulo 3

Conceito Teóricos

Capítulo 3 - Conceitos Teóricos

3.1. Filmes de Langmuir

Quando se espalha um material insolúvel em água sobre sua superfície, este tende a se espalhar formando uma película que altera a tensão superficial da interface ar-água. A película formada neste processo é chamada de filme de Langmuir, em homenagem a Irving Langmuir. Em seu trabalho publicado em 1917 [46] ele estuda o espalhamento de moléculas sobre a superfície da água e faz considerações sobre as forças físicas e químicas envolvidas no fenômeno. Foram estes estudos que o levaram a ser agraciado com o prêmio Nobel de química em 1932.

Para a fabricação de um filme de Langmuir utiliza-se um equipamento chamado de “cuba de Langmuir”, que consiste basicamente em uma cuba de teflon na qual é adicionada a subfase, um par de barreiras móveis, que comprimem a monocamada com velocidade controlada e um sensor que mede a tensão superficial. O sensor utilizado nas medidas provém do método de Wilhelmy [47].

Usualmente, para a fabricação de um filme sobre a interface ar-água são necessários alguns requisitos para que o material possa ser empregado. A molécula deve ser anfifílica, ou seja, parte da molécula tem afinidade pela água (caráter hidrofílico) e a outra parte não (caráter hidrofóbico) [47]. Assim, a parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento na superfície da água e a parte hidrofóbica é responsável pela permanência das moléculas na interface ar-água. A molécula de interesse é solubilizada em solventes orgânicos altamente voláteis para que ocorra a evaporação do solvente na interface ar-água. Assim sendo, as moléculas são espalhadas pela superfície da água e após a evaporação do solvente as barreiras são comprimidas de forma que as moléculas, que antes estavam bastante dispersas, passam a se agrupar de uma forma mais organizada, formando uma monocamada ou um filme de Langmuir. A caracterização básica realizada

em filmes de Langmuir consiste em medir a pressão de superfície (π), calculada pela diferença de tensão entre da água pura (γ_0) e a água com a monocamada espalhada (γ), de acordo com a Equação 1:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

Sendo assim, medindo-se a pressão de superfície da monocamada em função da variação da área entre as barreiras obtém-se as chamadas isotermas π -A [48]. Normalmente utiliza-se as isotermas para se obter informações sobre a estruturação da monocamada. Durante a compressão, nota-se que em certos pontos da isoterma podem ocorrer transições de fase, mudanças que indicam uma reorientação das moléculas na interface.

Ao longo da compressão, as isotermas podem apresentar essencialmente três fases: i) a fase gasosa, na qual não há interação entre as moléculas devido as mesmas estarem bastante dispersas; ii) a fase líquida, em que se começa a observar uma pequena interação entre as moléculas, e iii) a fase condensada, na qual a monocamada atinge uma organização empacotada, de espessura monomolecular (Figura 3). Caso a molécula seja comprimida ainda mais, ocorre o colapso da monocamada, o que causa a desorganização do filme.

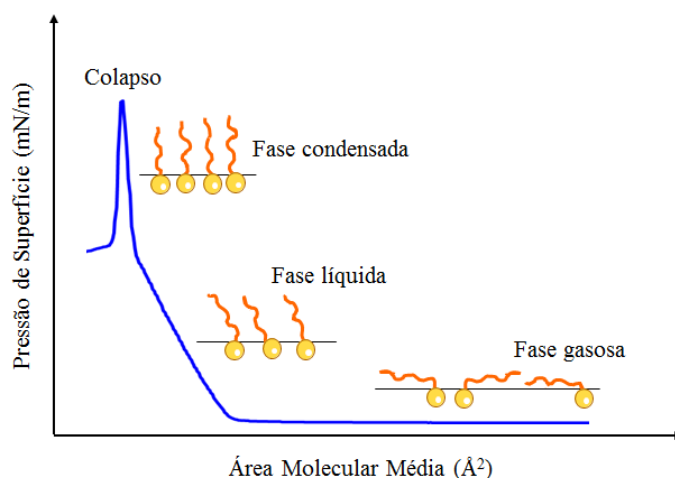


Figura 3: Isoterma esquemática mostrando as três fases de compressão do filme de Langmuir. Adaptado de [47]

3.2. Elasticidade da monocamada

Além de informações referentes ao empacotamento das cadeias na monocamada, podemos ainda obter outros tipos de informações através das isotermas π -A. Por exemplo, o fator de compressibilidade (C_S), ou também módulo compressional (C_S^{-1}), este último definido pela Equação 2:

$$C_S^{-1} = -\frac{1}{A} \frac{\partial \pi}{\partial A} \quad (2)$$

onde π é a pressão de superfície e A é a área molecular média. Essa relação é proporcional à inclinação da curva π -A, ou seja, quanto maior o aumento da pressão de superfície devido a uma compressão, maior será o valor de C_S^{-1} , logo, maior será a rigidez da monocamada. Desta forma é possível determinar quão suscetível a monocamada é à compressão, e além disso, a análise do módulo compressional é essencialmente útil na determinação das regiões das transições de fase [49]. Existem recomendações para a determinação das diferentes fases dos lipídios de acordo com o valor máximo de C_S^{-1} [49], sendo a fase líquido-expandida referente ao intervalo entre 12,5-50 mN/m e a fase líquido-condensada referente ao intervalo de 100-250 mN/m.

3.3. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

Informações sobre a morfologia das monocamadas ou filmes de Langmuir, ou sobre a formação de agregados lipídicos podem ser obtidas utilizando a microscopia de ângulo de Brewster (BAM). A técnica consiste na aplicação de uma fonte de radiação polarizada na direção paralela ao plano de incidência do feixe (p-polarizada), em um ângulo específico. No caso da interface ar-água, este valor é de 53° (ângulo de Brewster) [50], valor este definido pela Equação 3:

$$\tan\theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad (3)$$

Sendo que n_2 é o índice de refração da água e n_1 o índice de refração do ar. Quando tal situação é satisfeita não há a reflexão na superfície, somente a refração (Figura 4 (a)), e, portanto, não se detecta nenhum feixe refletido, deixando a imagem obtida toda escura. Entretanto, quando se adiciona sobre a superfície uma monocamada de um terceiro material com índice de refração diferente da água, o ângulo de Brewster muda, tanto para a interface ar-filme, quanto para a interface filme-água. Logo, o feixe passa a ser refletido e mensurado (Figura 4 (b)) [51], sendo possível captar as informações sobre a morfologia da monocamada.

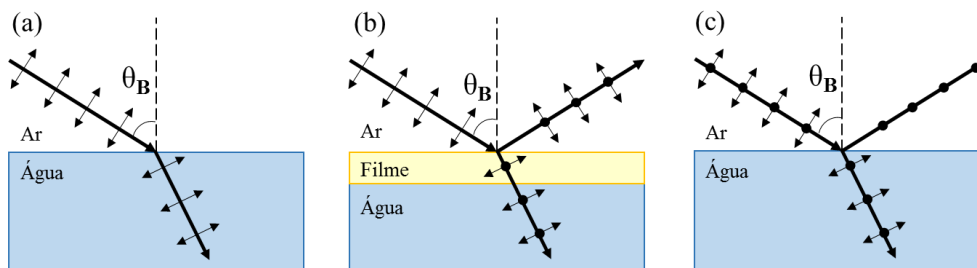


Figura 4: Diagrama da teoria do ângulo de Brewster para (a) um feixe p-polarizado, (b) um feixe p-polarizado sobre um filme e (c) um feixe de luz não-polarizado incidindo sobre a interface ar-água.

Em condições ideais, quando um feixe de luz polarizado incide em um material, a luz refletida será totalmente polarizada na direção s (perpendicular ao plano de incidência), e parte dessa componente também é refratada. Além disso, a luz p-polarizada é completamente refratada (Figura 4 (c)).

3.4. PM-IRRAS

A espectroscopia de reflexão-absorção infravermelha (IRRAS – do inglês *infrared reflection-absorption spectroscopy*) foi desenvolvida em 1960 por Robert G. Greenler, sendo destacadamente empregada em filmes finos depositados sobre substratos metálicos

[52, 53]. Entretanto, uma característica interessante deste método está no fato de que quando o feixe infravermelho rasante (cerca de 80° com a normal do plano) incide sobre a superfície, somente a radiação p-polarizada (paralelo ao plano de incidência) é refletida devido às regras de seleção dos metais [54]. Porém, sobre em uma superfície aquosa tais regras de seleção não existem, logo seriam detectadas as vibrações em todas as direções simultaneamente, fato este que impossibilitaria a obtenção de informações sobre a organização das moléculas em uma superfície aquosa. Além disso há outro fator importante: as bandas referentes à água presente na subfase ou na forma de vapor do ambiente causam uma sobreposição na maioria das bandas de interesse biológico (1400 a 1800 cm^{-1}). Para superar este problema, em 1993 foi desenvolvida uma técnica conhecida como espectroscopia de absorção-reflexão infravermelha com polarização modulada (PM-IRRAS) [54], a qual constituía no emprego da radiação infravermelha polarizada em dois planos distintos (p e s , ortogonais entre si), cuja modulação em alta frequência (kHz) garante uma incidência alternada e praticamente simultânea entre o feixe de luz p-polarizado (paralela ao plano de incidência) e o feixe s-polarizado (perpendicular ao plano de incidência) na superfície da água, como está ilustrado na Figura 5.

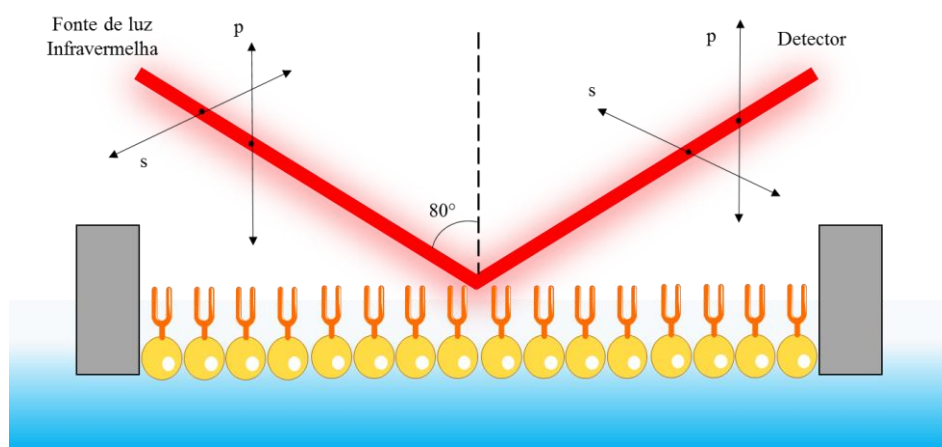


Figura 5: Diagrama esquemático do funcionamento de um sistema de PM-IRRAS em uma cuba de Langmuir.

Sendo assim, os espectros gerados pela absorção-reflexão destes dois planos coletados quase que simultaneamente seguem a Equação 4, que representa a refletividade diferencial (S):

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (4)$$

sendo R_p a refletância referente a plano p e R_s a refletância referente ao plano s. Com tal configuração, os espectros obtidos são independentes da absorção isotrópica [55], visto que tais absorções estão presentes em ambos os espectros de refletividade relativa gerados por cada plano, minimizando assim a interferência do vapor de água e do monóxido de carbono. Os espectros obtidos pelo PM-IRRAS fornecido pelo software do aparelho são normalizados de acordo com a Equação 5 [55]:

$$\frac{\Delta S}{S} = \frac{S - S_0}{S_0} \quad (5)$$

onde $\Delta S/S$ corresponde ao espectro de PM-IRRAS normalizado, S é a refletividade de polarização modulada medida para a superfície da subfase recoberta pelo filme e a S_0 refletividade medida para a superfície limpa da subfase. Um fator interessante para a análise está no fato de que bandas positivas em um espectro de PM-IRRAS indicam uma orientação do momento de dipolo de transição \mathbf{M} preferencialmente no plano da superfície (Figura 6 (a)), enquanto bandas negativas indicam uma orientação preferencial de \mathbf{M} perpendicular à superfície (Figura 6 (b)) [56]. Para ângulos próximos ao ângulo de Brewster, ou seja, quando \mathbf{M} está orientado a cerca de 53° em relação à superfície, há ausência de bandas (Figura 6 (c)).

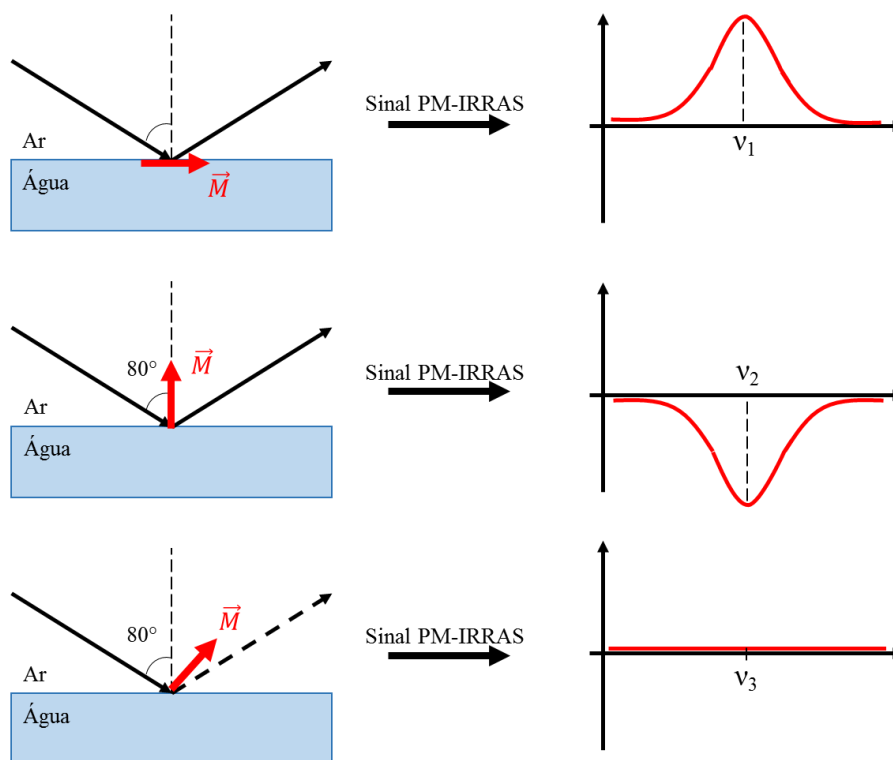


Figura 6: Ilustração da relação entre a orientação do momento dipolo de transição (\vec{M}) e o sinal das bandas de absorção nos espectros de PM-IRRAS: (a) bandas positivas, (b) bandas negativas e (c) ausência de bandas. Adaptado de [56].

3.5. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho consiste na absorção de radiação variando no intervalo de 4000 a 10 cm^{-1} , logo, trata-se de transições que envolvem as vibrações das moléculas [57]. A molécula é excitada de um estado vibracional para outro de maior energia pela absorção direta da radiação no infravermelho.

Um modo vibracional ativo no infravermelho é ressonante quando existe uma variação no momento de dipolo molecular durante a vibração proveniente da radiação incidente com a molécula, gerando assim uma variação na amplitude da vibração. O momento de dipolo é uma propriedade molecular definida pela distribuição de carga em

uma molécula no estado de equilíbrio geométrico (mínimo de energia). Define-se o vetor do momento de dipolo de acordo com a Equação 6:

$$\mu = \mu_0 + \left. \frac{\partial \mu}{\partial Q} \right)_0 \delta Q + \left. \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mu}{\partial Q^2} \right)_0 \delta Q^2 + \dots \quad (6)$$

Cada parte desta equação tem uma contribuição diferente para o momento de dipolo: o primeiro termo se refere ao momento de dipolo permanente; ii) a segunda parte, ou seja, a derivada parcial de primeira ordem, é o responsável pela absorção da radiação infravermelha; e, iii) a terceira parte (derivada parcial de segunda ordem) é responsável pela presença de frequências dobradas e combinações (*overtones e combinations*) nos espectros de infravermelho [58].

3.6. Vesícula Unilamelares Grandes e Gigantes (LUVs e GUVs)

A membrana celular é um dos primeiros pontos de ação de compostos nos seres vivos. Dessa forma, as vesículas unilamelares grandes e gigantes (LUVs e GUVs, ambas do inglês *large unilamellar vesicles* e *giant unilamellar vesicles*, respectivamente) têm se mostrado ferramentas muito úteis para mimetizar a membrana celular, devido à complexidade de estudos *in vivo*. Na literatura há uma ampla gama de estudos envolvendo a mimetização da membrana biológica que vão desde a determinação da composição e estrutura [59], interações [60], entre outros.

Um dos modelos mais simples de uma membrana é uma bicamada lipídica formando uma vesícula que pode ser formada por diferentes processos. Há diversas técnicas para a formação de vesículas, e dentre as técnicas mais conhecidas para a fabricação de LUVs está a extrusão, que se baseia na passagem de dispersões de vesículas multilamelares espontaneamente formadas através de membranas filtrantes com diâmetro de poros bem definidos [61]. Vesículas também podem ser formadas pela técnica

conhecida como dispersão de solventes, que depende da evaporação dos solventes ao qual foram solubilizados os lipídios, e ainda, da aplicação de vácuo para a formação das vesículas [62]. Porém uma das metodologias mais utilizadas em estudos de sistemas miméticos é a fabricação de GUVs pelo método de eletroformação. Esse método foi proposto inicialmente por Angelova *et al.* [63], e, consiste na aplicação de um campo elétrico alternado para a formação da vesícula. Esse método permitiu uma produção controlada das GUVs, sendo amplamente utilizada em estudo de modelos de membrana [64, 65, 66].

Existem algumas formas de auto-organização as quais as moléculas anfifílicas podem assumir quando colocadas em um solvente aquoso. Algumas das principais formas estão representadas na Figura 7. As diferentes estruturas que as moléculas anfifílicas adquirem dependem da relação entre volume ocupado pela cabeça polar e as caudas hidrofóbicas, sendo que diferentes volumes dão origem a diferentes tipos de empacotamento, gerando assim diferentes organizações geométricas [37,67].

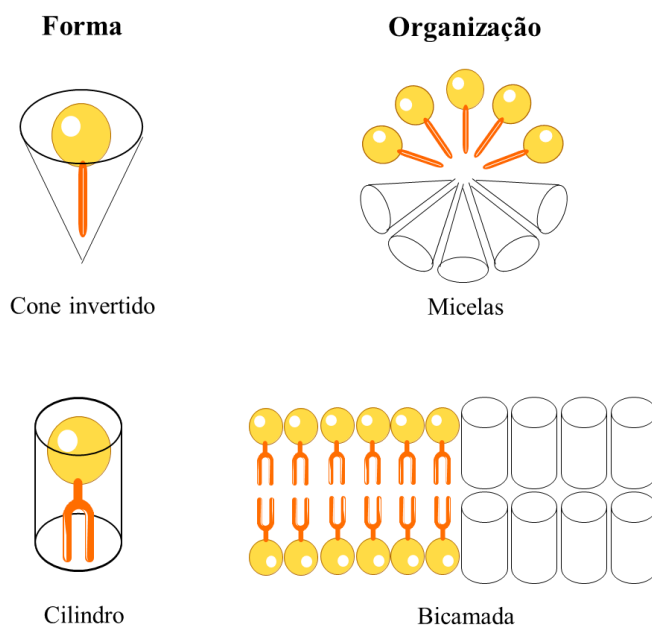


Figura 7: Ilustração de algumas possíveis formas geométricas de moléculas anfifílicas e possíveis tipos de organização

Sendo assim as vesículas podem ser classificadas da seguinte maneira, sendo que tais valores divergem de autor para autor [67, 68]:

- Vesículas Unilamelares Pequenas (*Small Unilamellar Vesicles - SUV*) menores que 100 nm.
- Vesículas Unilamelares Grandes (*Large Unilamellar Vesicles - LUV*) de 100 nm a 1000 nm.
- Vesículas Unilamelares Gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles - GUV*) maiores que 1000 nm.

Outro fator importante no estudo das vesículas relaciona-se com a forma com que os fosfolipídios se organizam nas membranas em diferentes condições de temperatura. Considera-se duas fases termodinâmicas que dependem do estado de ordenação das cadeias hidrofóbicas, as chamadas fase gel (L_{β}) e líquido-cristalina (L_{α}).

Quando os fosfolipídios possuem uma organização de forma que as caudas ficam estendidas e ordenadas, a estrutura lipídica é mais rígida, logo, dizemos que eles se encontram na fase gel (L_{β}), devido à restrição do seu movimento lateral. A medida que se aquece tal estrutura a uma dada temperatura, a conformação dos fosfolipídios é alterada pela perda da ordem lateral, ou seja, ocorre um aumento da mobilidade, sendo que os mesmos se organizam em uma nova fase chamada de líquido-cristalina (L_{α}). A temperatura de transição (T_C) das fases depende de alguns fatores, dentre eles estão a natureza do grupo polar da cabeça lipídica e do comprimento e grau de insaturação das cadeias de ácido graxo. Em geral, a T_C aumenta com o comprimento das cadeias e diminui com o grau de insaturação [67, 69].

A formação de bicamadas lipídicas se dá de forma espontânea. Tal processo é chamado de autoassociação ou automontagem. Basicamente, neste processo as regiões polares tendem a ficar próximas às regiões polares, e regiões apolares tendem a ficar

próximas de regiões apolares, devido às características hidrofílicas e hidrofóbicas dos fosfolipídios.

3.7. Medidas de LAURDAN-GP

O estudo da polarização generalizada (GP- do inglês *generalized polarization*) da sonda LAURDAN é utilizado para evidenciar mudanças na polaridade do ambiente ao qual tal amostra é exposta, ou mudanças que possam ocorrer devido à presença de materiais externos. A respeito de estruturas lipídicas, mudanças no comprimento de onda de emissão da sonda podem indicar variações na fluidez da bicamada [70, 71]. O espectro de emissão da LAURDAN está ligado a presença e mobilidade de moléculas de água próximo ao grupo glicerol dos lipídios [72]. Sendo assim, se o empacotamento lipídico é pouco ordenado (fase líquido-cristalina), a emissão sofre grande influência, devido ao processo de reorientação das moléculas de água ao longo do momento de dipolo do estado excitado do LAURDAN. Entretanto, em meios mais rígidos (fase gel) tal efeito não é tão significativo. Desta forma é atribuída uma relação entre as intensidades de emissão e os comprimentos de onda, sendo 440 nm representativo de um ordenamento mais rígido, onde a água não é tão presente, e 490 nm representativo de uma maior influência da água na emissão da sonda, ou seja, uma maior fluidez [73]. Essa relação é conhecida como Polarização Generalizada do LAURDAN (LAURDAN-GP), e é representada pela Equação 7:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (7)$$

onde I_{440} e I_{490} são as intensidades do espectro de emissão nos comprimentos de onda em 440 e 490 nm, respectivamente. Tal relação proporciona informações sobre a mobilidade e penetração da água nas estruturas lipídicas, o que auxilia o entendimento das mudanças

na rigidez/fluidez das bicamadas lipídicas, causadas pela presença de um composto externo a sistema.

3.8. Microscopias de Contraste de Fase

O microscópio de contraste de fase ilustrado na Figura 8, inventado pelo físico holandês Fritz Zernike em 1935 [74], é um instrumento óptico que pode ser utilizado para produzir imagens com um alto contraste de espécimes transparentes, convertendo uma modulação de fase espacial em uma modulação de intensidade espacial. Tal aparelho é importante no estudo das células microscópicas, pois, desde então, não houve mais a necessidade de pigmentar as amostras.

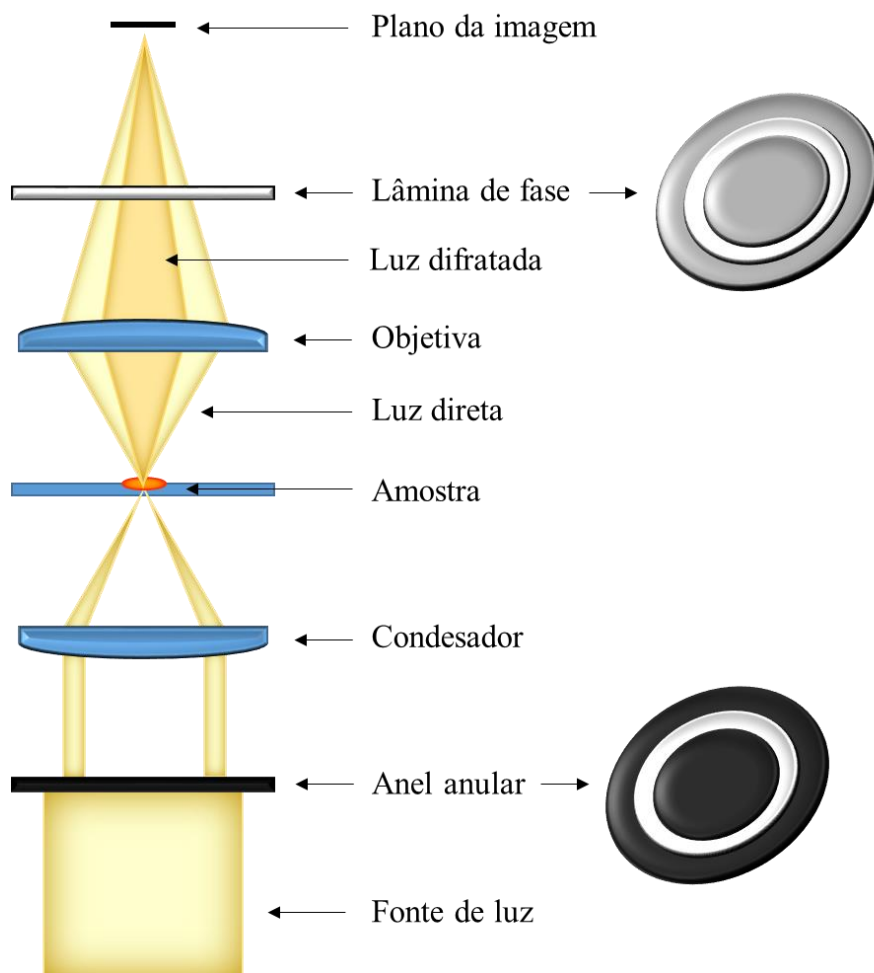


Figura 8: Esquema de funcionamento do microscópio de contraste de fase. Adaptado de [75]

O conceito envolvido no funcionamento do microscópio de contraste de fase baseia-se no princípio de que a densidade de um corpo determina a velocidade com que a luz o atravessa e, conseqüentemente, o seu índice de refração. Quando uma partícula transparente, cujo índice de refração é próximo do meio envolvente, é atravessada por um raio luminoso, uma parte do raio atravessa sem se desviar, enquanto que outra parte se difrata e desvia [76].

O microscópio de contraste de fase é dotado de um sistema óptico especial que transforma diferença de fase dos raios de luz em diferença de intensidade luminosa. Um objeto transparente é composto por estruturas distintas, podendo ter espessuras diferentes por todo o seu comprimento. Esta variação de espessura que um objeto transparente pode ter causa atrasos diferentes na luz que o atravessa. Isto gera diferenças de fase na luz emergente, que, por interferência, são transformadas em diferenças de amplitude, gerando diferenças de intensidade luminosa [77].

No microscópio de contraste de fase, mostrado na Figura 8, o raio mais lateral que passa através da objetiva, conjunto de lentes que permite a ampliação do objeto, é adiantado de $\frac{1}{4} \lambda$ em relação à luz central, pela introdução de uma placa anelar na objetiva. Uma placa semelhante é posicionada no condensador, que distribui regularmente no campo visual do microscópio a luz refletida pelo espelho, se introduz um diafragma anelar. A placa anelar é um disco transparente com um sulco em forma de anel, que coincide com a imagem direta do condensador. O efeito de fase decorre da interferência entre a imagem geométrica fornecida pela parte central da objetiva e a imagem difratada, dada pelos raios laterais, adiantada de $\frac{1}{4} \lambda$. Isto gera diferenças de fase que são transformadas em diferenças de intensidade luminosa.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

4.1. Compostos

Os fosfolipídios zwitteriônicos DPPC (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) e DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids Inc., a amoxicilina (AMX) e o azul de metileno (AM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich co. As massas molares do DPPC, DOPC, AMX e AM são respectivamente 745, 786, 365,4 e 373,9 g/mol. A AMX tem valores de pKa de 2,69, 7,49 e 9,63, enquanto o AM tem valores de pKa de 3,8 e 5. As estruturas dos lipídios e dos poluentes no pH utilizado no trabalho estão representadas na Figura 9.

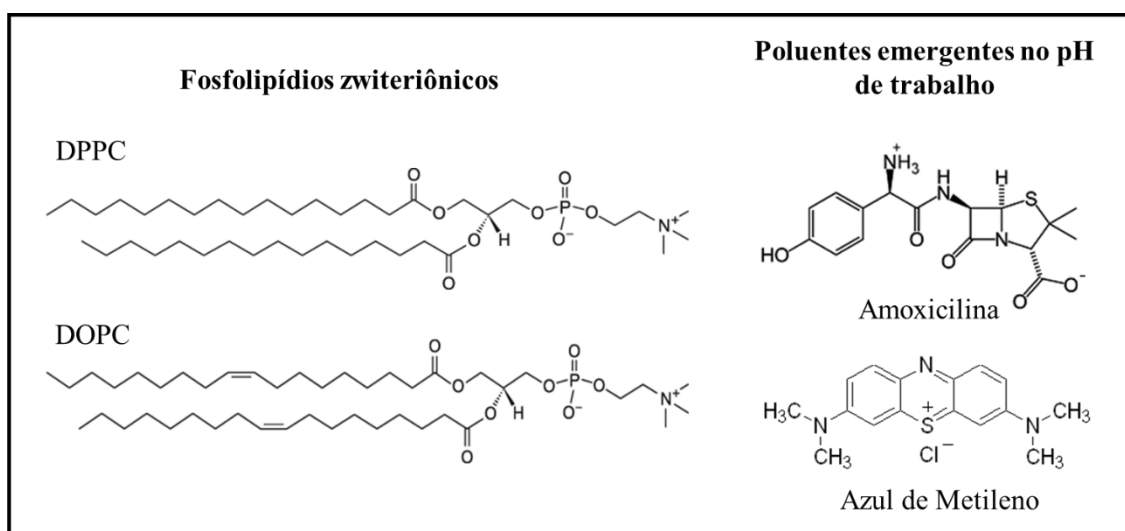


Figura 9: Representação esquemática da estrutura molecular dos fosfolipídios DPPC e DOPC, além dos poluentes emergentes amoxicilina e azul de metileno no pH estudado.

4.2. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram estudados em uma cuba de Langmuir KSV Nima modelo 2000. As isotermas foram obtidas em triplicata em três diferentes subfases aquosas, amoxicilina, azul de metileno e a mistura de ambos os poluentes, todos com a mesma concentração de 1×10^{-4} mol/L (Figura 10 (a)), sendo todas vertidas na cuba antes

do espalhamento dos fosfolipídios. Os filmes de Langmuir foram produzidos espalhando 35 e 45 μL das soluções de DPPC e DOPC, respectivamente, ambas com concentração de 0,5 mg/ml dissolvidas em clorofórmio. As isotermas π -A foram obtidas a 23 °C pelo método de Wilhelmy, utilizando o sensor de fio de platina. A monocamada foi comprimida simetricamente a uma velocidade constante de 10 mm/min. Todas as isotermas foram todas obtidas em triplicata, porém na seção de resultados e discussão as figuras foram plotadas apenas com uma isoterma, para facilitar a visualização, uma vez que todas as isotermas reproduziram.

Uma segunda metodologia foi empregada para as isotermas π -A, a qual se espalhava o fosfolipídio na interface ar/água, comprimindo as barreiras até a pressão de 30 mN/m. Em seguida foram inseridos os poluentes na subfase com uma microseringa por baixo das barreiras, de forma que os poluentes entrariam em contato com a monocamada já compactada. Entretanto notou-se que a difusão dos poluentes em água não foi satisfatória, como pode ser observado na Figura 10 (b), esta constatação foi feita devido ao azul de metileno ter uma cor característica, o que possibilitou observar que a subfase não estava uniforme conforme o esperado. Sendo assim esta metodologia foi descartada.

Foi realizada também a compressão das barreiras apenas com os poluentes na subfase, sem a presença dos fosfolipídios na interface, com o intuito de observar alguma atividade superficial dos poluentes. No entanto nenhuma atividade superficial foi observada nas isotermas π -A, visto que o valor de pressão de superfície foi o mesmo durante toda a compressão das barreiras.

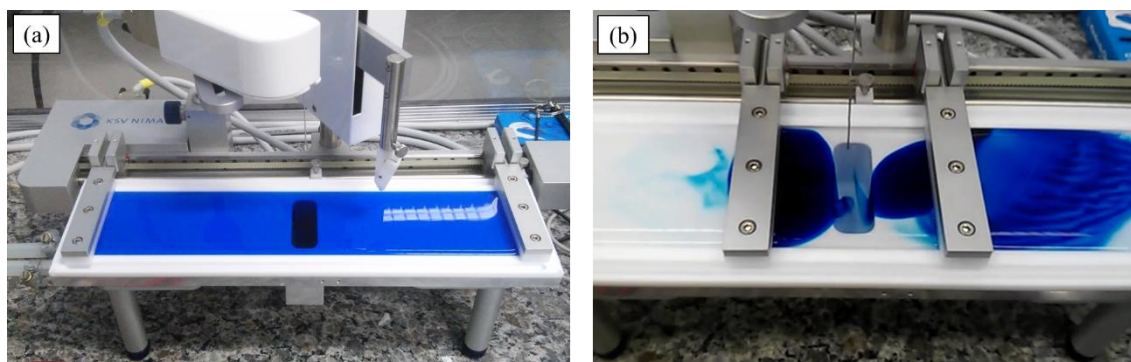


Figura 10: Foto da cuba de Langmuir utilizada nas isotermas π -A para a (a) metodologia aplicada nos experimentos e (b) metodologia descartada.

4.3. Módulo compressional

A análise do módulo compressional (C_S^{-1}) foi realizada a partir dos dados coletados das isotermas π -A dos lipídios, para todos os casos analisados. O processo para obtenção dos valores de C_S^{-1} é baseado na Equação 2, descrita na seção 3.2. Por fim, os gráficos foram obtidos plotando C_S^{-1} em função da pressão de superfície.

4.4. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

As medidas de BAM foram adquiridas com o auxílio da Dra. Debora Balogh, no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos em um microscópio Accurion Nanofilm_EP4, com uma cuba de Langmuir acoplada ao microscópio. Foram obtidas imagens em temperatura ambiente (23 °C) para os fosfolipídios na ausência e presença dos poluentes foram adquiridas. A concentração de ambos os fosfolipídios foi 0,5 mg/ml e todas a subfase com a concentração de 1×10^{-4} M. O procedimento experimental se dá de forma similar ao dos filmes de Langmuir, com apenas algumas mudanças.

Primeiramente a placa de vidro preta com dimensões de 30 mm x 40 mm x (2 até 0.5) mm é colocada sobre a cuba de forma que fique entre o laser e a objetiva, em seguida a cuba é preenchida com 120 mL da subfase de interesse. Antes da isoterma começar foi

realizada a linha de base da superfície para reduzir a interferência e melhorar a qualidade de imagem, a partir desse ponto a isoterma π -A seguem da mesma forma dos filmes de Langmuir. A captura das imagens é feita de forma manual, sendo assim foram capturadas em praticamente as pressões de superfície até o colapso, dando ênfase na pressão de 30 mN/m, devido a membrana celular teoricamente possuir este valor pressão.

4.5. PM-IRRAS

Os espectros de PM-IRRAS foram adquiridos com o auxílio da Dra. Debora Balogh, no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos no espectrofotômetro modelo PMI550 da KSV Instruments. O espectro foi coletado no intervalo de 800 a 4200 cm^{-1} , com cada espectro contendo 6000 varreduras a uma taxa de 10 varreduras/segundo, e com resolução espectral de 8 cm^{-1} . As medidas foram realizadas com o ângulo rasante de 80° em temperatura ambiente (23 °C), sendo os espectros obtidos na pressão superficial de 30 mN/m. Foram obtidos espectros para os fosfolipídios na ausência e presença dos poluentes. A concentração de ambos os fosfolipídios foi 0,5 mg/ml e todas a subfase com a concentração de 1×10^{-4} M. O procedimento experimental se dá de forma similar ao dos filmes de Langmuir, com apenas algumas mudanças.

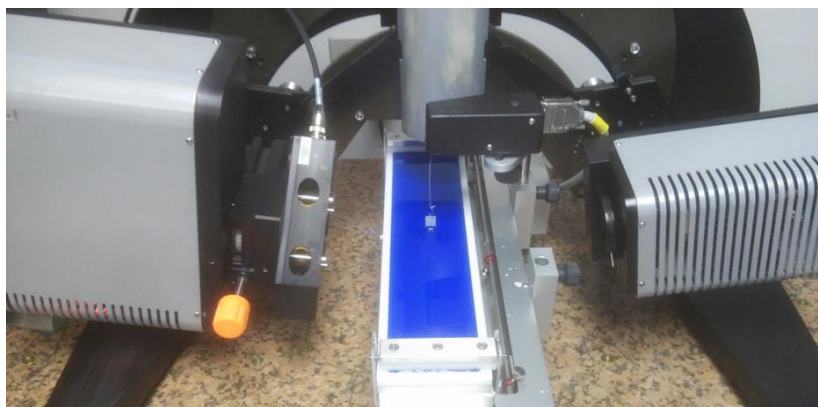


Figura 11: Fotos da cuba de Langmuir com o PM-IRRAS acoplado, com subfase de azul de metileno.

4.6. FTIR de filmes *cast*

As medidas dos filmes *cast* (filme formado sobre o substrato através do espalhamento da solução na superfície) dos compostos foram realizadas em um espectrômetro Bruker modelo Tensor 27 que opera de 600 a 4000 cm^{-1} e obtidas com 128 varreduras (*scans*) e resolução espectral de 4 cm^{-1} , todos os espectros coletados foram no modo transmissão, sendo os filmes depositados em um substrato de seleneto de zinco (ZnSe). Foram preparadas previamente soluções dos compostos, de forma que cada fosfolípido fosse misturado com os poluentes, seja a AMX, AM ou a MIX, sendo todas as concentrações a mesma 1×10^{-4} mol/L, dos quais os fosfolípidos foram diluídos em clorofórmio e os poluentes diluídos em metanol para facilitar a evaporação. Foram então espalhados 100 μL da solução sobre a superfície do substrato, esperada a secagem, e em seguida efetuada a medida. Este mesmo procedimento também foi realizado para os fosfolípidos e poluentes de forma separada, para se obter os espectros dos materiais puros.

4.7. Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)

As LUVs foram fabricadas pelo método de extrusão, que consiste em diversas etapas. Primeiramente realizou-se a diluição dos lipídios em 200 μL de clorofórmio, de forma que se obtenha uma concentração de 1×10^{-3} mol/L, com a sonda LAURDAN misturada em solução (porcentagem de 0,5 %). Em seguida todo o volume da solução foi espalhado em um tubo de ensaio, mantendo-se uma agitação e fluxo de N_2 constante até a evaporação do solvente, sendo o tubo com o filme do lipídio colocado sobre vácuo durante uma hora. Posteriormente, esse filme formado é hidratado com 1 mL de água MilliQ, e a suspensão agitada durante 2 minutos, formando-se assim as vesículas multilamelares (MLVs) de forma espontânea. Uma vez que a suspensão das MLVs foi formada realizou-se o processo de extrusão das vesículas, que consiste em uma filtragem da suspensão gerada para que se obtenha as LUVs com homogeneidade em relação aos seus tamanhos. A suspensão formada é então colocada em uma seringa como ilustrado no aparato da Figura 12, onde a extrusora (Avanti Mini Extruder adquirida da Avanti Polar Lipids (Figura 12 (b)) é inserida no aparato da Figura 12 (a), que automatiza o processo de passagem da suspensão pela extrusora. A automação da extrusão é constituída de braços automatizados que movem as seringas de forma simultânea através de motores de passo com velocidade controlada (Figura 12 (b)). A extrusão se dá pela passagem da suspensão por filtros de tamanho de poros definidos. Esta passagem é repetida diversas vezes (21 no caso deste trabalho), mantendo-se o controle da velocidade como a qual a suspensão é filtrada, o que permite uma padronização do tamanho das LUVs. Para o lipídio DPPC todo o processo foi realizado na temperatura de 50 °C devido a temperatura de transição da fase gel (L_β) para a fase líquido-cristalina (L_α) ocorrer em 41 °C.

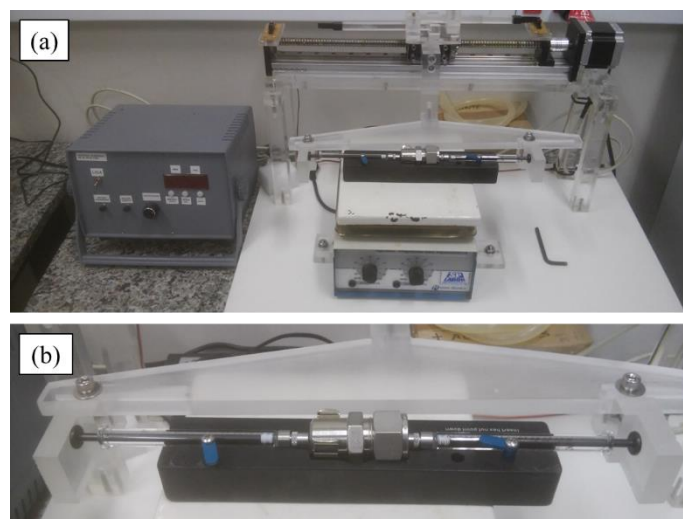


Figura 12: (a) Aparato completo para a realização da extrusão e (b) base e seringas por onde passam as LUVs.

4.8. Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Os espectros de emissão da sonda LAURDAN presente nas LUVs foram coletados em um Espectrofluorímetro de bancada PerkinElmer Modelo LS55, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a. Ana Maria Pires. O equipamento conta com lâmpada de Xenônio. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente (23 °C) em uma cubeta de quartzo, e, todas as amostras foram excitadas com o comprimento de onda de 320 nm (valor obtido previamente com o espectro de excitação), no intervalo de 400 a 650 nm. Primeiramente foram obtidos os espectros de emissão da LAURDAN inserido nas LUVs sem a presença dos poluentes, e, em seguida, os espectros na presença dos poluentes AMX, AM e MIX. Uma vez que os espectros foram obtidos, foram coletados os valores de intensidade para os comprimentos de onda de 440 e 490 nm, com o intuito de calcular o valor de polarização generalizada (GP), de acordo com a Equação 7, descrita na seção 3.7.

4.9. Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

As GUVs foram fabricadas pelo método de eletroformação, utilizando substratos de ITO (óxido de zinco dopado com estanho, do inglês *indium tin oxide*) como base condutora. A superfície dos substratos foi cuidadosamente limpa com água MilliQ, álcool isopropílico e clorofórmio, da mesma forma o espaçador de teflon (Figura 13 (a)). Em seguida foi espalhada sobre cada superfície condutora dos ITOs 10 μL do fosfolipídio, com concentração de 1 mM, deixando evaporar o solvente, em vácuo, por 1 hora. Após a evaporação do solvente a célula foi montada como está representado na Figura 13 (b). Em seguida, o volume da célula foi preenchido com uma solução de sacarose de concentração de 0,2 mol/L. Utilizando uma fonte de tensão AC (corrente alternada) modelo Minipa MFG-4202 Function Signal Generator, foi aplicada sobre a célula hidratada uma tensão de 1 V com uma frequência de 10 Hz, pelo período de 1 hora. Por fim, as GUVs eletroformadas foram removidas com cuidado da célula e colocadas em um tubo plástico tipo *ependorf*.

Para as GUVs de DPPC a eletroformação foi realizada na temperatura de 50 °C devido a temperatura de transição da fase gel (L_{β}) para a fase líquido-cristalina (L_{α}) do DPPC ocorrer em 41 °C. O DOPC foi realizado em temperatura ambiente, pois nesta temperatura a molécula já se encontra na fase líquido-cristalina, devido a temperatura de transição para o DOPC ser de -20 °C.

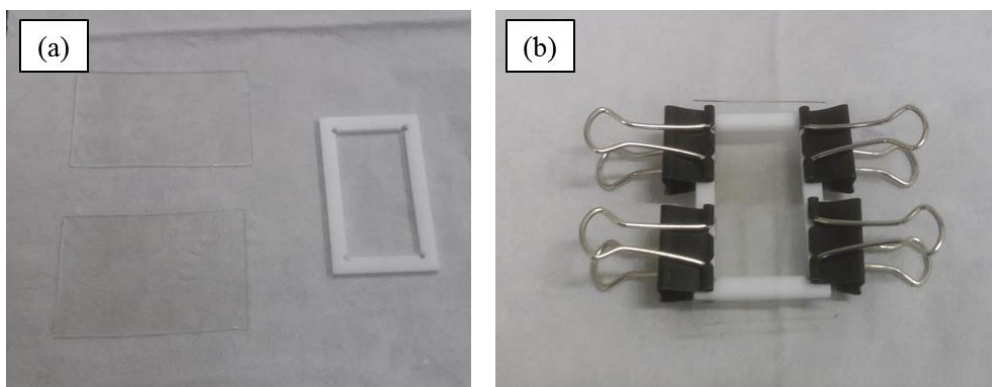


Figura 13: Fotos dos (a) substratos de ITO e o espaçador de teflon e (b) célula de eletroformação pronta para hidratação.

4.10. Microscopia de Contraste de Fase

As medidas de microscopia de contraste de fase foram realizadas em um microscópio de fluorescência confocal da marca Nikon, modelo C2/C2si, que além das medidas de fluorescência confocal permite a obtenção de imagens por contraste de fase. A caracterização foi realizada em temperatura ambiente (23 °C), com a lente de 40x, com abertura numérica de 0,6 para os vídeos e para as imagens coletadas. As alíquotas das amostras foram colocadas sobre uma lamínula do tipo *Ibidi μ -Slide 8 Well Glass Bottom*, adicionando-se 200 μ L de uma solução de glicose com concentração de 0,2 mol/L. Foram realizadas medidas em três diferentes concentrações do poluente, 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, sendo que em cada medida foi adicionado um volume de 1,0, 2,5 e 10,0 μ L, respectivamente, sendo todos de uma mesma solução estoque do poluente de 1×10^{-2} mol/L. Em seguida, a amostra foi agitada para garantir a homogeneidade do poluente na solução. Após a agitação, foram adicionados 50 μ L da amostra das GUVs na lamínula. A partir deste ponto as GUVs foram encontradas o mais rápido possível, para evitar que as vesículas interagissem com o poluente antes de estarem em foco (tempo este menor que um minuto), sendo assim iniciada a gravação do vídeo durante um intervalo de tempo de 30 min.

Para a análise estatística das GUVs afetadas pela presença dos poluentes, além dos vídeos, uma série de imagens foram capturadas após o término da gravação, de forma que se obteve imagens que continham o máximo de GUVs possíveis. As GUVs foram contadas e separadas por tamanho, de modo a obter as porcentagens de vesículas afetadas.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.1. Filmes de Langmuir

Inicialmente foram realizados estudos da atividade superficial dos poluentes em subfase aquosa, comprimindo as barreiras da cuba na ausência dos lipídios na interface ar-água. Entretanto, nenhum dos poluentes apresentaram resposta, visto que o valor da pressão superficial não se alterou durante toda a compressão das barreiras.

Na Figura 14 (a) são apresentados os resultados das isothermas π -A para o fosfolipídio DPPC na ausência e presença dos três poluentes inicialmente na subfase, todas realizadas em temperatura ambiente (23 °C) e com a mesma concentração (1×10^{-4} mol/L). Na Figura 14 (b) é mostrado o gráfico dos valores de diferença de área (ΔA) em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases. A diferença de área é obtida pela subtração dos valores de área da isoterma na presença do poluente pela área da isoterma do fosfolipídio puro em subfase aquosa.

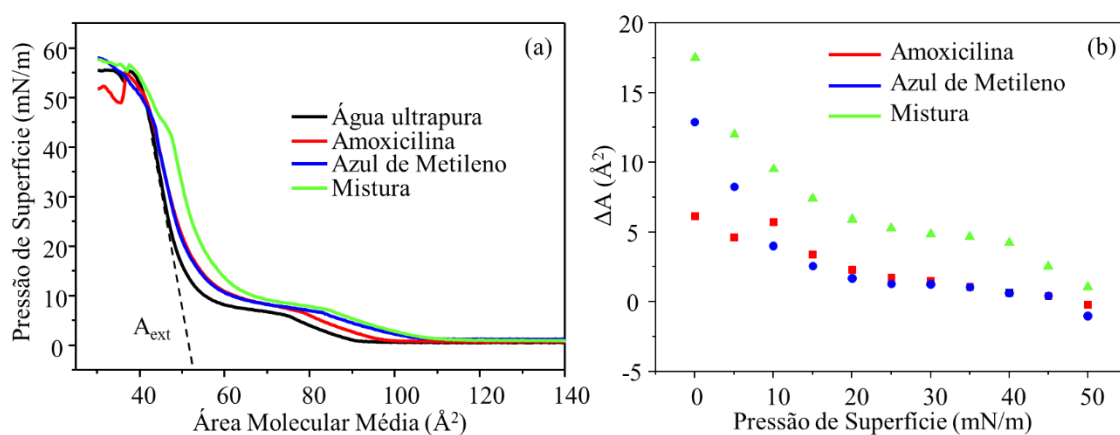


Figura 14: (a) Isothermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-4} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (b) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

O resultado para as isothermas π -A em subfase aquosa para o DPPC é similar aos resultados encontrados na literatura [78], com valor de área extrapolada de 53 \AA^2 , possuindo na pressão de 30 mN/m um valor de área de aproximadamente 45 \AA^2 . Além

disso, pode-se observar a presença das fases gasosa, líquido-expandida e líquido-condensada de forma bem definida. Para o DPPC, ambos os poluentes AMX e AM, quando presentes na subfase, provocaram um pequeno deslocamento para maiores áreas nas fases gasosa e líquida, ou seja, quando as moléculas dos fosfolipídios ainda não estão totalmente empacotadas. Quando os fosfolipídios atingem a fase condensada da monocamada, as isotermas π -A são coincidentes com as isotermas obtidas sem a presença do poluente na subfase. Esse efeito fica claro para os valores de diferença de área, conforme a pressão superficial aumenta, a diferença nos valores de área diminui, alcançando valores próximos a zero a partir da pressão de 30 mN/m nas condições em que os poluentes não são misturados (Figura 14 b). Estes resultados indicam que para estes dois sistemas em particular, existe uma interação entre os poluentes e o fosfolipídio que tende a manter os poluentes na interface, porém, os poluentes são expulsos da interface ar-água quando a monocamada é comprimida. No trabalho de Stunges *et al.* [79], foram obtidas isotermas π -A de DPPC em subfase aquosa do fármaco 17 α -etinilestradiol (negativamente carregado em solução). Naquele trabalho, resultados similares foram obtidos, sendo que deslocamentos para maiores áreas durante as fases gasosa e líquida foram observados com posterior expulsão da interface ar-água na fase condensada, indicando que em ambos os trabalhos a atração eletroestática foi superada pelo empacotamento das moléculas.

Essa expulsão da interface ocorre provavelmente devido às fracas interações eletrostáticas destes compostos com a cabeça zwitteriônica do fosfolipídio, uma vez que a AMX tem uma carga líquida neutra, mas parte de sua estrutura tem cargas positivas e negativas e o AM tem carga positiva (catiônica). Desta maneira, conforme a fase condensada é atingida a pressão de superfície do DPPC expulsa os poluentes fracamente ligados à monocamada da interface ar-água. Um resultado semelhante a este foi obtido

por Lopes *et al.* [80], no qual foram realizadas isotermas π -A do DPPC em subfase de AMX com pH 7,4, e o mesmo efeito da expulsão do poluente foi observado. Provavelmente as moléculas da AMX e AM estejam posicionadas próximas à monocamada de DPPC, abaixo das cabeças zwitteriônicas, conforme a Figura 15 (a) e (b). Este tipo de ilustração tem como objetivo mostrar a possível estruturação da monocamada em diferentes fases de empacotamento, sem levar em consideração qualquer interação química específica que possa ocorrer.

Para a mistura dos poluentes na subfase, nota-se um deslocamento significativo da isoterma π -A de DPPC, como pode ser visto na Figura 14 (b). Os valores de diferença de área, calculados para as pressões superficiais que compreendem todas as fases do sistema são maiores se comparados aos poluentes empregados de forma individual. Nesse caso, utilizando a MIX, os poluentes conseguem permanecer na interface juntamente com a monocamada de DPPC, indicando uma interação mais forte em relação aos poluentes individuais. Somente por volta de 46 mN/m, ou seja, próximo ao colapso da monocamada, existe uma mudança na inclinação da isoterma, que é reprodutível e que pode indicar: i) que os poluentes são expulsos parcialmente da monocamada ou ii) que acontece uma reorganização/realinhamento da monocamada na presença da mistura de poluentes emergentes. De qualquer forma, os poluentes ainda estão presentes na interface ar-água mesmo na fase condensada de DPPC. No trabalho de El-Shahat *et al.* [81] é relatada uma grande afinidade do azul de metileno inserido em uma espuma de poliuretano (do inglês *methylene blue grafted polyurethane foam*) com diferentes penicilinas, inclusive com a amoxicilina, formando um possível aduto, isto é, o produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto contendo os componentes iniciais. O resultado é considerado uma espécie molecular distinta, o qual não foi detalhado no artigo. A interação entre a AMX e o AM será detalhada neste trabalho, na

seção dedicada às análises de dados obtidos por FTIR. Contudo, uma possível estruturação da monocamada na presença da mistura dos poluentes (MIX) é ilustrada na Figura 15 (c). Na literatura, o efeito de deslocamento para maiores áreas das isotermas π -A é bastante reportado, visto que vários tipos de compostos apresentam este mesmo tipo de comportamento [82, 83].

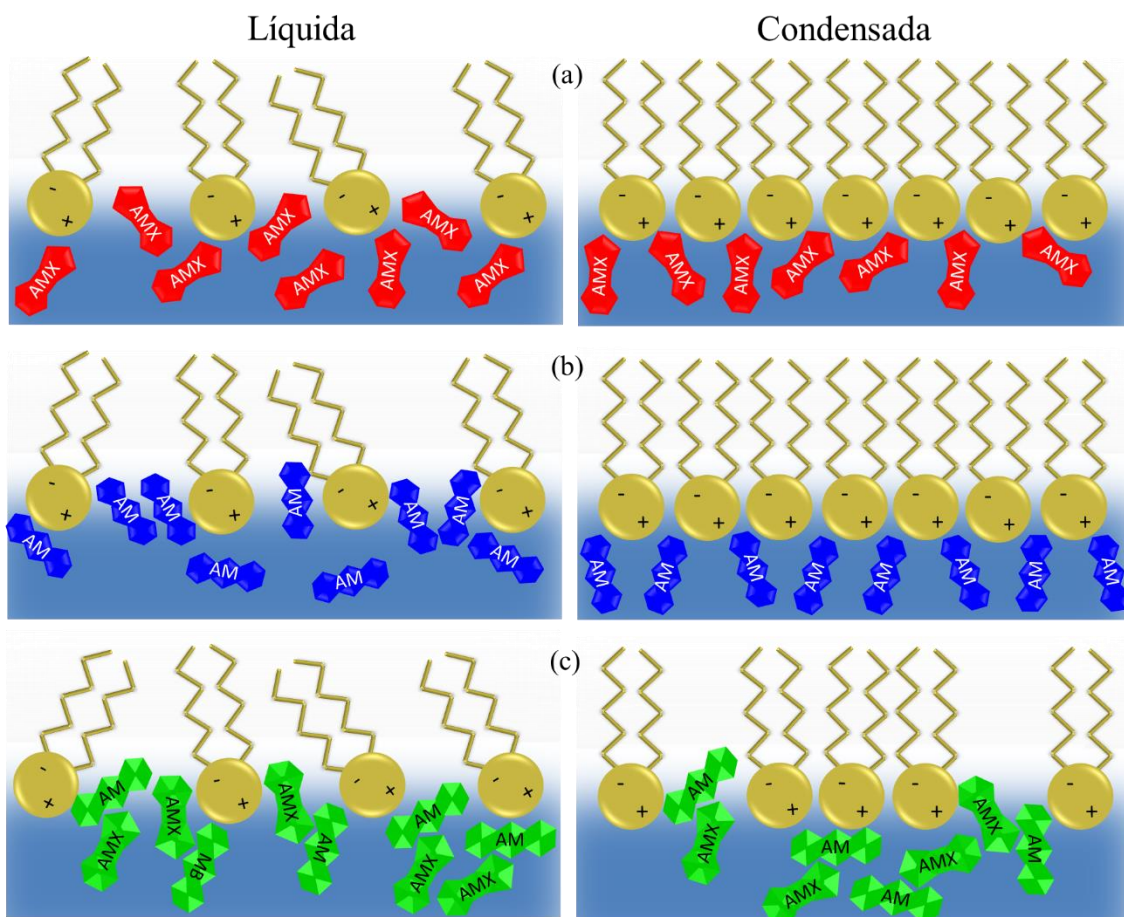


Figura 15: (a) Esquema representativo da estruturação das monocamadas de DPPC nas fases líquida e condensada para as subfases de (a) AMX, (b) AM e (c) MIX.

Complementarmente aos estudos das isotermas π -A, na Figura 16 são apresentados os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio DPPC nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX. Como descrito na seção 4.3, esta análise é realizada com base em cálculos utilizando os dados isotermas da Figura 14.

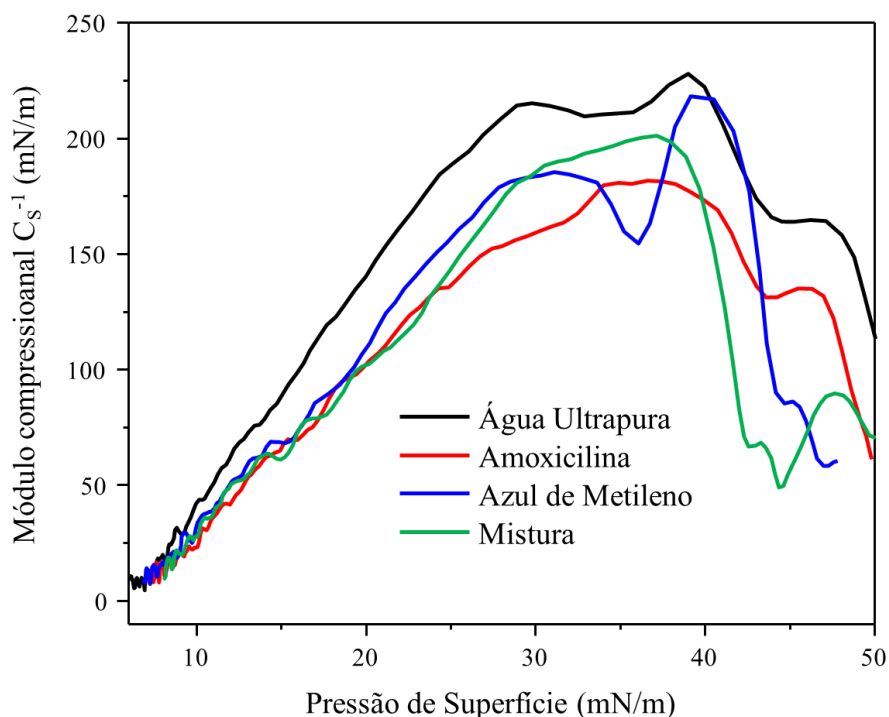


Figura 16: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DPPC para as subfases aquosa, AMX, AM e MIX.

O DPPC em subfase aquosa apresentou um resultado coerente com o que é reportado na literatura [84]. Os valores obtidos estão dentro da faixa da fase líquido-condensada referente ao intervalo de C_s^{-1} entre 100 e 250 mN/m [49]. De forma geral, a presença dos poluentes na subfase do filme de DPPC não causou mudanças importantes na elasticidade da monocamada, assim como os efeitos observados nas isotermas π -A. Entretanto, nota-se uma pequena diminuição nos valores de C_s^{-1} na pressão superficial de 30 mN/m, o que sugere um pequeno aumento na fluidez da monocamada. No trabalho de Lopes *et al.* [80] o módulo compressional do filme de Langmuir de DPPC na presença da AMX apresentou um resultado semelhante, onde foi observado uma diminuição no valor de C_s^{-1} com a inserção da AMX de aproximadamente 240 mN/m para 170 mN/m. Enquanto para este trabalho a variação de C_s^{-1} foi de aproximadamente 220 mN/m para 175 mN/m, após a inserção da AMX na subfase.

Na Figura 17 (a) são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolípido DOPC na ausência e presença dos três poluentes, todas realizadas em temperatura ambiente (23 °C) e com a mesma concentração dos poluentes (1×10^{-4} M). A Figura 17 (b) mostra o gráfico dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases. /

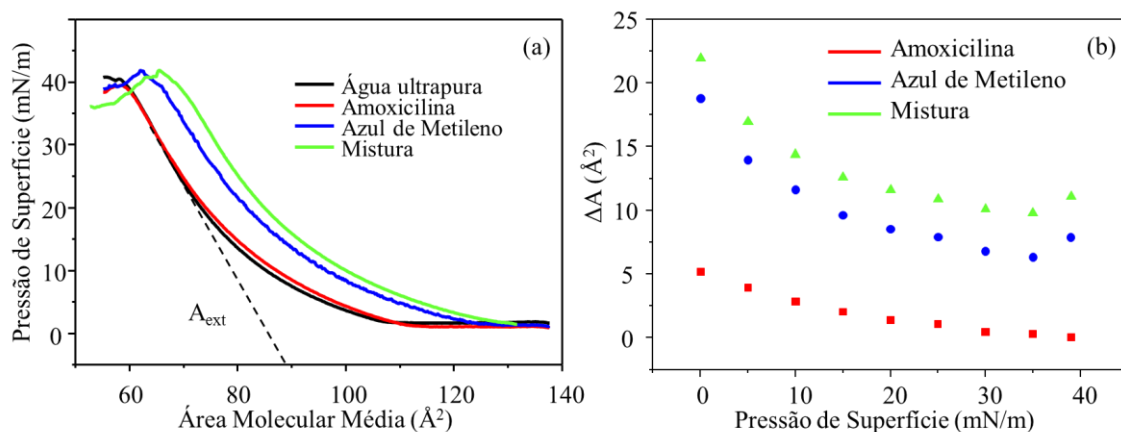


Figura 17: (a) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-4} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (b) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

O resultado obtido para as isotermas π -A em subfase aquosa para o DOPC é similar aos resultados encontrados na literatura [85] com valor de área extrapolada de 89 \AA^2 , possuindo na pressão de 30 mN/m um valor de área de 65 \AA^2 . O perfil da isoterma não apresenta as transições de fase entre a fase líquido-expandida e líquido-condensada de forma clara como o DPPC devido às insaturações presentes nas caudas hidrofóbicas, o que também está de acordo com a literatura [86].

Na presença de AMX nota-se que não houve um deslocamento para maiores áreas, uma vez que a isoterma é praticamente coincidente com a do DOPC em subfase aquosa. O fato de a isoterma não ter se deslocado em nenhuma das fases pode estar relacionado com as insaturações nas caudas do lipídio DOPC, que tendem a se manter na monocamada de uma forma mais desorganizada se comparada ao DPPC, que apresenta as caudas

saturadas [47]. Essa diferença na estruturação da monocamada pode ser evidenciada pelos valores de área extrapolada obtida para ambos os fosfolipídios em subfase de água ultrapura, cujos valores obtidos foram 53 \AA^2 para o DPPC e 89 \AA^2 para o DOPC. Assim, a estruturação do DOPC poderia proporcionar mais espaço livre, que pode ser ocupado pelos poluentes sem causar mudanças aparentes ou significativa nas isotermas. Esse efeito de ocupação da monocamada sem a variação da área é reportado no trabalho de Stunges *et al.* [79], onde o autor comenta que as moléculas do hormônio 17α -ethynylestradiol se posicionam na monocamada de DPPC e DPPG sem afetar o deslocamento, devido ao espaço da região da cabeça ser suficientemente grande para o hormônio ocupar. Esse comportamento pode ser justificado principalmente no caso da AMX, que apesar de ser neutra, tem parte da molécula com carga negativa, e parte com carga positiva. Logo, a AMX tenderia principalmente a se posicionar próximo do grupo colina ou ao grupo fosfato devido a possíveis interações eletrostáticas. Todas estas indicações serão discutidas como mais detalhes na análise dos espectros de PM-IRRAS. Conseqüentemente a estruturação da monocamada seria ilustrada como na Figura 18 (a), onde a AMX poderia se posicionar abaixo da monocamada.

Nas isotermas π -A para o AM pode-se notar um deslocamento significativo para maiores áreas durante quase toda a compressão. Este resultado difere do encontrado para o fosfolipídio DPPC, que não apresentou deslocamento na fase condensada. Sabe-se que o AM possui carga positiva, sendo assim, a molécula tenderia a se aproximar do grupo fosfato do fosfolipídio, que possui caráter negativo, permanecendo na interface ar-água mesmo em altas pressões superficiais (Figura 18 (b)). Diferentemente do DPPC, a presença das insaturações na cadeia hidrofóbica do DOPC possibilita uma maior área molecular por lipídio mesmo no estado de maior organização da monocamada, facilitando a permanência do AM na interface.

No trabalho de Schimdt *et al.* [87] é relatado o estudo de filmes de Langmuir de DOPC através de isothermas π -A em subfase de AM. Porém, os resultados apresentam deslocamento para menores áreas após a inserção do AM. Contudo, tal resultado é discutido pelo autor com cautela, pois a diminuição da área ocupado pelo DOPC seria improvável. Por outro lado, na dissertação de mestrado de Aoki (2011) [88], resultados semelhantes aos discutidos neste trabalho foram encontrados para o estudo de isothermas π -A de DOPC em subfase de AM, reforçando a ideia de que este composto está presente na interface monocamada/subfase mesmo no estado mais organizado da monocamada.

A MIX apresentou deslocamentos ainda maiores do que os resultados obtidos para o AM. Esse resultado foi semelhante ao obtido para o DPPC, o que mostra que para ambos fosfolipídios a mistura tem uma influência maior na monocamada do que os poluentes individuais. Estes resultados indicam que o aduto formado pela AMX e AM tem grande afinidade pela monocamada dos fosfolipídios, ainda maior do que para os mesmos empregados de forma individual.

A estruturação da monocamada para as subfases de AM e MIX podem ser ilustradas conforme mostram as Figura 18 (b) e (c), onde a presença dos poluentes deslocam as isothermas para maiores áreas.

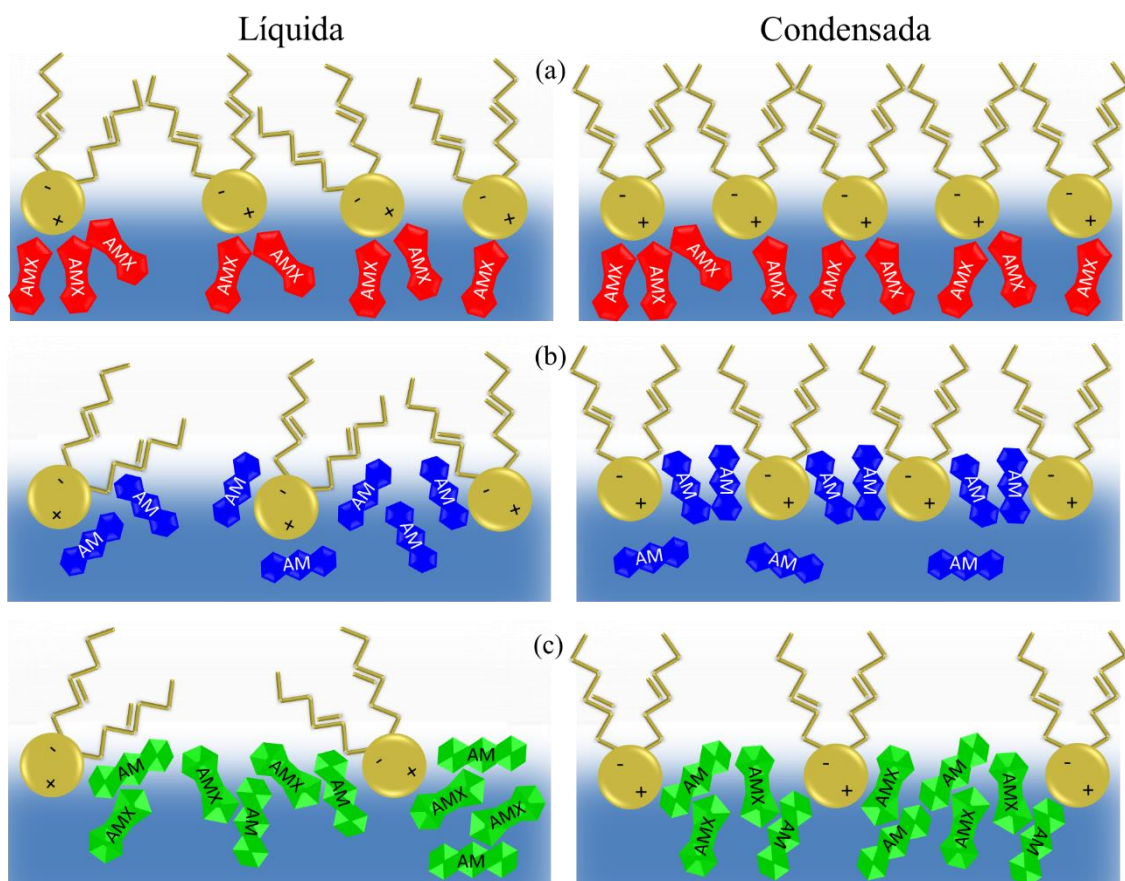


Figura 18: (a) Esquema representativo da estruturação das monocamadas de DOPC nas fases líquida e condensada para as subfases de (a) AMX, (b) AM e (c) MIX.

Na Figura 19 são apresentados os gráficos de fator de compressibilidade por pressão de superfície para o lipídio DOPC nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX, sendo esta análise realizada utilizando os dados das isotermas da Figura 17.

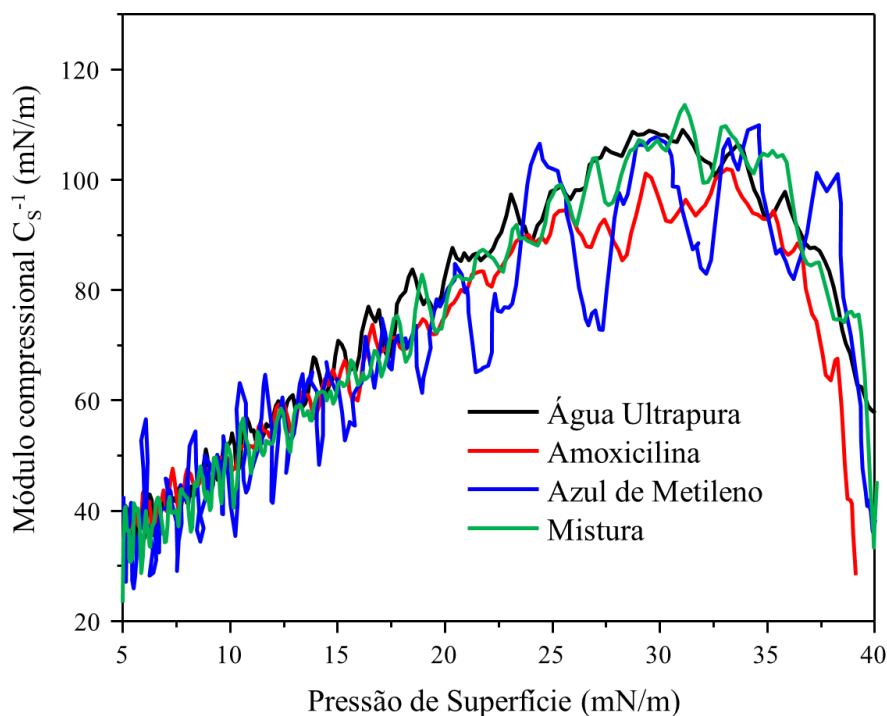


Figura 19: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC para as subfases aquosa, AMX, AM e MIX.

Para o DOPC, um resultado semelhante ao de módulo compressional reportado na literatura foi observado [89], com valores de C_s^{-1} de 100 mN/m. Esses valores são menores se comparados ao DPPC devido ao DOPC ser mais fluido e não apresentar as transições entre as fases líquido-expandida e líquido-condensado de forma clara. Os módulos compressoriais para o DOPC nas diferentes subfases não apresentaram, em geral, mudanças significativas na intensidade de C_s^{-1} , o que indica que não está ocorrendo uma mudança na fluidez da monocamada, apesar dos deslocamentos causados pelos poluentes nas isotermas.

5.2. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

Nas Figura 20 e 21 são apresentadas imagens obtidas por microscopia BAM em temperatura ambiente (23 °C), para monocamadas de DPPC próximo às pressões de 10,

20 e 30 mN/m nas subfases de água ultrapura e em soluções 1×10^{-4} mol/L dos poluentes AMX, AM e MIX.

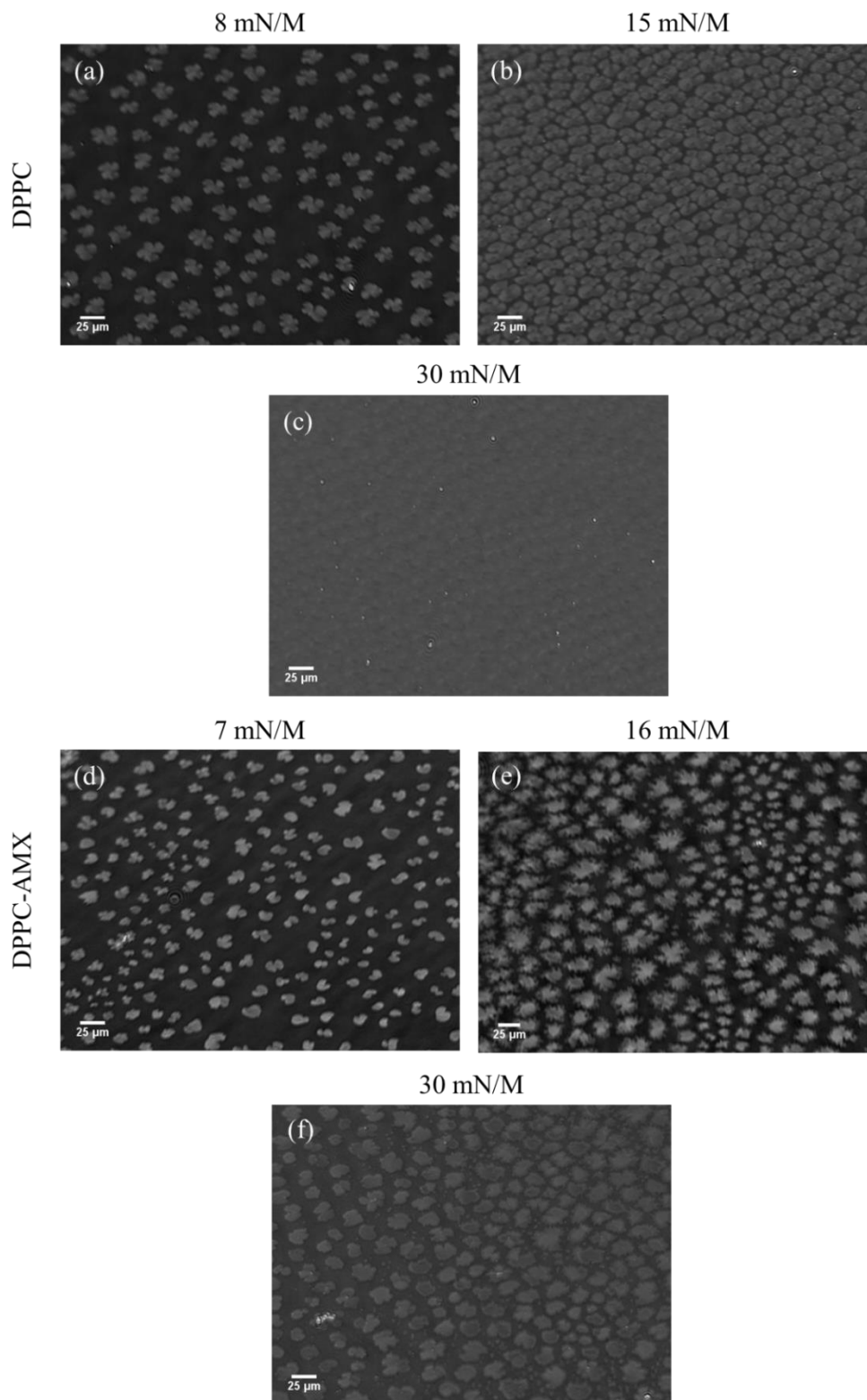


Figura 20: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases aquosa (a)(b)(c), AMX (d)(e)(f).

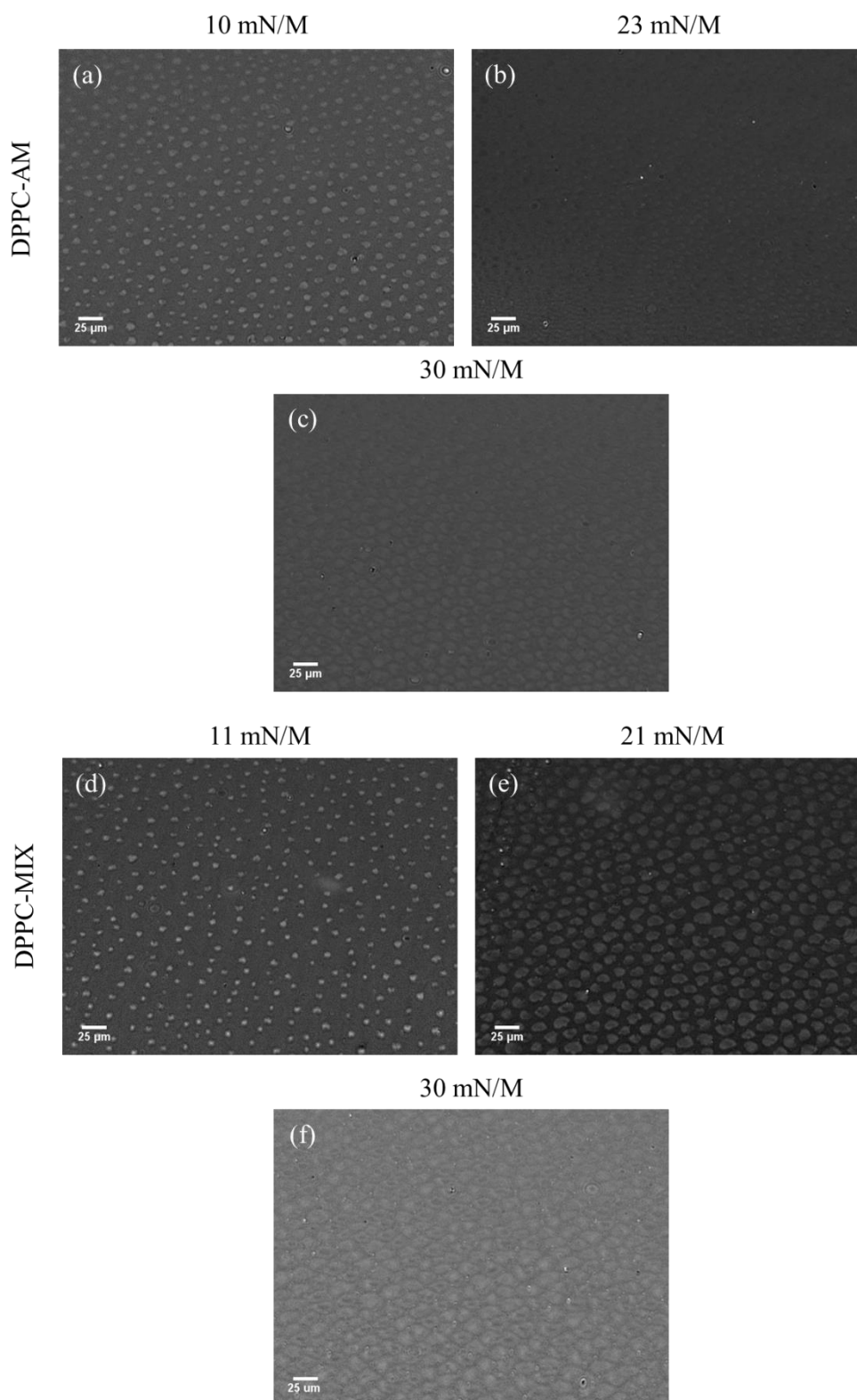


Figura 21: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases de AM (a)(b)(c), MIX (d)(e)(f).

Os resultados de BAM para o DPPC em subfase aquosa são similares aos resultados encontrados na literatura [90], apresentando a formação de domínios referentes

à fase líquido-expandida (Figura 20 (a)), atingindo a fase líquido-condensada por volta de 15 mN/m, e em seguida a homogeneidade lipídica na pressão de 30 mN/m, correspondente à fase condensada da monocamada.

Para o filme exposto à AMX nota-se que ocorreu uma pequena mudança no formato dos agregados, assim como uma ligeira variação no tamanho, como pode ser visto nas Figuras 20 (d) e (e). Além disso, na pressão de 30 mN/m não se observou uma homogeneidade como a do DPPC em subfase aquosa na ausência de qualquer poluente. Isso indica que a AMX causou um pequeno distúrbio na monocamada. Esse resultado é consistente com os obtidos para as isotermas π -A, visto que foram observadas pequenas mudanças na morfologia, assim como nos deslocamentos. No trabalho de Lopes *et al.* [80], foram obtidas imagens de microscopia BAM para o DPPC em subfase de AMX (com concentração de 64 μ M) semelhantes ao deste trabalho, apresentando agregados lipídicos com formatos similares. Contudo, as medidas foram realizadas em solução tampão, com valores de pH 1,2, 5 e 7,4, indicando que a morfologia foi afetada de forma diferente para cada pH.

O AM e a MIX afetaram a morfologia da monocamada de DPPC de forma mais acentuada, como pode ser visto nas Figuras 21 (a) e (d). A fase líquido-expandida foi totalmente perturbada, com mudanças consideráveis no tamanho e forma, diminuindo significativamente se comparado ao DPPC em subfase aquosa. Ainda, foram observadas alterações na morfologia das monocamadas até nas pressões mais altas, não obtendo uma homogeneidade na pressão de 30 mN/m, o que mostra que a presença dos poluentes, por mais que estes não afetem o deslocamento da área molecular lipídica na monocamada, como observado nas isotermas π -A, afetam a morfologia e a formação de domínios lipídicos.

Nas Figuras 22 e 23 são apresentadas imagens obtidas por microscopia BAM em temperatura ambiente (23 °C), para as monocamadas de DOPC próximo às pressões de 10, 20 e 30 mN/m nas subfases de água ultrapura e em soluções 1×10^{-4} M dos poluentes AMX, AM e MIX.

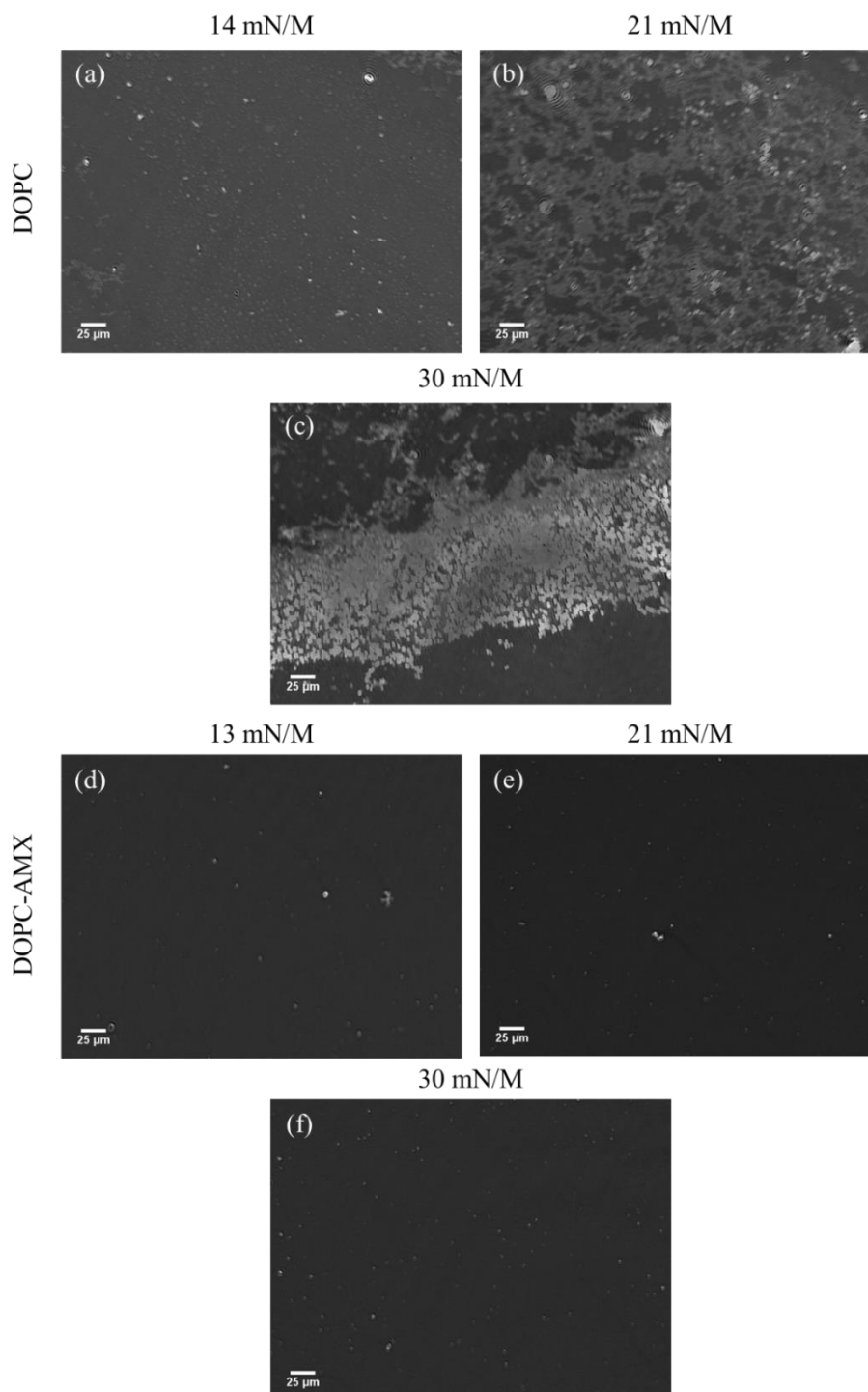


Figura 22: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases aquosa (a)(b)(c) e AMX (d)(e)(f).

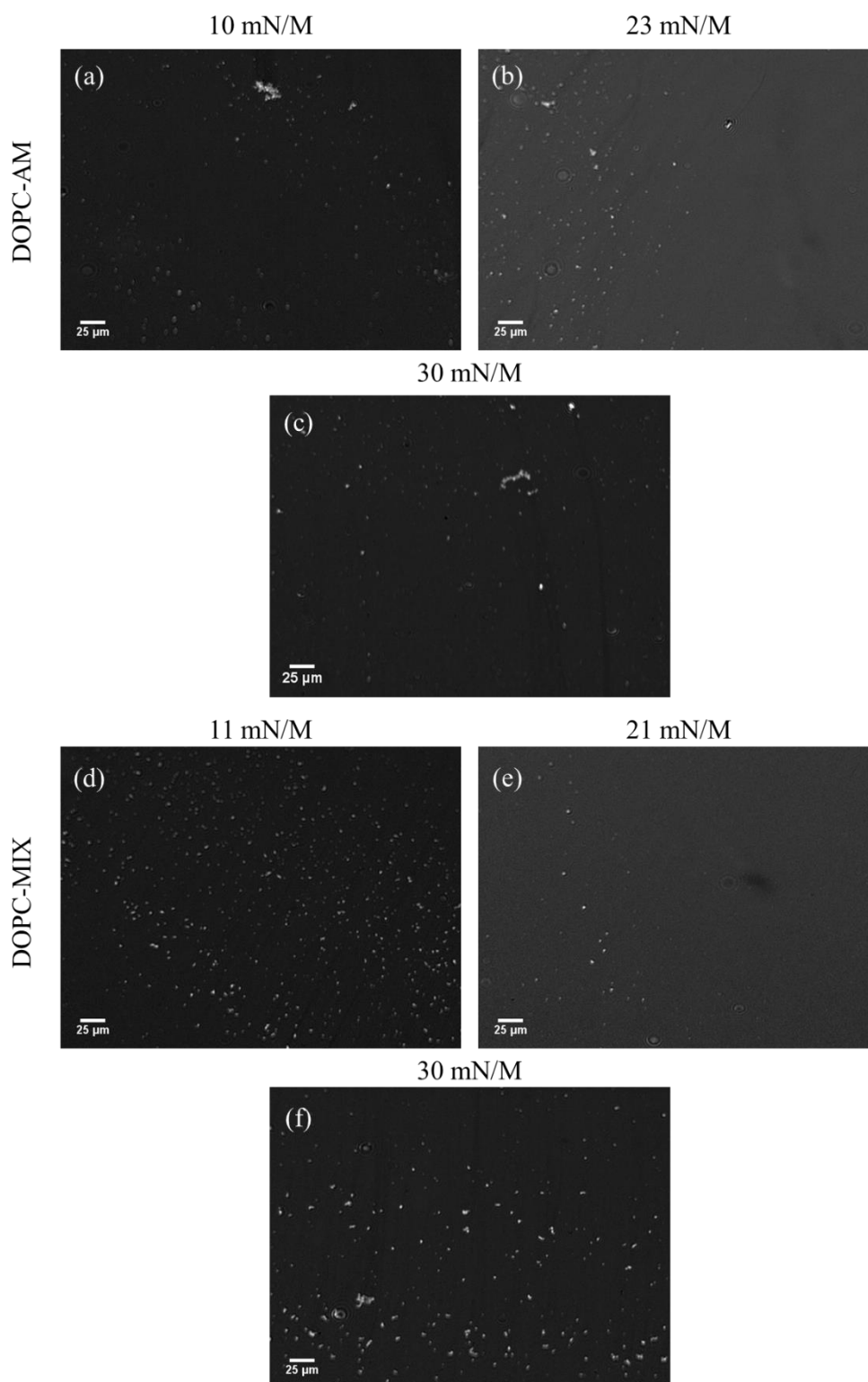


Figura 23: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases AM (a)(b)(c) e MIX (d)(e)(f).

Os resultados de BAM para o DOPC em subfase aquosa são similares aos resultados encontrados na literatura [91], apresentando a formação de pequenos domínios

lipídicos em pressões mais baixas (Figura 22 (a)), e maiores conforme a pressão superficial aumenta (Figura 22 (b) e (c)).

As imagens obtidas para as subfases contendo os poluentes emergentes AMX e AM, assim como a mistura (MIX) apresentaram resultados semelhantes entre si. Em geral, não se observou a formação de domínios lipídicos como no DOPC em subfase aquosa, mesmo nas pressões mais altas, acima de 30 mN/m. Isso indica que todas as subfases utilizadas, AMX, AM e MIX, afetaram a morfologia da monocamada. Esse efeito de não formação de domínios lipídicos por parte do DOPC, após a inserção de algum composto na subfase é comumente reportado na literatura, sendo normalmente atribuído a modificação da organização do lipídio na monocamada [85, 92]. Para o AM e a MIX este resultado é plausível, visto que foram observados deslocamentos para maiores áreas. Porém, para a AMX este resultado é até certo ponto conflitante com as isotermas π -A, pois não ocorreram deslocamentos durante toda a isoterma, contudo a morfologia se alterou significativamente. Tal resultado mostra que a mudança na morfologia causada pela presença do poluente não afetou os valores de área na compressão da monocamada.

5.3. PM-IRRAS

Na Figura 24 são apresentados os resultados de PM-IRRAS para a monocamada de DPPC a 30 mN/m, em temperatura ambiente (23 °C) nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} . Este intervalo espectral é referente às vibrações dos grupos presentes na cabeça polar do fosfolipídio.

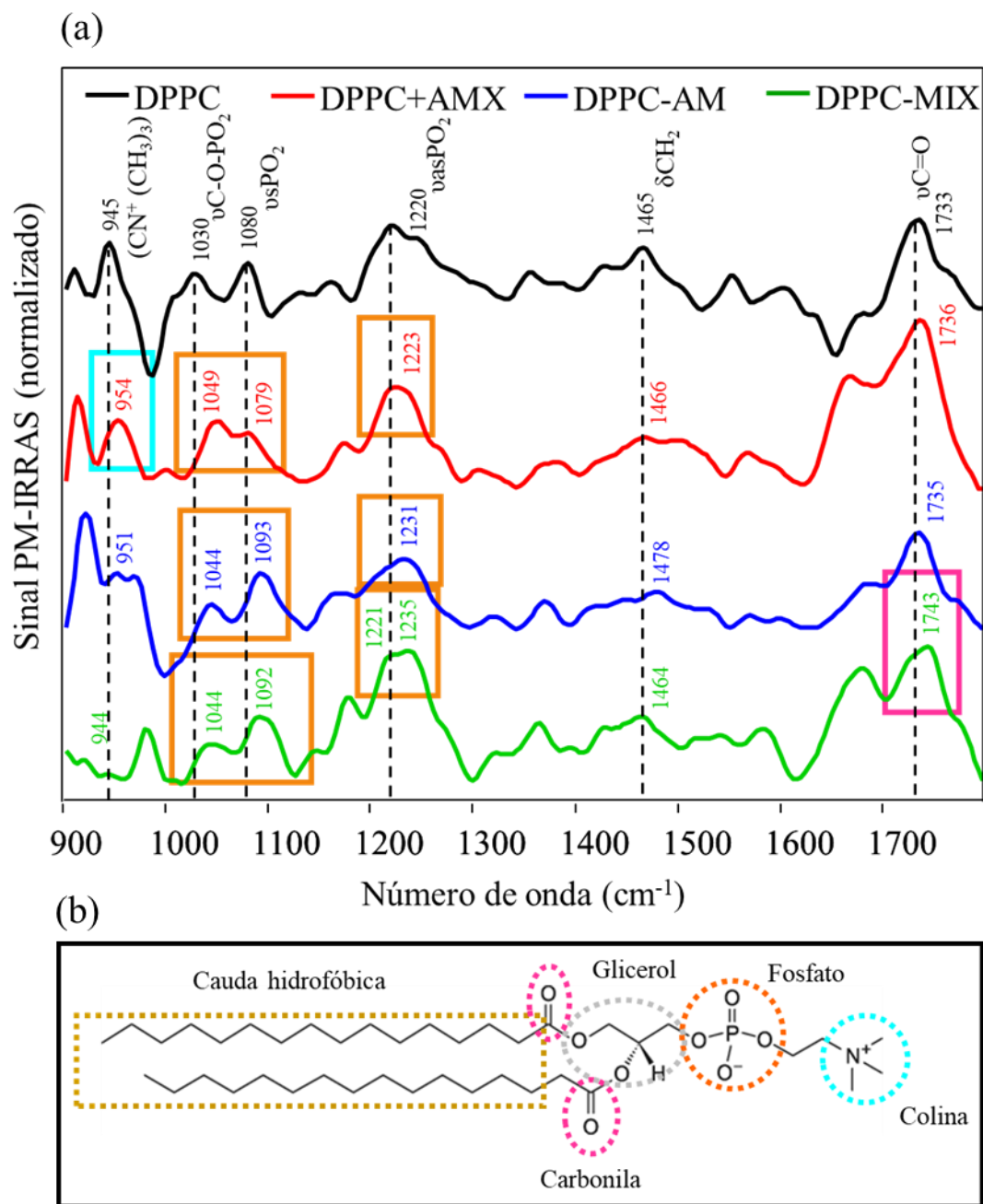


Figura 24: (a) Espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosas e dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, na região da cabeça do fosfolípido. Obtidos em temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) ilustração representativa dos principais grupos químicos das fosfatidilcolinas. As marcações indicadas nas bandas correspondem aos grupos de mesma cor na estrutura química do lipídio.

O espectro de PM-IRRAS para a subfase de água ultrapura (Figura 24) apresenta as bandas características do DPPC tradicionalmente reportadas na literatura [93, 94]. Nota-se a presença do estiramento (ν) do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$, 1733cm^{-1}), a deformação

angular (δ) do grupo CH_2 (1465 cm^{-1}), além das bandas simétrica (ν_s) e antissimétrica (ν_{as}) do grupo fosfato (P=O , $\nu_s = 1080 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1220 \text{ cm}^{-1}$), assim com a bandas $\nu\text{C-O-PO}_2$ (1030 cm^{-1}) e grupo colina ($\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$, 945 cm^{-1}) (Tabela 1).

Para a subfase de AMX, as bandas dos grupos $\nu\text{C=O}$, δCH_2 , $\nu_s\text{P=O}$ e $\nu_{as}\text{P=O}$ não sofreram deslocamentos consideráveis, o que indica que tais grupos são menos afetados pela presença da AMX do que os demais. Entretanto a $\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ apresenta deslocamento de 945 para 954 cm^{-1} na presença da AMX, provavelmente devido a interação eletrostática da AMX (ácido carboxílico negativamente carregada) e o N^+ do grupo colina. Além disso, observa-se que a banda do grupo $\nu\text{C-O-PO}_2$ se deslocou de 1030 para 1049 cm^{-1} na presença da AMX o que pode sugerir duas possibilidades: i) uma interação através de ligações de hidrogênio entre este grupo e o hidrogênio do grupo OH da AMX e o grupo fosfato do lipídio [95], ou ii) uma interação eletrostática entre a amina (positivamente carregada) e o grupo fosfato (negativamente carregado).

Os espectros de PM-IRRAS para o DPPC na subfase de AM revelaram deslocamentos nas bandas dos grupos $\nu\text{C-O-PO}_2$, $\nu_s\text{P=O}$ e $\nu_{as}\text{P=O}$, deslocando de 1030 , 1080 e 1220 cm^{-1} para 1044 , 1093 e 1231 cm^{-1} , respectivamente. Esses deslocamentos provavelmente estão relacionados a uma interação eletrostática do AM (enxofre do grupo tiazídico, positivamente carregado) e O^- do grupo fosfato. As bandas dos grupos $\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ e $\nu\text{C=O}$ não apresentaram deslocamentos significativos se comparados com os anteriores, na presença de amoxicilina. A mudança da banda δCH_2 (1478 cm^{-1}) será comentada com mais detalhes quando os dados referentes a cauda do fosfolipídio forem analisados.

A mistura dos poluentes (MIX) causou mudanças em quase todos as bandas de vibração do DPPC, com exceção da banda δCH_2 . Notam-se deslocamentos nas bandas $\nu\text{C-O-PO}_2$, $\nu_s\text{P=O}$, $\nu_{as}\text{P=O}$ e $\nu\text{C=O}$, mudando de 1030 , 1080 , 1220 e 1733 cm^{-1} para 1044 ,

1092, 1235 e 1743 cm^{-1} , respectivamente. A banda $\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ não deslocou, porém, sua intensidade relativa diminuiu consideravelmente. Todas essas mudanças indicam que a ação dos poluentes em conjunto permite uma maior possibilidade de interações, sendo que para o grupo $\nu\text{C}=\text{O}$, provavelmente está ocorrendo algum tipo de interação de hidrogênio entre o aduto formado pela MIX e o oxigênio do grupo carbonila. Já para o grupo fosfato, podem estar ocorrendo interações eletrostáticas (através de cargas remanescentes do AM ou da AMX) ou de hidrogênio entre os compostos. Tais mudanças corroboram os resultados dos filmes de Langmuir, onde a MIX acarretou um deslocamento maior em relação aos poluentes empregados de forma individual (Figura 14 (a)). Maiores possibilidades de interação favorecem a permanência dos poluentes na interface ar-água.

Tabela 1: Atribuições das bandas nos espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases de AMX, AM e MIX

DPPC	DPPC+Amx	DPPC+AM	DPPC+Mix	Atribuição
945	954	951	944	Estiramento antissimétrico ($\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3$)
1030	1049	1044	1044	Estiramento (C-O-PO_2^-)
1080	1079	1093	1092	Estiramento simétrico P=O
1220	1223	1231	1235	Estiramento antissimétrico P=O
1465	1466	1478	1464	Deformação angular CH_2
1733	1736	1735	1743	Estiramento C=O
2852	2849	2852	2852	Estiramento simétrico CH_2
2917	2919	2916	2919	Estiramento antissimétrico CH_2
2982	2970	2988	2975	Estiramento antissimétrico CH_3

Na Figura 25 (a) são apresentados os espectros de PM-IRRAS obtidos para o DPPC, no intervalo de 2800 a 3000 cm^{-1} , referente aos modos de vibração dos grupos presentes na cauda dos fosfolipídios, nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX na pressão superficial de 30mN/m. A Figura 25 (b) mostra um gráfico de barras das intensidades relativas para os estiramentos simétrico e antissimétrico do CH_2 para cada uma das subfases estudadas.

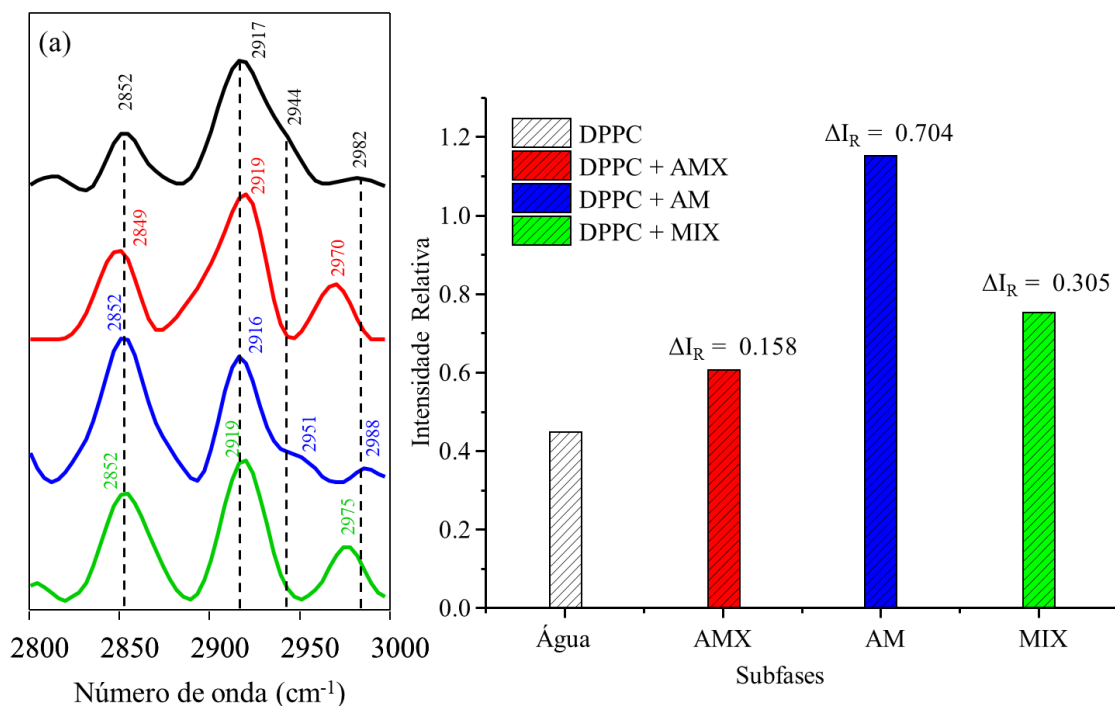


Figura 25: (a) Espectro PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosa, AMX, AM e MIX na região da cauda do fosfolípido, obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas estiramento simétrico e antissimétrico do CH₂ para cada uma das subfases estudadas.

De forma geral, não houve variação significativa na frequência de vibração para as bandas relacionadas ao νCH_2 (simétrico e antissimétrico), o que sugere que não está ocorrendo uma interação química dos poluentes com a cauda do fosfolípido. (Figura 25 (a)). Entretanto pode-se notar que há uma variação nas intensidades relativas das bandas pela relação $\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$. Segundo Levin *et al.* [96], quanto maior a variação da intensidade relativa (ΔI_R), maior será a desordem nas caudas dos fosfolípidios na interface ar-água [97]. Sendo assim, nota-se que o AM provocou a maior variação, inclusive apresentando a inversão das intensidades, uma vez que normalmente o pico do estiramento CH₂ antissimétrico é mais intenso que o simétrico [98] (Figura 25 (b)). Essa variação indica alguma desordem nas caudas, e corrobora com as mudanças observadas na banda do δCH_2 para esse poluente, que se deslocou de 1465 para 1478 cm^{-1} . Tanto a AMX quanto a MIX apresentaram mudanças nas intensidades, entretanto, não tão

significativas quanto o AM. De todas as formas, estas pequenas variações também podem ser consideradas como desordens provocadas nas caudas pela presença dos poluentes, porém em menor escala [99]. Apesar do DPPC não apresentar grandes deslocamentos nas isotermas π -A, isso não indica que não esteja ocorrendo alterações na monocamada, como acabamos de discutir nas análises de PM-IRRAS, assim como mudanças morfológicas observadas nas imagens de BAM.

Na Figura 26 são apresentados os resultados de PM-IRRAS para a monocamada de DOPC a 30 mN/m, em temperatura ambiente (23 °C) nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} .

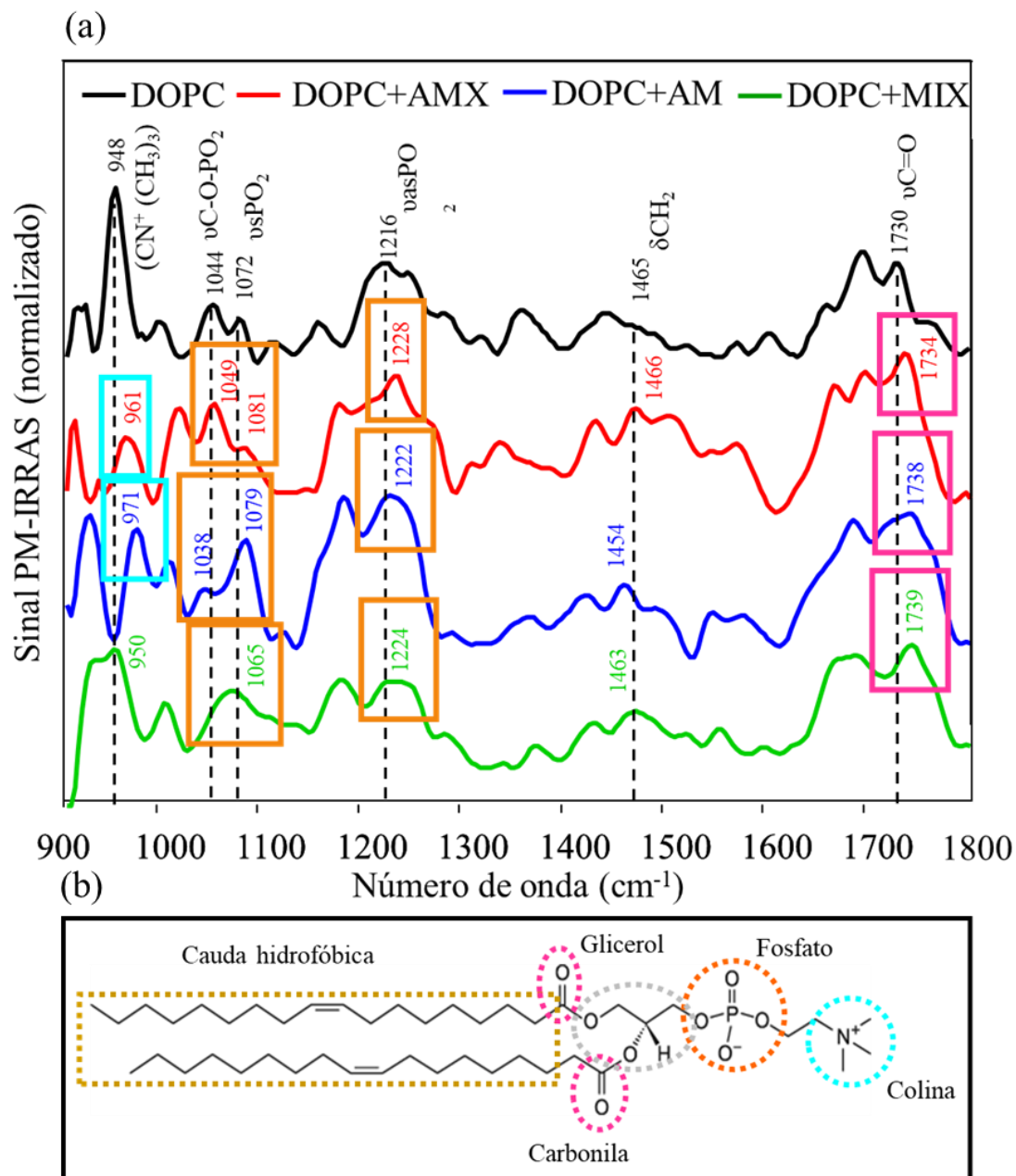


Figura 26: (a) Espectros PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosas e dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, na região da cabeça do fosfolípido. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) ilustração representativa dos principais grupos químicos das fosfatidilcolinas. As marcações indicadas nas bandas correspondem aos grupos de mesma cor na estrutura químicas do lipídio.

O espectro de PM-IRRAS para a subfase aquosa (Figura 26) apresenta as bandas características do DOPC tradicionalmente reportadas na literatura [87, 93]. Nota-se a presença do estiramento do grupo C=O (1730cm^{-1}), a banda do grupo δCH_2 (1465cm^{-1}),

além das bandas simétrica e assimétrica do grupo P=O ($\nu_s = 1072 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1216 \text{ cm}^{-1}$), assim com a bandas ν_{C-O-PO_2} (1044 cm^{-1}) e $\nu_{as}(CN^+(CH_3)_3)$ (948 cm^{-1}) (Tabela 2).

Os resultados obtidos para a subfase de AMX mostram deslocamentos significativos para as bandas $\nu_{as}(CN^+(CH_3)_3)$, provavelmente devido à uma interação eletrostática entre este grupo e o ácido carboxílico da AMX (negativamente carregado), além das bandas $\nu_s P=O$ e $\nu_{as} P=O$, que deslocaram de 948, 1072 e 1216 cm^{-1} para 961, 1081 e 1228 cm^{-1} , respectivamente. Esses deslocamentos indicam duas possibilidades de interação: i) ligações de hidrogênio entre o hidrogênio do OH da AMX e o oxigênio do grupo fosfato, ou ii) interações eletrostáticas entre a amina da AMX (positivamente carregada) e o grupo fosfato (negativamente carregado). Foram observados ainda pequenos deslocamentos para os grupos ν_{C-O-PO_2} e $\nu_{C=O}$, porém menores que os discutidos acima. Contudo, tais mudança podem indicar algum tipo de interação, mas não tão efetiva quanto as discutidas em detalhes. Esses deslocamentos de bandas indicam que a AMX interage com todos os grupos presentes na cabeça do fosfolipídio, sugerindo que a AMX afeta de forma geral a cabeça do lipídio (Figura 26). No trabalho de Geraldo *et al.* [95] foram realizadas medidas de PM-IRRAS para o DPPC em subfase do fármaco ibuprofeno (negativamente carregado). Resultados similares ao deste trabalho foram obtidos, visto que mesmo nos grupos fosfato (negativamente carregados) foram afetados pela presença do ibuprofeno. De acordo com os autores a desordem causada pelo ibuprofeno afeta as ligações de hidrogênio da água ao redor do lipídio. Ainda, no trabalho de Stunges *et al.* [79] foram realizadas medidas de PM-IRRAS de DPPC em subfase do fármaco 17 α -etinilestradiol (negativamente carregado em solução). Assim como neste trabalho, ocorreram mudanças nas bandas dos grupos fosfato (caráter negativo) e carbonila devido a presença do analito. Segundo os autores, ocorreram interações entre o OH do fármaco e os grupos citados acima, ou seja, é possível que ocorram interações de

hidrogênio, mesmo com repulsões eletrostáticas entre outras partes das mesmas moléculas, assim como o inverso.

Na subfase de AM as mudanças foram mais significativas: os grupos $\nu_{\text{C-O-PO}_2}$, $\nu_{\text{sP=O}}$ e $\nu_{\text{asP=O}}$, deslocaram-se de 1044, 1072 e 1216 cm^{-1} para 1038, 1079 e 1222 cm^{-1} , respectivamente. Este resultado era esperado, pois o AM possui carga positiva, logo tenderia a se aproximar da região do fosfato negativa. Entretanto o grupo $\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3))$ deslocou-se de 948 cm^{-1} para 971 cm^{-1} , fato este que é interessante, pois seria esperado uma repulsão entre o AM e o N^+ do grupo colina. Assim, pode-se presumir que esteja ocorrendo algum tipo de interação secundária entre o grupo colina e o AM. Ocorreram ainda mudanças nas bandas δCH_2 e $\nu_{\text{C=O}}$, que deslocaram de 1465 e 1730 cm^{-1} para 1454 e 1738 cm^{-1} , respectivamente. A interação entre o grupo carbonila e o AM, provavelmente está ligada a alguma interação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila e algum nitrogênio do AM. Todas essas mudanças nas bandas do fosfolipídio indicam que o AM afeta de forma geral a cabeça do DOPC, o que evidencia a ocorrência da interação entre o poluente e a cabeça polar do lipídio. Este fato é reforçado, pois mudanças nos espectros são observadas mesmo nos grupos próximos a cauda e, também, nos grupos os quais o AM em princípio não deveria ter afinidade devido a repulsões eletrostáticas. No trabalho de Schimdt *et al.* [87] foram realizadas medidas de PM-IRRAS em subfase de AM para o DOPC, e um resultado semelhante ao deste trabalho foi observado, visto que as mesmas bandas foram afetadas. Segundo o autor tais mudanças estão associadas a solvatação do grupo C=O e a hidratação ao redor dos grupos da cabeça do lipídio, sendo que as moléculas de AM provavelmente estão localizadas próximas aos grupos fosfato e carbonila.

O espectro obtido para a MIX apresenta alguns deslocamentos, entretanto não tão significativos quanto os observados para o AM. Ainda, não ocorreram mudanças

consideráveis para os grupos $\nu_{as}(CN^+(CH_3))$ e δCH_2 , porém as bandas $\nu C-O-PO_2$ e $\nu_s P=O$ foram bastante afetadas, pois observa-se ou uma sobreposição ou um desaparecimento de uma destas bandas. Isso pode indicar uma interação eletrostática entre alguma carga remanescente do aduto formado pela MIX com o grupo fosfato do lipídio. Ou também alguma interação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fosfato e algum hidrogênio da MIX. Além disso, o grupo $\nu_{as} P=O$ deslocou-se 1216 cm^{-1} para 1224 cm^{-1} , e o grupo $\nu C=O$ de 1730 cm^{-1} para 1739 cm^{-1} . A interação para o grupo carbonila na MIX se dá de forma semelhante ao discutido para o grupo fosfato, ou seja, uma interação de hidrogênio.

Tabela 2: Atribuições das bandas nos espectros PM-IRRAS do DOPC nas subfases de AMX, AM e MIX

DOPC	DOPC+Amx	DOPC+AM	DOPC+Mix	Atribuição
948	961	971	950	Estiramento antissimétrico ($CN^+(CH_3)_3$)
1044	1049	1038	---	Estiramento ($C-O-PO_2^-$)
1072	1081	1079	1065	Estiramento simétrico P=O
1216	1228	1222	1224	Estiramento antissimétrico P=O
1465	1466	1454	1463	Deformação angular CH_2
1730	1734	1738	1739	Estiramento C=O
2883	2888	2886	2892	Estiramento simétrico CH_2
2916	2915	2914	2914	Estiramento antissimétrico CH_2
2950	2958	2957	2948	Estiramento antissimétrico CH_3

Na Figura 27 (a) são apresentados os espectros de PM-IRRAS obtidos para o DOPC, no intervalo de 2800 a 3000 cm^{-1} , referente aos modos de vibração dos grupos presentes na cauda dos fosfolipídios, nas subfases de água ultrapura, AMX, AM e MIX na pressão superficial de 30mN.m^{-1} . A Figura 27 (b) mostra um gráfico de barras das intensidades relativas para as bandas de estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 para a AMX.

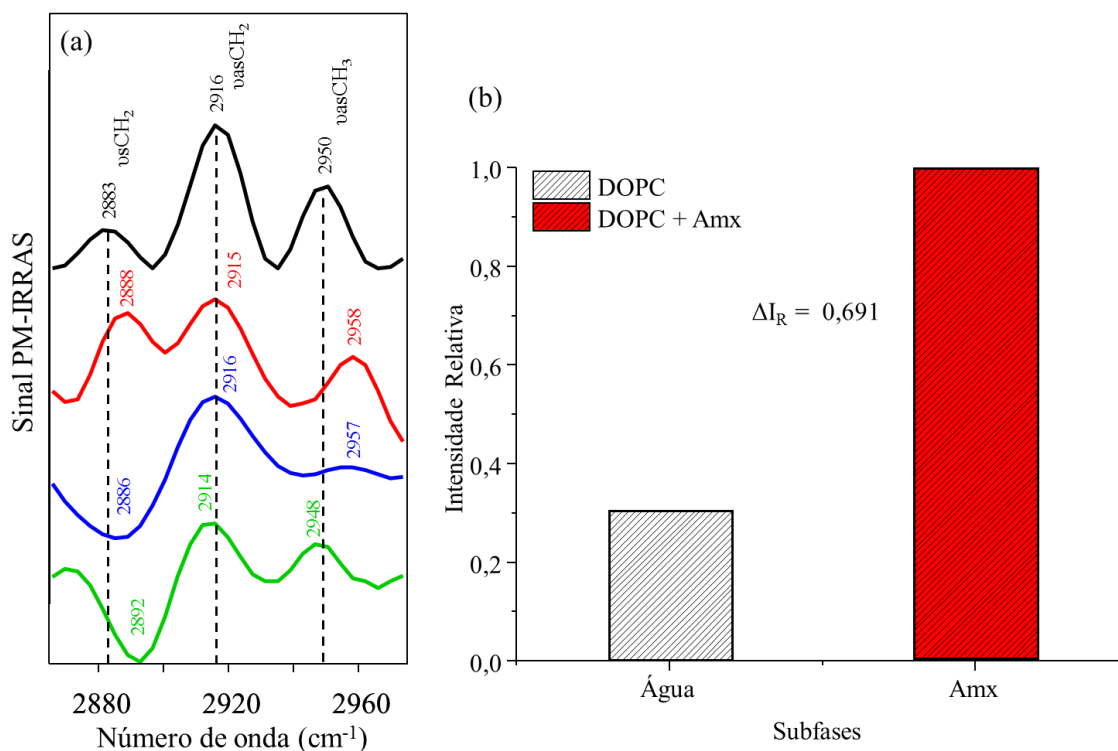


Figura 27: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosa, AMX, AM e MIX na região da cauda do fosfolipídio obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (b) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas de estiramento simétrico e antissimétrico do CH₂ para a AMX.

Diferentemente do DPPC, a região da cauda do DOPC foi muito afetada pela presença dos poluentes. Pode-se notar na Figura 27 (a) que ocorreram deslocamentos para o grupo v_sCH₂ para todos os AMX (de 2883 para 2888 cm⁻¹), AM (de 2883 para 2886 cm⁻¹) e MIX (de 2883 para 2892 cm⁻¹). Entretanto, as mudanças mais significativas estão nas intensidades relativas (ΔI_R) que variaram muito mais do que para o DPPC. A AMX teve uma variação de 0,691, o que indica uma grande desordem na região da cauda [88]. Ainda, as mudanças maiores ocorreram para o AM e a MIX que tiveram a inversão da banda v_sCH₂ para valores negativos. Isso significa que o momento de dipolo de transição (M) da banda, que provavelmente estava paralelo a superfície, teve uma variação de 90°, ficando perpendicular à superfície, requisito este necessário para que a banda seja negativa de acordo com a Equação 4 (seção 3.3). Isso demonstra uma mudança drástica na região da cauda, logo uma desordem nesta região, provavelmente ligada a presença do

AM, visto que a MIX também provocou o mesmo efeito, enquanto que para a AMX as bandas permaneceram positivas. Um resultado semelhante foi observado no trabalho de Schimdt *et al.* [87], no qual foram realizadas medidas de PM-IRRAS para o AM na subfase, e notou-se que a intensidade relativa da banda $\nu_s\text{CH}_2$ também se inverteu. Entretanto, o autor não entrou em detalhes sobre tal mudança, comentando apenas que tal resultado implica na desordem da monocamada induzida pela presença do AM.

5.4. FTIR

Na Figura 28 são apresentados os espectros FTIR dos filmes *cast* dos poluentes, os quais foram obtidos com o intuito de investigar que tipo de interação pode estar ocorrendo quando estes são misturados.

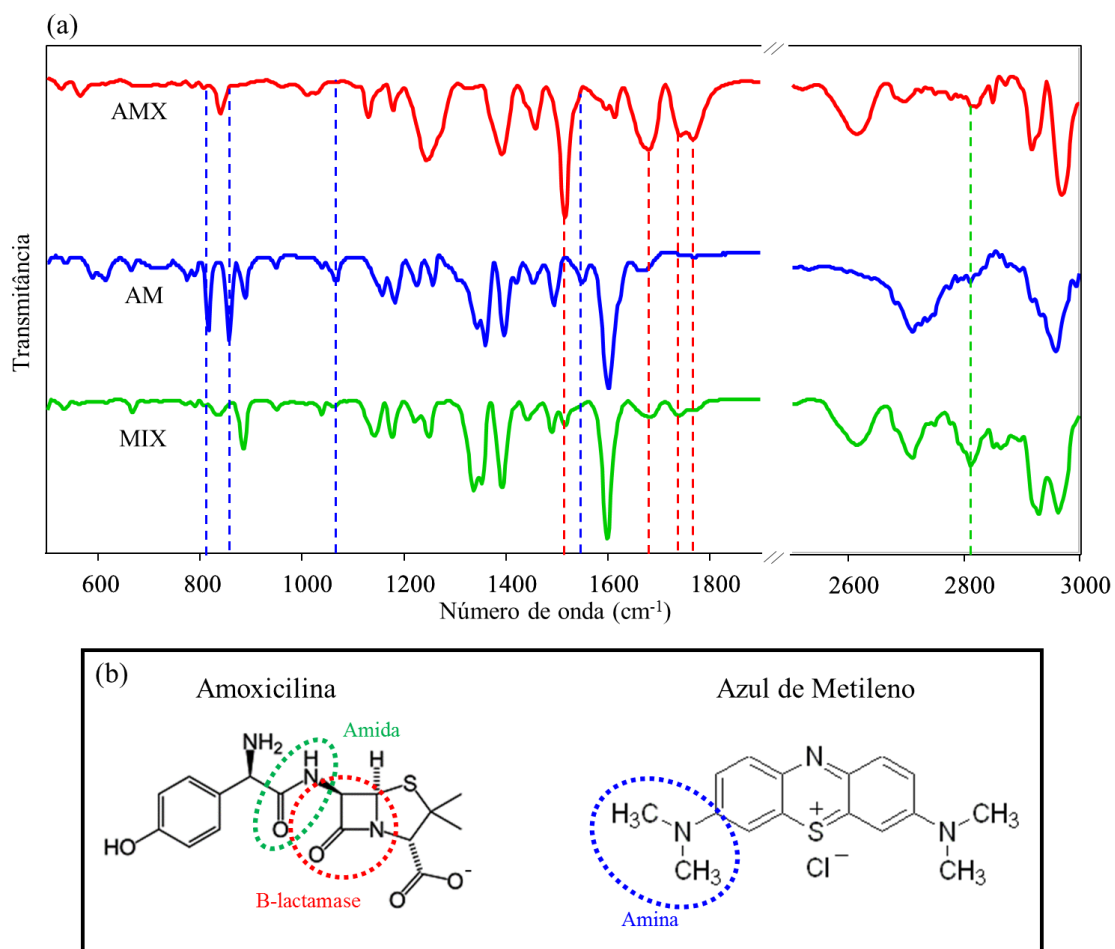


Figura 28: (a) Espectros de FTIR para os filmes *cast* para os poluentes AMX, AM e MIX e (b) ilustração representativa dos grupos químicos envolvidos nas interações químicas entre os poluentes.

Na Figura 28 (a) as linhas tracejadas indicam as mudanças observadas nos espectros da AMX e AM em relação a MIX, sendo que as linhas tracejadas em vermelho condizem as mudanças no espectro da AMX, as azuis para o AM e a verde representa um pico que aparece somente para a MIX. Na Tabela 3 são apresentadas as atribuições para cada uma das bandas indicadas pelas linhas tracejadas.

Nota-se que os picos da AMX na região do grupo β -lactamase (Figura 28 (b)) perderam muita intensidade relativa no espectro da MIX, como por exemplo, δ NH (amida) (1515 cm^{-1}), ν C=O (amida) (1678 cm^{-1}) e ν C=O (β -lactamase) (1768 cm^{-1}) [90]. Assim, é possível inferir que este grupo está sendo afetado pela presença do AM. Quando comparando o espectro obtido para o AM em relação ao obtido para MIX, observa-se que ocorreram algumas mudanças, principalmente nos grupos que envolvem ligações C-H e C-N (817 , 858 e 1546 cm^{-1}) [26], sendo que a maioria destes picos praticamente desapareceu do espectro. Essas mudanças indicam que o AM também é afetado pela presença da AMX. Além destas mudanças indicadas, o espectro da MIX apresentou um pico em 2811 cm^{-1} relacionado a um CH_3 ligado ao O ou N [91]. Todas estas mudanças sugerem a formação de um aduto quando se mistura a AMX com o AM, assim como é reportado no trabalho de El-Shahat *et al.* [81]. Ainda, é provável que o grupo β -lactamase da AMX esteja interagindo com alguma ligação C-H ou C-N da amina do AM (Figura 28 (b)).

Tabela 3: Atribuições dos espectros FTIR para AMX, AM e MIX dos picos que tiveram mudanças.

Picos	Atribuições	Referências
817	δ CH fora do plano (anel) / δ CH fora do plano	[26]
858	Deformação esqueleto (CC e CS) / δ CH fora do plano	[26]
1067	ν_{as} CS + δ CH no plano (anel) + δ CH fora do plano (CH3)	[26]
1515	δ NH (amida)	[99]
1546	ν CN (lateral) + δ CH fora do plano (CH3) + δ CH no plano (anel) / vibrações do anel aromático	[26]
1678	ν C=O (amida)	[99, 101]
1742	ν C=O	[92]
1768	ν C=O (β -lactamase)	[92]
2811	-CH ₃ ligado a um O ou N	[100]

Nas Figuras 29 e 30 são apresentados os espectros FTIR dos filmes *cast* da mistura dos lipídios (DPPC e DOPC, diluídos em clorofórmio) com os poluentes (AMX, AM e MIX, diluídos em metanol). Além dos espectros de cada composto de forma separada.

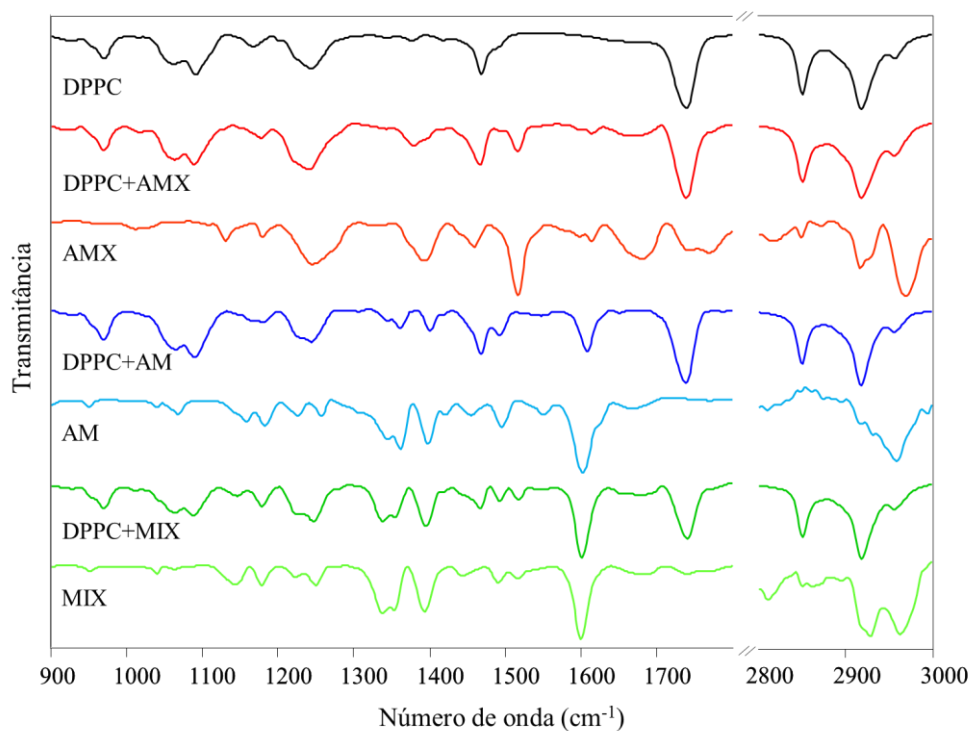


Figura 29: Espectros FTIR dos filmes *cast* de DPPC na presença dos poluentes AMX, AM e MIX.

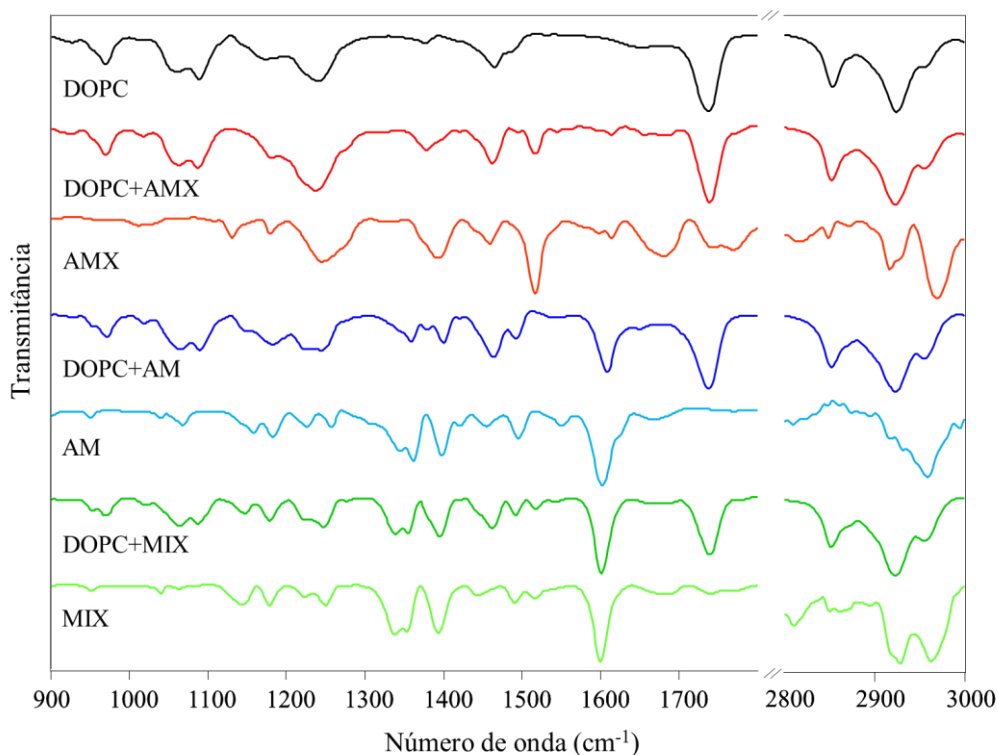


Figura 30: Espectros FTIR dos filmes *cast* de DOPC na presença dos poluentes AMX, AM e MIX.

De modo geral, os filmes *cast* dos fosfolipídios na presença dos poluentes não apresentaram nenhuma mudança ou deslocamento significativa, tanto para o DPPC, quanto para o DOPC, como pode ser visto nas Figuras 29 e 30. Os filmes *cast* dos lipídios com os poluentes apresentaram os mesmos picos referentes ao lipídio puro, com valores de número de onda praticamente idênticos. Há uma sobreposição dos picos dos lipídios e dos poluentes, sem o deslocamento ou o surgimento de novas picos. Isso indica que os fosfolipídios na forma de filme sólido não são afetados pela presença dos poluentes. Na Tabela 4 são apresentados as atribuições dos fosfolipídios DPPC e DOPC [103, 104].

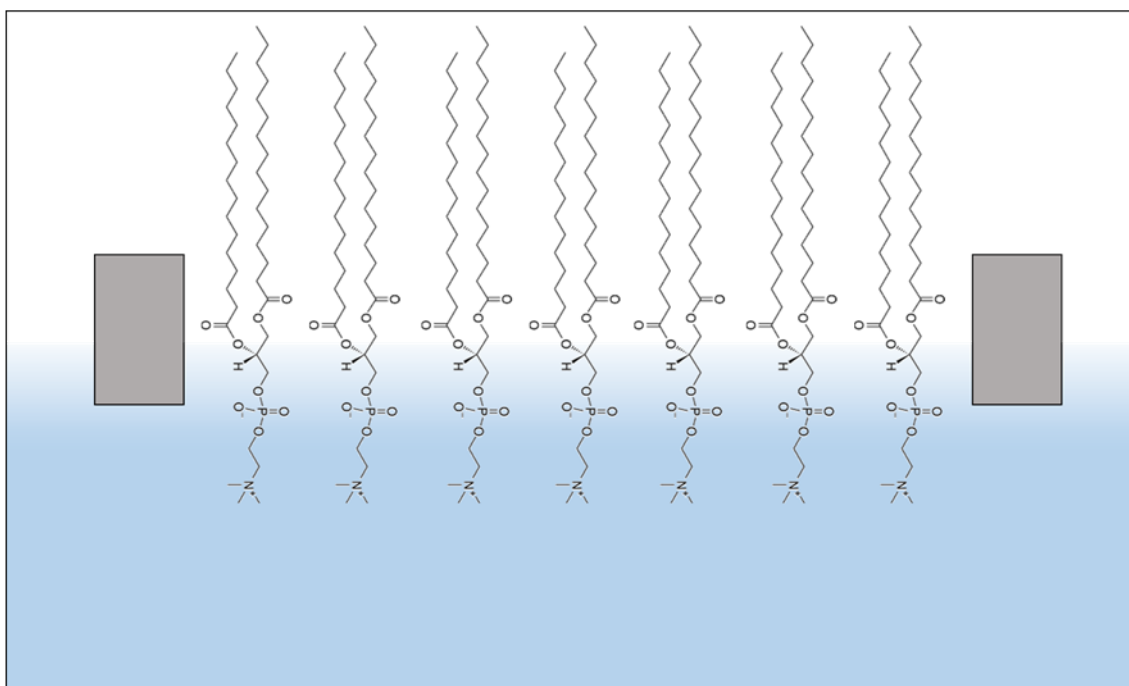
Tabela 4: Atribuições das bandas nos espectros FTIR para os fosfolipídios DPPC e DOPC.

DPPC	DOPC	Atribuições
970	969	Estiramento anti-simétrico (CN ⁺ (CH ₃) ₃)
1062	1061	Estiramento (C-O-PO ₂ ⁻)
1090	1088	Estiramento simétrico P=O
1244	1240	Estiramento anti-simétrico P=O
1468	1464	Deformação angular CH ₂
1737	1737	Estiramento C=O
2850	2853	Estiramento simétrico CH ₂
2917	2923	Estiramento anti-simétrico CH ₂
2956	2957	Estiramento anti-simétrico CH ₃

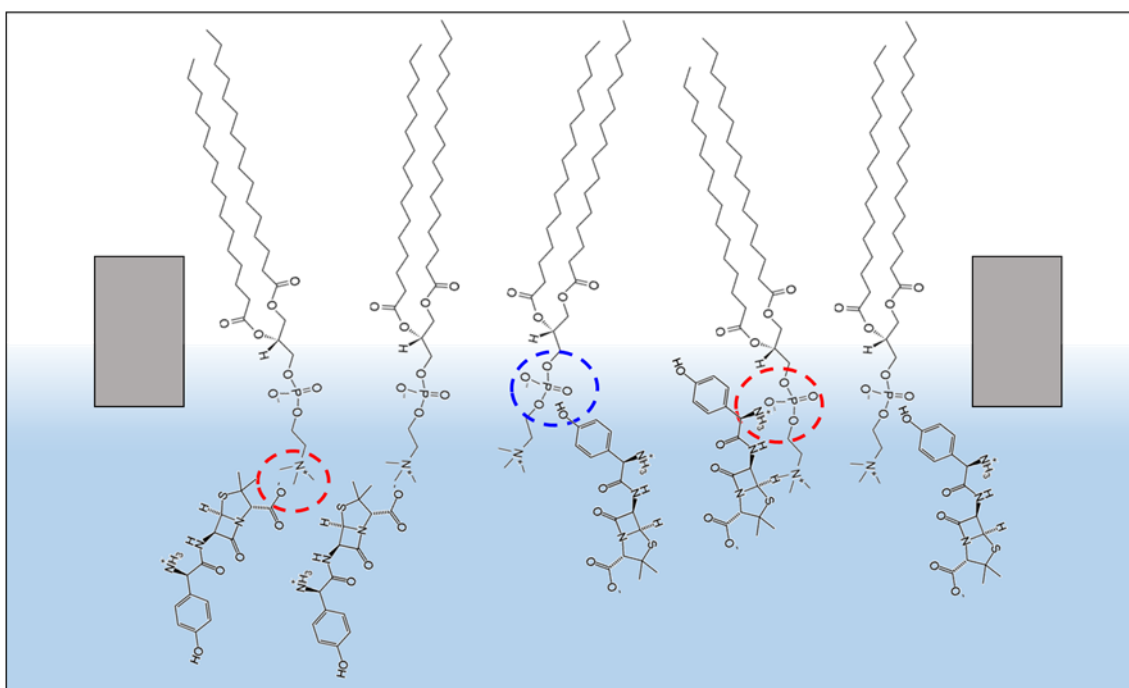
5.5. Estruturação das monocamadas


Nas Figuras 31 e 32 são apresentadas as possíveis estruturas que a monocamada de DPPC pode estar assumindo na fase líquido-condensada, devido a presença de diferentes subfases de AMX, AM e MIX. Esta é uma montagem ilustrativa baseada nos experimentos discutidos anteriormente.

(a) DPPC



(b) DPPC + AMX



 Interações secundárias


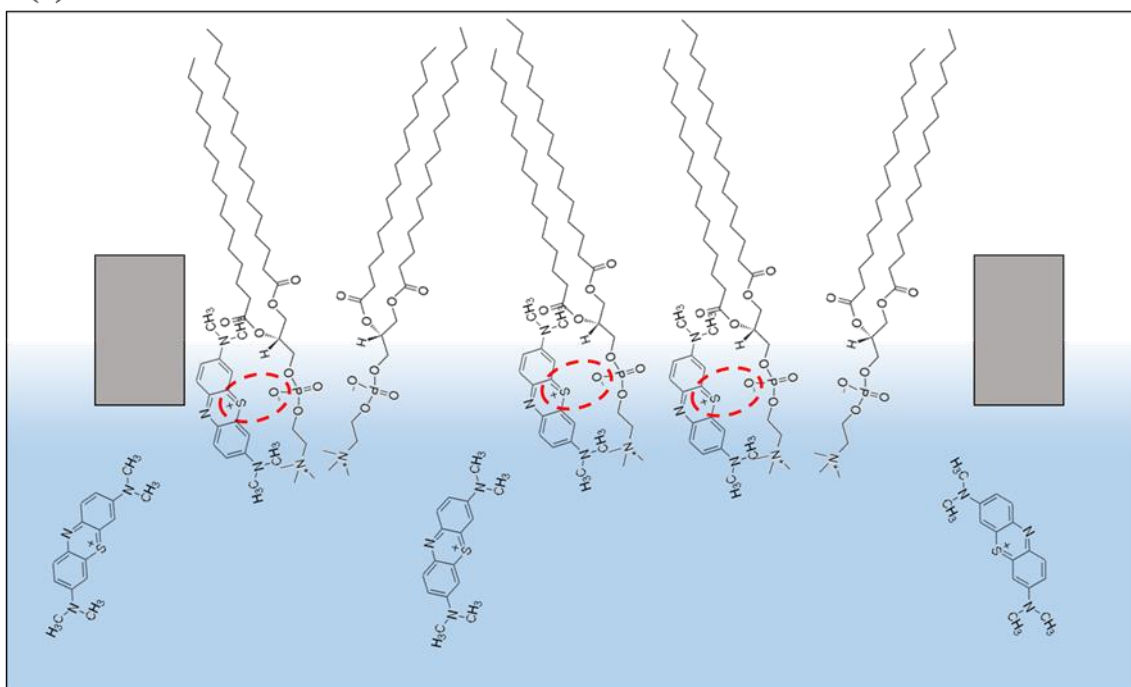
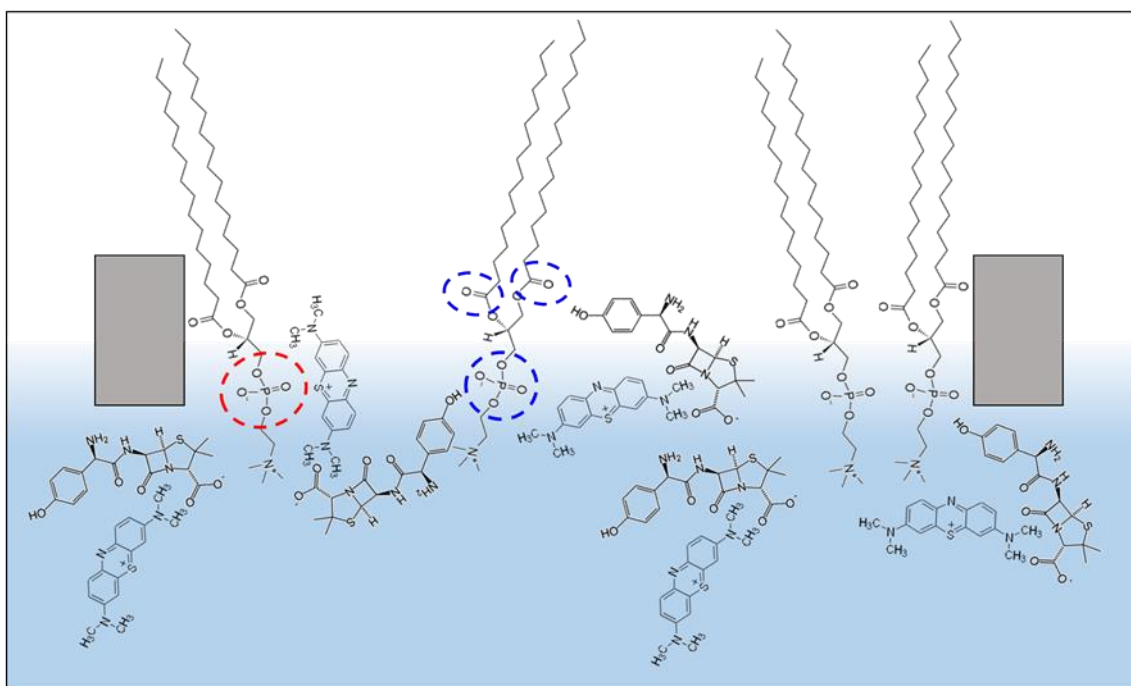
 Interações eletrostáticas


Figura 31: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (a) água ultrapura e (b) AMX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

(a) DPPC + AM



(b) DPPC + MIX



 Interações secundárias


 Interações eletrostáticas

Figura 32: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (a) AM e (b) MIX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

A Figura 31 (a) mostra uma ilustração de como estaria estruturada a monocamada de DPPC em subfase aquosa, estando os lipídios de forma bem empacotada posicionados um ao lado do outro, com a cabeça do lipídio (hidrofílica) para baixo na subfase, e a cauda (hidrofóbica) para cima fora da água. Na subfase de AMX não foram observadas grandes mudanças no deslocamento das isotermas π -A, logo a AMX não estaria ocupando um espaço na interface ar-água. Assim, é provável que estejam ocorrendo interações eletrostáticas entre as regiões parcialmente carregadas dos lipídios e da AMX (representado pelo círculo vermelho), como discutidos na análise do PM-IRRAS, ou também alguma ligação de hidrogênio (interação secundária, representada pelo círculo azul) entre o OH da AMX e o grupo fosfato do DPPC. Notou-se também uma certa desordem na região da cauda via PM-IRRAS, e, também uma pequena variação na fluidez da monocamada. Essa desordem e mudança na fluidez são representadas na imagem pela inclinação do lipídio na Figura 31 (b).

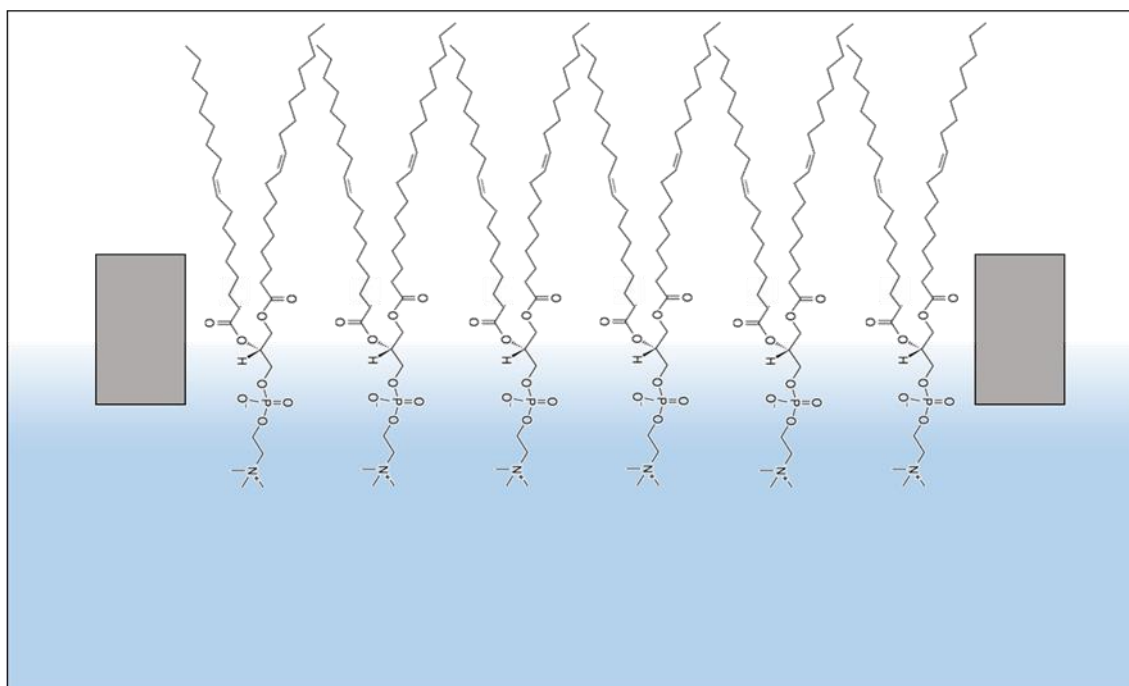
A Figura 32 (a) mostra a ilustração da estruturação da monocamada de DPPC em subfase de AM. Assim como para a AMX, não foram observados deslocamentos significativos (nos filmes de Langmuir) durante a fase líquido-condensada, logo o AM não estaria ocupando a interface ar-água. Como no caso da AMX, para o AM também foi observada uma desordem na cauda (via PM-IRRAS), assim como um ligeiro aumento na fluidez, representada pela inclinação do lipídio na ilustração. O círculo vermelho na Figura 32 (a) representa a possível interação eletrostática que estaria ocorrendo entre o grupo fosfato do lipídio e o enxofre do AM, como observada via PM-IRRAS.

A MIX, diferentemente dos outros poluentes analisados individualmente, causou um deslocamento para maiores áreas nos filmes de Langmuir, como pode ser visto via isotermas π -A. Logo, o aduto formado (representado na figura pelos dois poluentes grudados uma ao outro) estaria presente na interface ar-água, assim como representa na

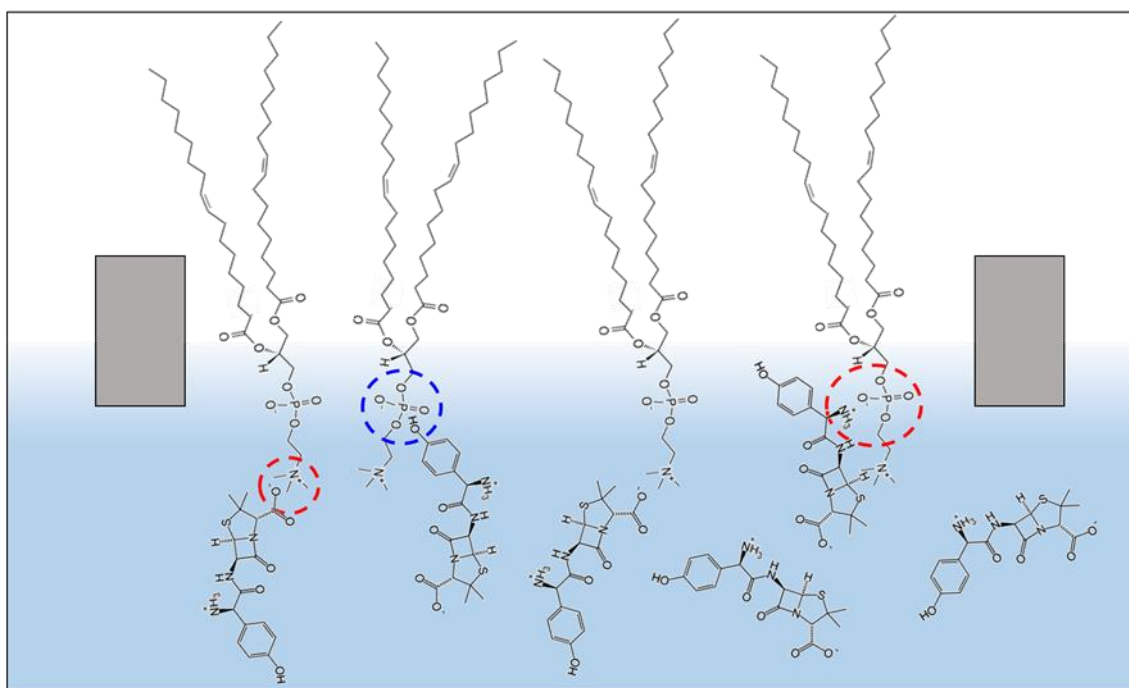
Figura 32 (b). Tal suposição é reforçada pelos resultados das análises de PM-IRRAS, pois para a MIX o grupo carbonila do lipídio (representado pelo círculo azul) deslocou-se no espectro devido a uma possível interação de hidrogênio entre o aduto e o lipídio. Finalmente, assim com os outros poluentes, as mudanças na fluidez (análise da elasticidade) e desordem na região da cauda (via PM-IRRAS) foram representadas pela inclinação do lipídio.


Nas Figuras 33 e 34 são apresentadas as ilustrações para as possíveis estruturas que a monocamada de DOPC pode estar assumindo na fase líquido-condensada, devido a presença de diferentes subfases de AMX, AM e MIX. Esta é uma montagem baseada nos resultados discutidos anteriormente.

(a) DOPC



(b) DOPC + AMX



 Interações secundárias


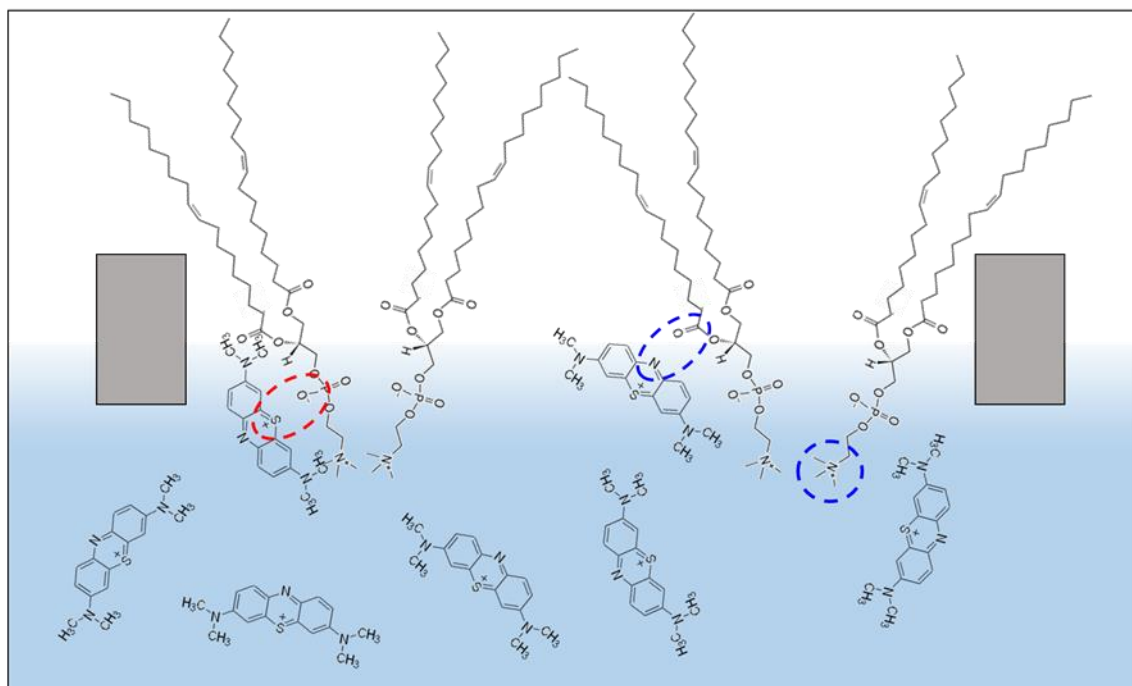
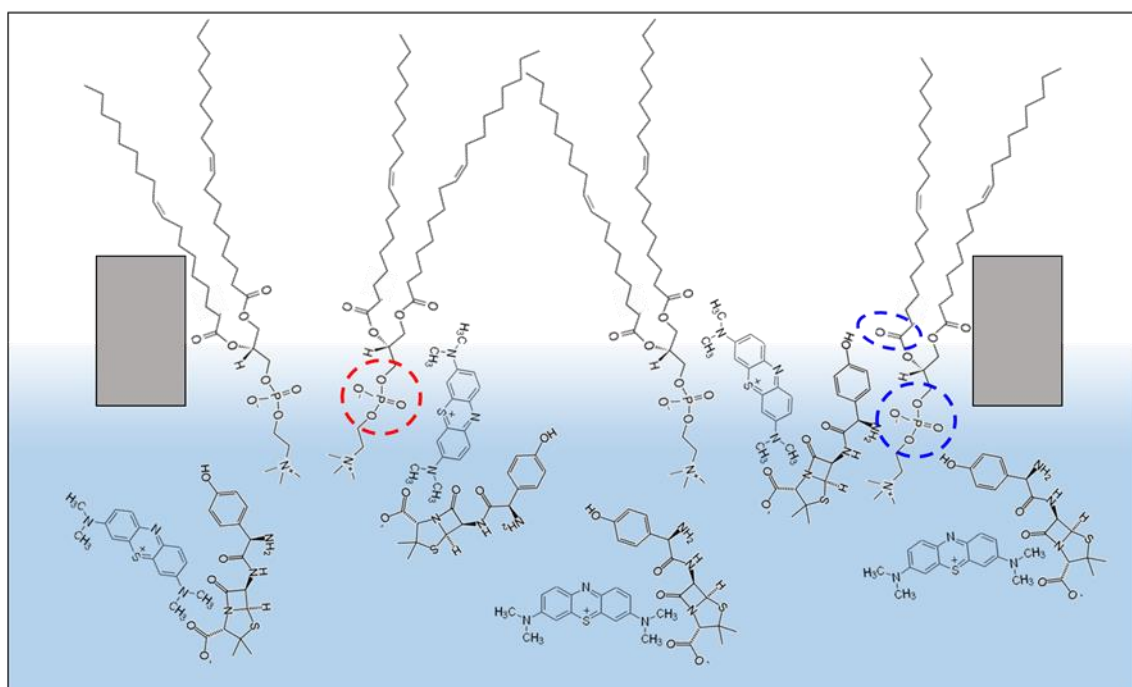
 Interações eletrostáticas


Figura 33: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (a) água ultrapura e (b) AMX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

(a) DOPC + AM



(b) DOPC + MIX



 Interações secundárias


 Interações eletrostáticas

Figura 34: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (a) AM e (b) MIX. As regiões circuladas em azul representam possíveis interações secundárias, os vermelhos interações eletrostáticas.

A Figura 33 (a) exibe a possível estruturação que a monocamada de DOPC pode estar assumindo, em que a região hidrofílica do lipídio (cabeça) estaria posicionada para baixo, enquanto a região hidrofóbica, estaria posicionada para cima. Entretanto, o DOPC apresenta uma pequena abertura na região da cauda, devido a presença das insaturações do lipídio.

Para a subfase de AMX (Figura 33 (b)), não se observou deslocamentos para maiores áreas nas isotermas π -A, sendo assim o lipídio na estaria presente na interface ar-água, assim como demonstrado na Figura 33 (b). Isso ocorre, devido a AMX afetar apenas os grupos colina, através de uma possível interação eletrostática entre o lipídio e o poluente (ambos parcialmente carregados, representado pelo círculo vermelho) e o grupo fosfato dos lipídios (através de uma interação secundária ou eletrostática), que estão posicionados na subfase (não na interface). A desordem na região da cauda através das medidas de PM-IRRAS, são representadas pela inclinação do lipídio.

O AM causou um deslocamento para maiores áreas nas isotermas π -A, logo o mesmo estaria presente na interface ar-água, como é mostrado na Figura 34 (a). Assim como para a MIX no DPPC, o AM causou uma mudança no grupo carbonila (indica pelo círculo azul), que fica posicionada mais próximo a interface, fato este que pode ter ocasionado o deslocamento. Foram observadas mudanças ainda nos grupos fosfato e colina, indicado pelos círculos vermelho e azul, respectivamente. A desordem na região da cauda do DOPC, observada pela inversão da banda do CH₂ nos espectros de PM-IRRAS, foi representada na figura por uma inclinação mais acentuada do lipídio, se comparado com a inclinação causada pela AMX na Figura 33 (b).

A Figura 34 (b) apresenta a possível estruturação da monocamada de DOPC na presença da MIX, as conclusões deste caso são bem parecidas com a do DOPC na subfase

de AM, porém o deslocamento foi ainda maior, o que pode ser causado pelo tamanho do aduto formado entre a AMX e o AM, e assim como todas as subfases que deslocaram para maiores áreas, a MIX causou novamente uma mudança no grupo carbonila (indicado pelo círculo azul). E a desordem na cauda causada pela inversão do grupo CH₂ foi representada de forma similar a monocamada de DOPC em subfase de AM.

5.6. Análise de fluidez LAURDAN-GP

As análises de LAURDAN-GP foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis mudanças na fluidez das bicamadas lipídicas após a inserção dos poluentes. Na Figura 35 são apresentados os espectros de emissão obtidos para as LUVs de DPPC com a sonda LAURDAN em água ultrapura, assim como na presença dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, sendo os espectros coletados em temperatura ambiente (23 °C).

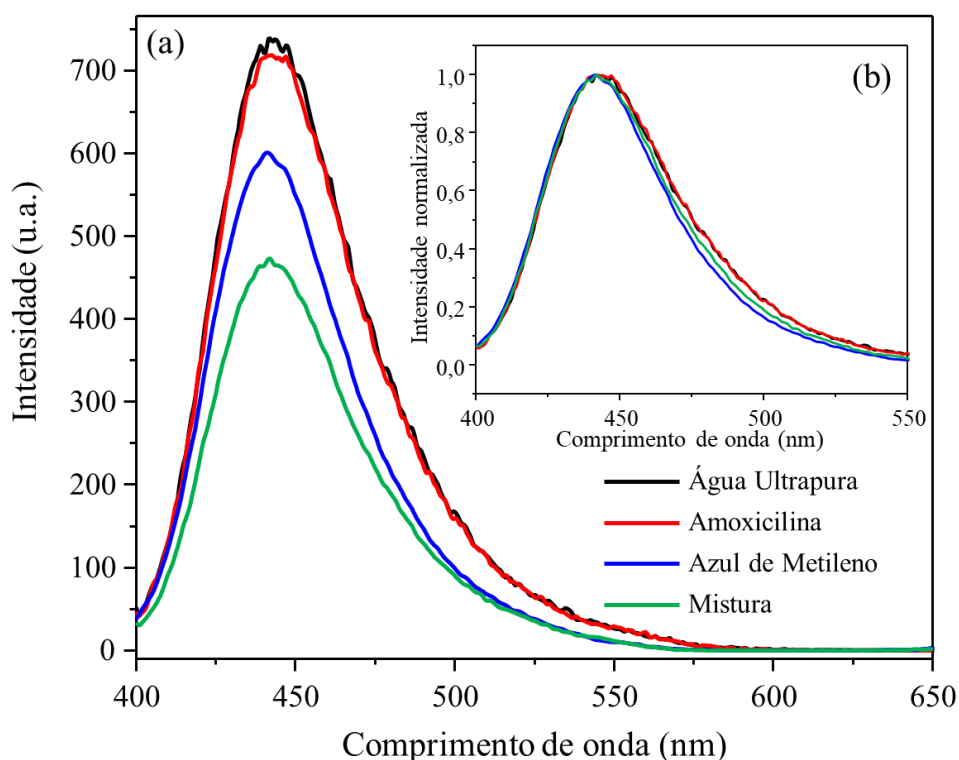


Figura 35: (a) Espectro de emissão da LAURDAN nas LUVs de DPPC em água ultrapura, AMX, AM e MIX e (b) espectro emissão normalizado. Espectros coletados a 23 °C.

O espectro de emissão da sonda LAURDAN inserida nas LUVs de DPPC medidas em água ultrapura apresentaram um espectro de emissão característico para a LAURDAN [105], com máxima intensidade próximo a região de 440 nm, característico da fase gel do DPPC, ou seja, quando as moléculas estão rígidas. Os espectros coletados na presença dos poluentes não apresentaram deslocamentos significativos, como pode ser observado na Figura 35 (b), sendo os espectros muito semelhantes entre si. Porém, na análise dos valores obtidos para a GP (polarização generalizada) apresentados na Tabela 5, calculados através da Equação 7, o DPPC exibiu o valor de 0,516, que é coerente com o reportado na literatura [106]. Entretanto, nota-se que o azul de metileno exibiu um valor de 0,605, o que indica um ligeiro aumento na rigidez da bicamada, pois, quanto maior o valor de GP, maior será a rigidez. O valor de GP para a AMX é praticamente idêntico ao da medida em água ultrapura, o que mostra que a AMX não alterou a rigidez da bicamada. Contudo, a MIX apresentou um valor intermediário de 0,565, entre os valores do AM e a AMX, o que indica que tal efeito de aumento da rigidez é característico do AM, uma vez a MIX apresentou o mesmo tipo de resultado. Nota que os valores de GP para MIX estão aproximadamente no meio entre os valores do AM e a AMX, o que faz sentido, pois metade das moléculas da MIX são de AM e a outra metade de AMX.

As diminuições observadas para os valores do módulo compressional obtidos através dos filmes de Langmuir indicam um possível aumento na fluidez da monocamada (Figura 16). Estes resultados nos levam à hipótese de que as organizações estruturais dos lipídios influenciam nos resultados referentes a fluidez/rigidez das estruturas lipídicas, pois a monocamada se trata de uma estrutura planar, que foi formada com a presença do poluente, enquanto as bicamadas são estrutura esféricas (com raio de curvatura) que foram expostas aos poluentes apenas depois de estarem formadas.

Tabela 5: Valores de polarização generalizada do DPPC para os diferentes poluentes.

Subfase	GP
Água ultrapura	0,516
Amoxicilina	0,522
Azul de metileno	0,605
Mistura	0,565

Na Figura 36 são apresentados os espectros de emissão obtidos para as LUVs de DOPC com a sonda LAURDAN em água ultrapura, assim como na presença dos poluentes AMX, AM e MIX com concentração de 1×10^{-4} mol/L, sendo os espectros coletados em temperatura ambiente (23 °C).

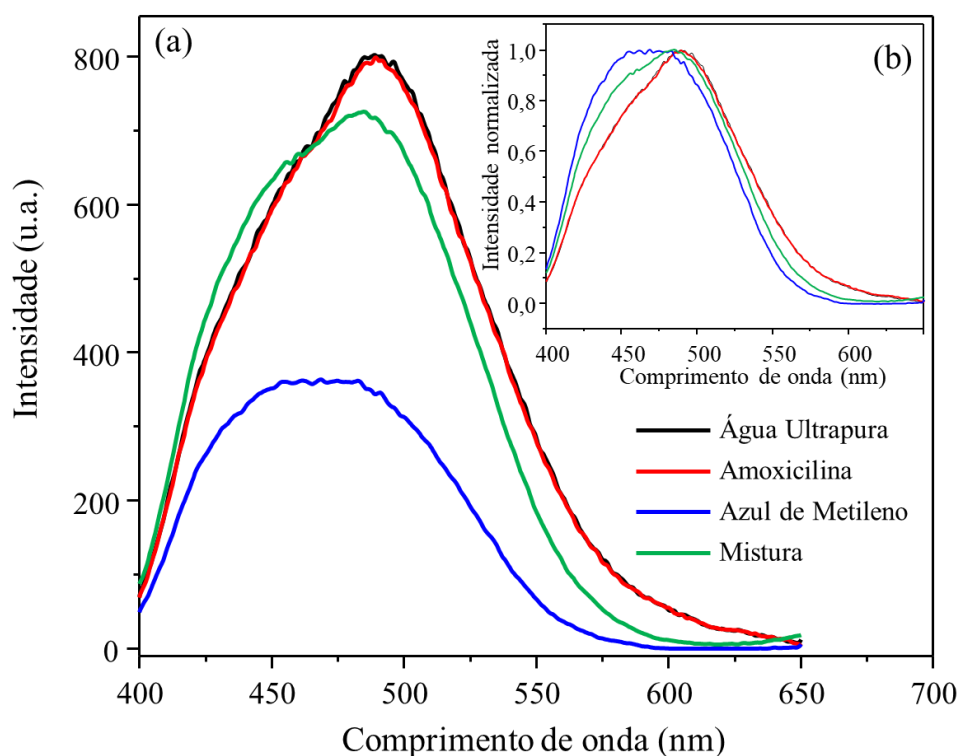


Figura 36: (a) Espectro de emissão da LAURDAN nas LUVs de DOPC em água ultrapura, AMX, AM e MIX e (b) espectro emissão normalizado. Espectros coletados a 23 °C.

O espectro de emissão da sonda LAURDAN inserido nas LUVs de DOPC em água ultrapura apresentaram um espectro de emissão característico da sonda LAURDAN

[107], com valor máximo de emissão próximo de 490 nm. Este resultado é obtido devido ao DOPC ser mais fluido se comparado ao DPPC, pois há uma maior mobilidade e penetração de moléculas de água, tornando o ambiente ao redor da sonda mais polar, ocasionando o deslocamento da emissão para maiores comprimentos de onda.

Diferentemente do DPPC, os espectros obtidos para os poluentes, principalmente para a MIX e AM, causaram deslocamentos para menores comprimentos de onda, se comparados com as LUVs em água ultrapura. Tal resultado indica que a presença dos poluentes está tornando as bicamadas mais rígidas. Além disso, o efeito do aumento da rigidez aparentemente está sendo causado pela presença do AM, visto que a AMX não causou nenhuma mudança. O fato de as bandas do AM e MIX terem ficado mais largas, está atrelado ao fato de que as LUVs não ficaram em sua totalidade mais rígidas. Caso fosse feita a deconvolução das bandas do AM e MIX, se notaria a presença de duas bandas, uma mais próxima a 440 nm, e outra mais próxima a 490 nm, o que indica que as LUVs as quais o LAURDAN está inserido emitem tanto para uma bicamada mais fluida, quanto para uma bicamada mais rígida. E ainda, a perda na intensidade por parte dos poluentes que tem o AM, está no fato de que parte da emissão gerada pela sonda LAURDAN, está sendo absorvida pelo AM. Assim como para as LUVs de DPPC os valores de GP para a MIX estão no meio entre os valores do AM e a AMX, o que é esperado, pois parte das moléculas da MIX são de AM e a outra de AMX.

Novamente, assim como para o DPPC, os valores de GP para as LUVs de DOPC aumentaram quando em contato com os poluentes AM e MIX, como pode ser visualizado na Tabela 6. O DOPC em água ultrapura exibe um valor de -0,214, e após a inserção do AM e MIX o valor de GP mudou para -0,027 e -0,108, respectivamente. Esse último reforça a hipótese do aumento da rigidez da bicamada. Um resultado semelhante do aumento da rigidez de bicamadas é reportado na literatura por Nielsen *et al.* [108], para

membranas compostas de DOPC:DOPG que após serem expostas ao peptídeo *novicidin*, também apresentaram um aumento do valor da GP. O autor comenta que a presença do peptídeo causou uma diminuição da acessibilidade das moléculas de água, afetando, assim, o empacotamento da bicamada.

Tabela 6: Valores de polarização generalizada do DOPC para os diferentes poluentes.

Subfase	GP
Água ultrapura	-0,214
Amoxicilina	-0,216
Azul de metileno	-0,027
Mistura	-0,108

5.7. Microscopia de Contraste de Fase

Nas Figuras 37, 38 e 39 são apresentadas as imagens obtidas para a microscopia de contraste de fase para as GUVs de DPPC em temperatura ambiente (23 °C), na presença da AMX, AM e MIX em três diferentes concentrações: 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L.

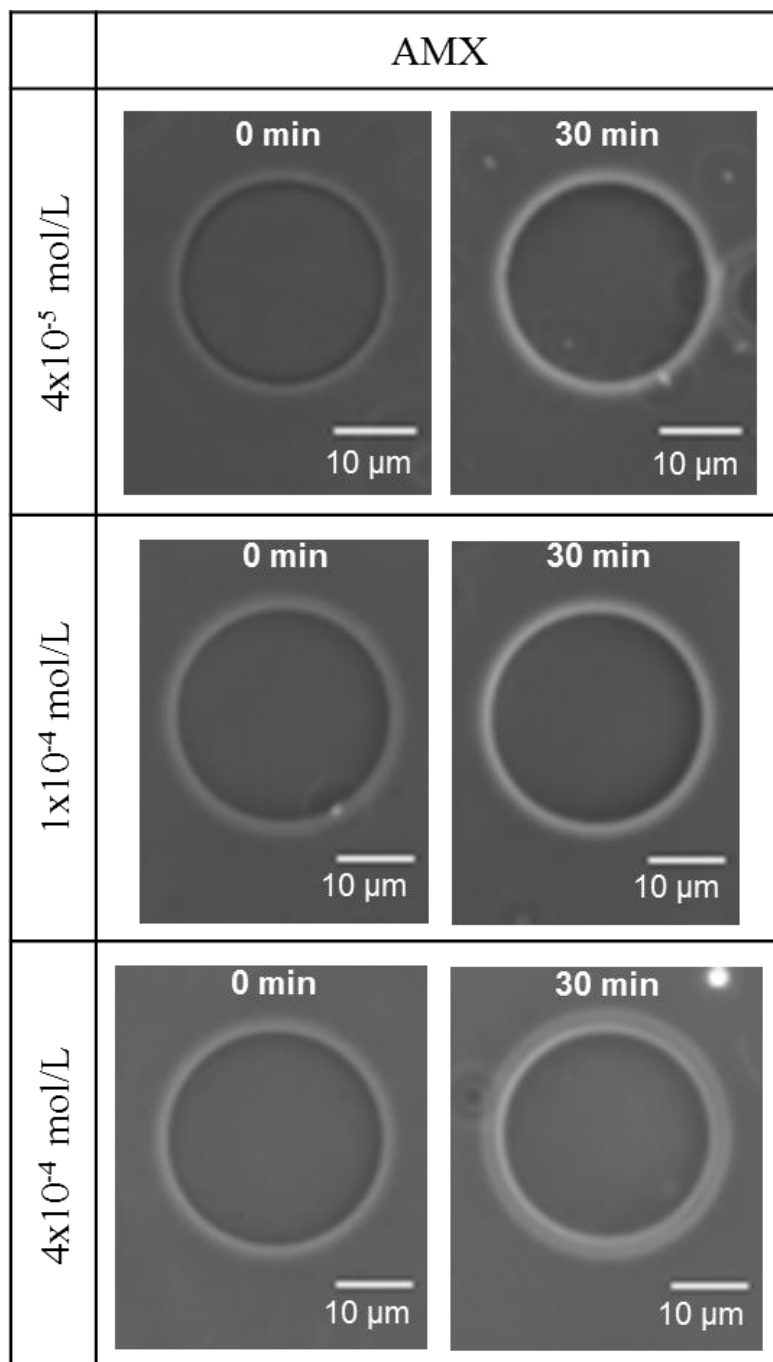


Figura 37: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC no poluente AMX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

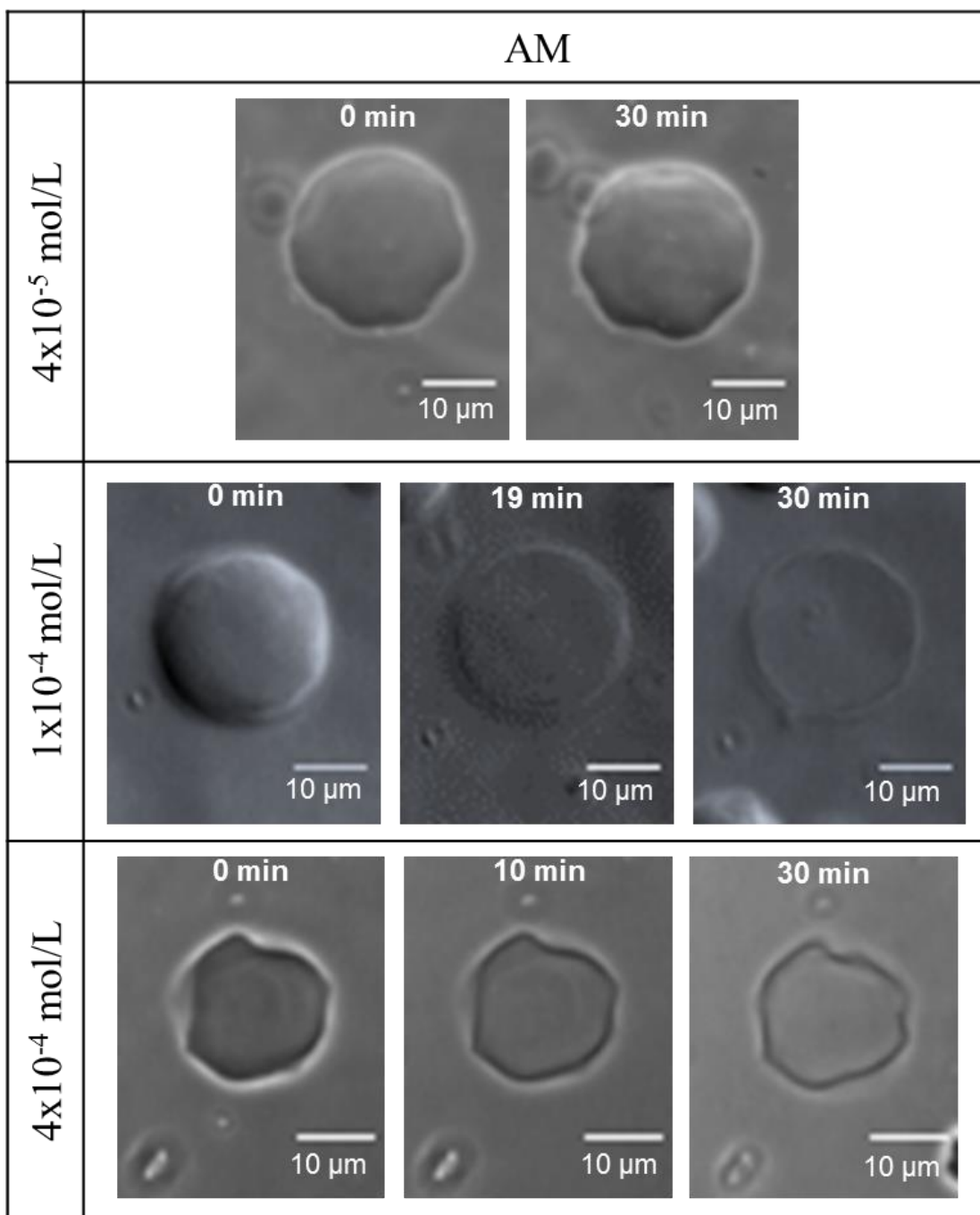


Figura 38: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVS de DPPC no poluente AM nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

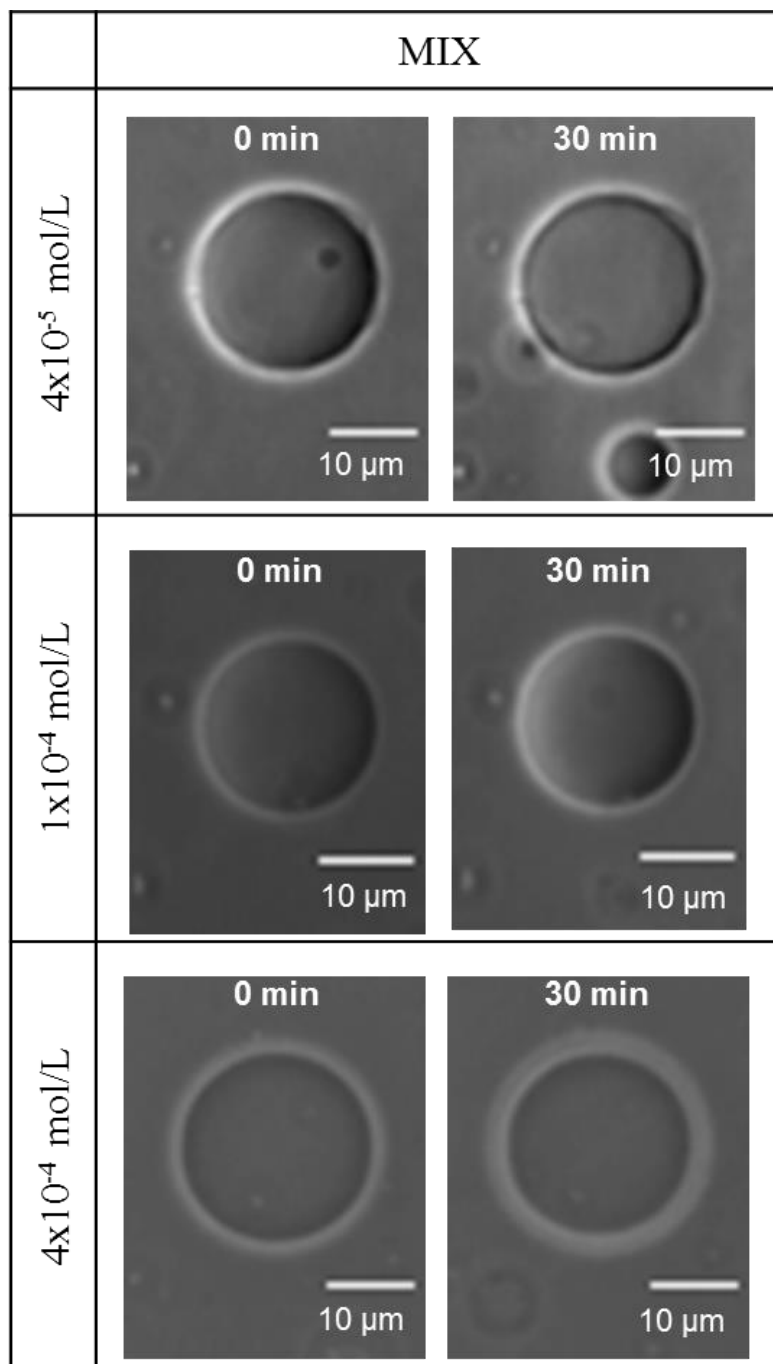


Figura 39: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC no poluente MIX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Nota-se que algumas GUVs de DPPC apresentaram o formato tradicional, não esférico devido à transição de fase do DPPC ser próxima de $41 \text{ }^\circ\text{C}$, o que causa a deformação das vesículas [109]. Entretanto, algumas GUVs apresentaram um formato esférico, ainda que as medidas tenham sido realizadas na temperatura de $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para as GUVs expostas à AMX não se observam mudanças no formato durante o intervalo medido de 30 minutos, nem mesmo nas maiores concentrações, o que indica que a AMX não afeta as vesículas de DPPC. Este resultado, de alguma forma corrobora com os resultados discutidos anteriormente: nos filmes de Langmuir não houve deslocamento para as monocamadas na fase condensada, a morfologia observada através das medidas de BAM não foram consideravelmente alteradas e os espectros de PM-IRRAS apenas afetaram os grupos da extremidade da cabeça do fosfolípido, ou seja, a parte externa da GUV.

Por outro lado, a exposição ao AM causou a perda do contraste de fase das GUVs para concentrações a partir de 1×10^{-4} mol/L. Observa-se que a GUV permanece estável até um certo período de tempo, quando se inicia a troca entre o conteúdo dos meios internos e externos da vesícula, perdendo assim o contraste. Essa perda de contraste indica que a presença do poluente causou o aumento dos poros da bicamada lipídica [110]. Entretanto a estrutura da bicamada não é alterada, visto que a GUV permanece intacta até o fim da análise (30 minutos). Vale ressaltar aqui que o aumento da rigidez observado nas análises de LAURDAN-GP (Figura 35), não infere a permeabilidade das vesículas. Pode-se notar também que conforme se aumenta a concentração do poluente, o tempo no qual a GUV começa a ser afetada diminui. Por exemplo, no caso da concentração de 1×10^{-4} mol/L são necessários 19 minutos para a vesícula começar a perder o contraste. Para a concentração de 4×10^{-4} mol/L o tempo diminui para 10 min, indicando que quanto mais AM, mais rápido tal efeito ocorre. Contudo, a perda de contraste de fase também depende do tamanho da vesícula (quanto maior a GUV, mais rápido o efeito ocorre). Entretanto, tal efeito pode variar, tanto em relação ao tempo de perda do contraste, quanto para o tamanho das GUVs.

A Tabela 7 apresenta uma análise quantitativa das GUVs de DPPC na presença do AM para a concentração mais alta (4×10^{-4} mol/L) após 30 minutos, relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas. Pode-se notar que quanto maior as vesículas, maior é a porcentagem de GUVs afetadas pelo AM. Observa-se que das 79 GUVs entre 10 e 30 μm , 73,4 % perderam o contraste após 30 minutos. Contudo para as GUVs menores que 10 μm , 32,5 % perderam o contraste, e para as maiores que 30 μm , cerca de 90,5 % foram afetadas, o que mostra que o tamanho influencia em tal efeito nas GUVs de DPPC.

Tabela 7: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AM após o intervalo de 30 min.

GUVs DPPC em Azul de Metileno			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (perda de contraste)	Porcentagem (%)
< 10 μm	191	62	32,5
10 e 30 μm	79	58	73,4
> 30 μm	21	19	90,5
Geral	291	139	47,8

Para a MIX dos poluentes não se observaram mudanças significativas mesmo para as concentrações mais altas, o que indica que a MIX dos poluentes não causa efeitos aparentes nas GUVs. Porém, tal fato é conflitante com alguns resultados discutidos previamente, visto que os filmes de Langmuir foram afetados, assim com as medidas de BAM e os espectros de PM-IRRAS. Entretanto, um fator chave discutido nos parágrafos anteriores é o efeito da concentração nas GUVs. Na análise realizada na Figura 39, a concentração total é composta por metade das moléculas de AMX e metade de AM, sendo assim, a concentração efetiva de cada um dos poluentes é menor do que as utilizadas nos experimentos aplicados separadamente. Tendo em vista esta questão, foram realizadas medidas com uma solução estoque que continha o dobro de AMX e AM, para que se

pudesse comparar os resultados com os poluentes separados. Na Figura 40 são apresentadas as medidas de microscopia de contraste de fase para a MIX com as concentrações com os valores dobrados em relação ao experimento anterior. No entanto, os mesmos resultados foram obtidos, ou seja, a MIX não causa efeitos aparentes na morfologia das GUVs de DPPC.

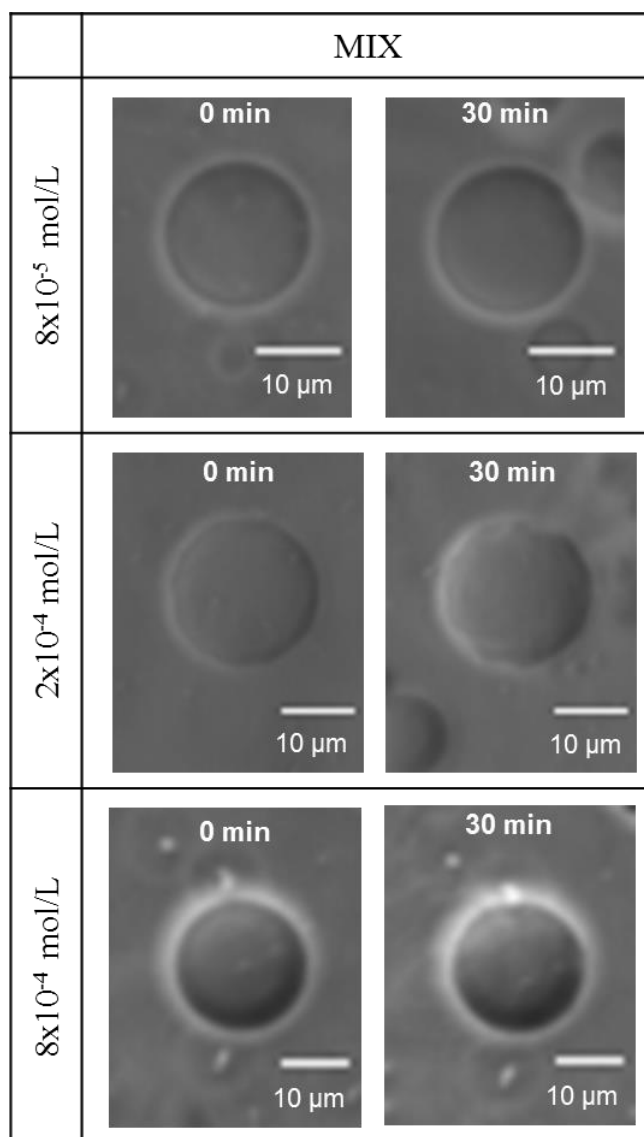


Figura 40: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC para a MIX nas concentrações de 8×10^{-5} , 2×10^{-4} e 8×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Nas Figuras 41, 42 e 43 são apresentadas as imagens obtidas para a microscopia de contraste de fase para as GUVs de DOPC em temperatura ambiente ($23 \text{ }^\circ\text{C}$), na

presença da AMX, AM e MIX em três diferentes concentrações 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L.

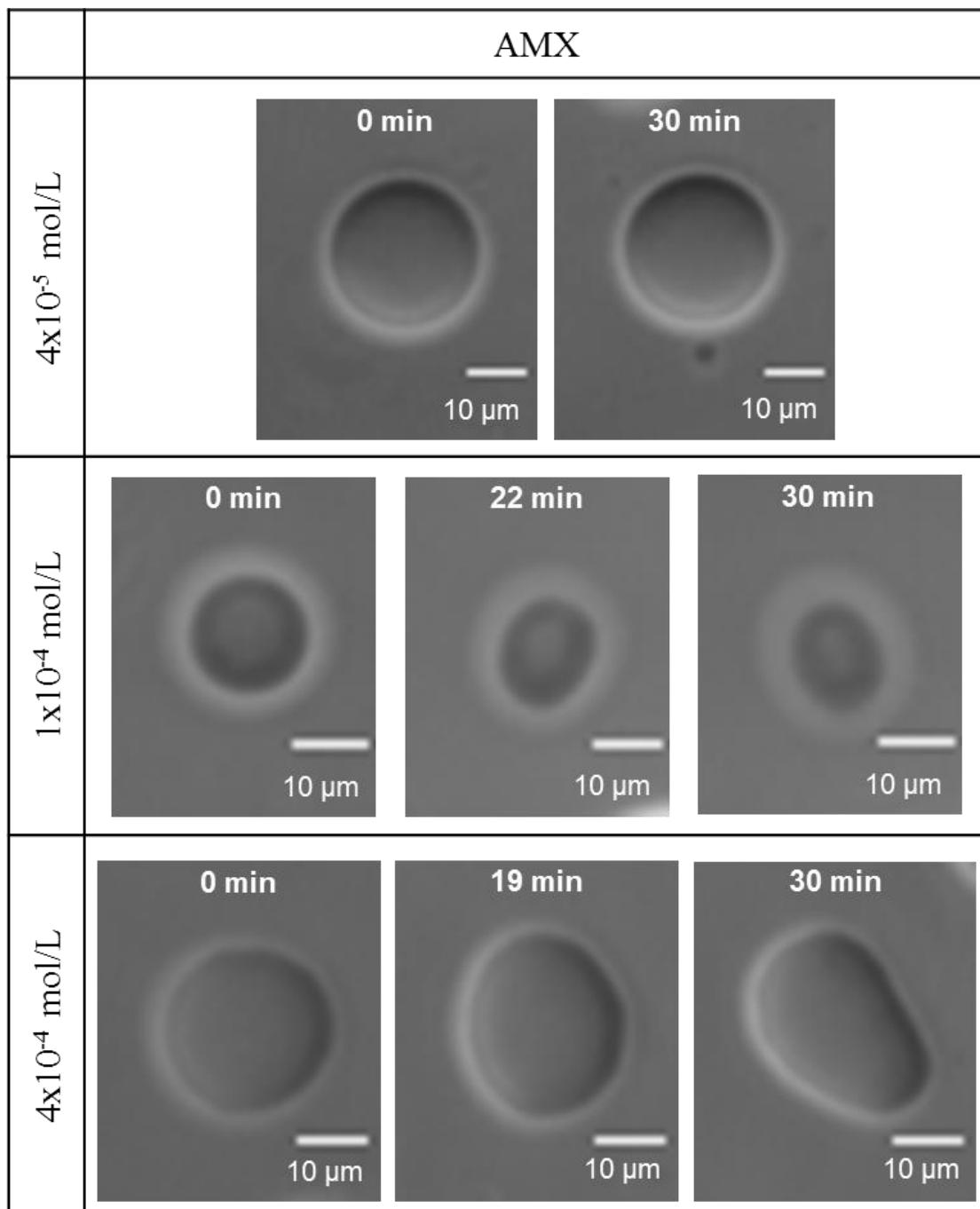


Figura 41: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente AMX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

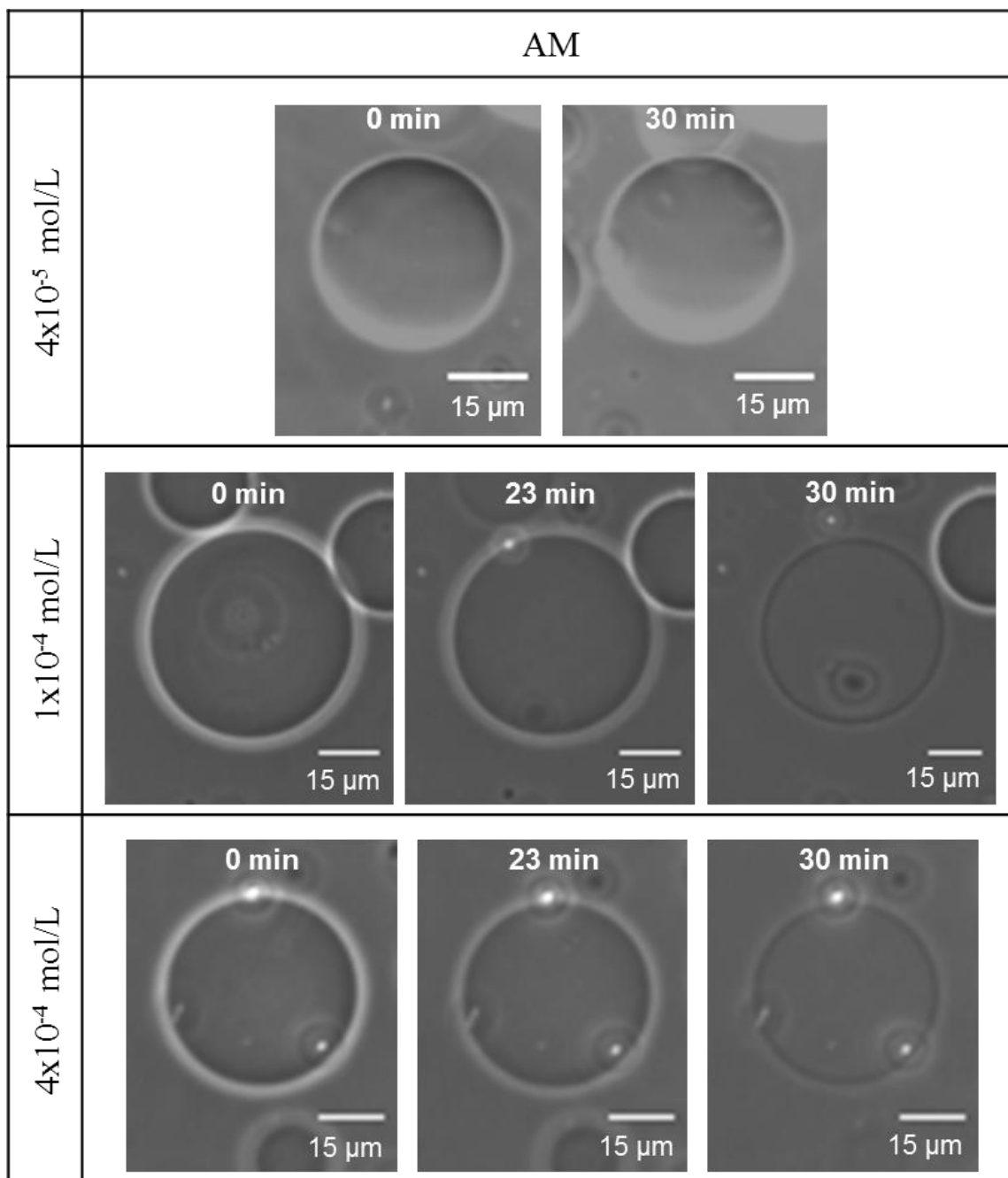


Figura 42: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente AM nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

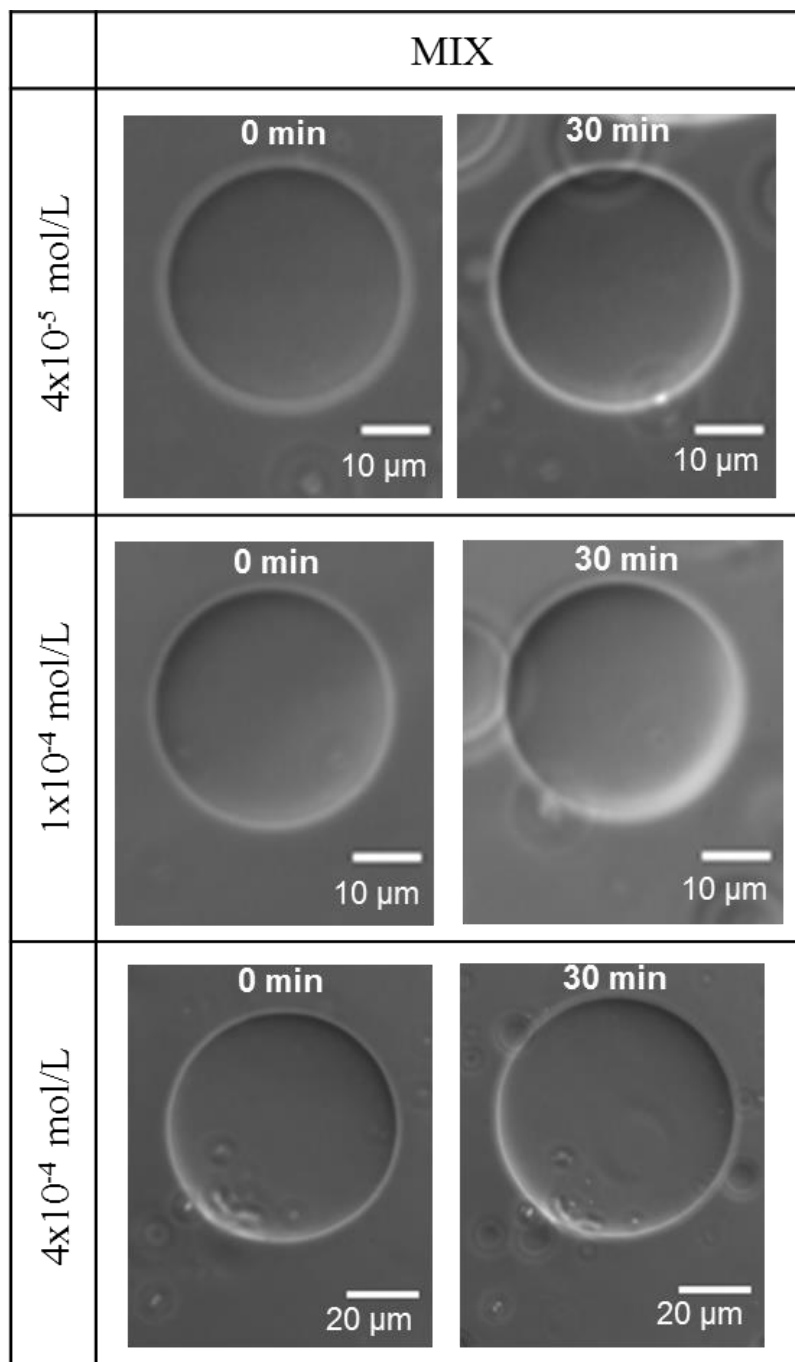


Figura 43: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC do poluente MIX nas concentrações de 4×10^{-5} , 1×10^{-4} e 4×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Nota-se que as GUVs de DOPC apresentaram o formato esférico característico, como normalmente é reportado na literatura [111]. Para as GUVs colocadas na presença da AMX, percebe-se que para a menor concentração (4×10^{-5} mol/L) as vesículas não são afetadas. Entretanto, conforme se aumenta a concentração para 1×10^{-4} mol/L, um efeito

chamado “formato de pera” (do inglês *pear shape*) começa a ser observado [37, 112] após 22 minutos da adição do poluente, e cerca de 19 minutos para a concentração de 4×10^{-4} mol/L. Tal efeito causa uma instabilidade no formato da vesícula (que antes era esférica), que passa a variar constantemente como pode ser observado na Figura 41 para as duas maiores concentrações da AMX. Apesar da instabilidade do formato, as vesículas não apresentaram perda do contraste de fase. Estes resultados são consistentes com os espectros de PM-IRRAS, visto que foram observadas mudanças nas intensidades relativas dos grupos de CH_2 (Figura 27). O seja, o formato pera foi induzido pela presença da AMX, devido a desordem causada pelo poluente na região das cadeias.

Na Tabela 8 é apresentada uma análise quantitativa das GUVs de DOPC na presença da AMX após 30 min para a concentração mais alta (4×10^{-4} mol/L), relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas. Um fator interessante a ser notado é que a maior porcentagem das GUVs afetadas pela presença da AMX são as vesículas de tamanho intermediário, cerca de 61,4%, diferentemente do que foi notado para as GUVs de DPPC em AM.

Tabela 8: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AMX após o intervalo de 30 min.

GUVs DOPC em Amoxicilina			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (formato de pera)	Porcentagem (%)
< 10 μm	236	59	25
10 e 30 μm	57	35	61,4
> 30 μm	14	7	50
Geral	307	101	32,9

Assim como para as GUVs de DPPC, a presença do AM nas vesículas de DOPC causaram a perda do contraste de fase. Contudo, somente a partir de 1×10^{-4} mol/L que as GUVs passam a ser afetadas pelo poluente. Após pouco mais de 20 minutos inicia-se a

troca entre os meios internos e externos da GUVs, devido ao aumento dos poros da vesícula causado pelo AM. Tal efeito é consistente com os resultados de PM-IRRAS, que mostram uma inversão da banda do grupo CH_2 para valores negativos (Figura 27 (a)), indicando uma desorganização nas caudas do fosfolípido. Contudo, a quantidade de GUVs afetadas depende do tamanho, como pode ser observado na análise quantitativa realizada na Tabela 7.

No trabalho de Mertins *et al.* [29] são utilizadas GUVs de DOPC na presença de AM para estudos de fotoirradiação. Um resultado semelhante ao deste trabalho foi observado, sendo que as GUVs também perderam o contraste após cerca de 2 min, porém, neste caso, é evidente que este efeito é causado pela foto-oxidação. Entretanto, a concentração utilizada (na ordem de μM) é menor que a utilizada neste trabalho, visto que as GUVs foram afetadas mais rapidamente em uma concentração maior. Apesar disso, no trabalho de Caetano *et al.* [28], GUVs de DOPC também são fotoirradiadas, porém em uma concentração maior ($50 \mu\text{M}$). O AM se mostrou mais afetivo na destruição das GUVs de DOPC, visto que em menos de 3 minutos grande parte foi destruída.

Na Tabela 9 é apresentada uma análise quantitativa das GUVs de DOPC na presença da AM após 30 min para a concentração mais alta ($4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas. Igualmente para as GUVs de DPPC, nota-se uma dependência com o tamanho das vesículas. Para as GUVs com diâmetros menores que $10 \mu\text{m}$ cerca de 38 % são afetadas, entre 10 e $30 \mu\text{m}$ cerca de 67,1 % perdem o contraste, e para maiores de $30 \mu\text{m}$ 70 % são afetadas. Assim, pode-se concluir que quanto maior o diâmetro da GUV (tamanho), maior a porcentagem de vesículas afetadas, destacando-se uma dependência do tamanho. Destacando que, o aumento da rigidez observada nas análises de LAURDAN-GP das LUVs de DOPC não

está ligado com a permeabilidade das vesículas. Logo, é possível que ocorra tal efeito da perda de contraste mesmo como as bicamadas mais rígidas.

Tabela 9: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 4×10^{-4} mol/L de AM após o intervalo de 30 min.

GUVs DOPC em Azul de Metileno			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (perda de contraste)	Porcentagem (%)
< 10 μm	150	57	38
10 e 30 μm	70	47	67,1
> 30 μm	10	7	70
Geral	230	111	48,3

Para a MIX observou-se resultados semelhante ao das GUVs de DPPC, visto que as vesículas de DOPC não demonstraram efeitos aparentes por nenhuma concentração. Porém, tal resultado é contrário aos discutido nas seções anteriores, visto que os filmes de Langmuir tiveram os maiores deslocamentos, as imagens BAM apresentaram uma morfologia diferente, ocorreram algumas mudanças no espectro de PM-IRRAS na presença da MIX. Entretanto, presume-se que a mistura dos poluentes forme um aduto que não cause um efeito aparente na bicamada lipídica das GUVs, mas cause certa mudança em monocamadas lipídicas.

Assim como para o DPPC, foram realizadas medidas para verificar se o aumento da concentração da mistura dos poluentes afeta as GUVs de DOPC. Na Figura 44 são apresentadas as medidas de microscopia de contraste de fase para a MIX com as concentrações com os valores dobrados em relação ao experimento anterior. Observa-se que para as duas primeiras concentrações a GUVs não foram afetadas pelo aumento da concentração, porém na concentração de 8×10^{-4} mol/L nota-se que após 7 min a vesícula começa a perder o contraste de fase, apesar de permanecer intacta após 30 min.

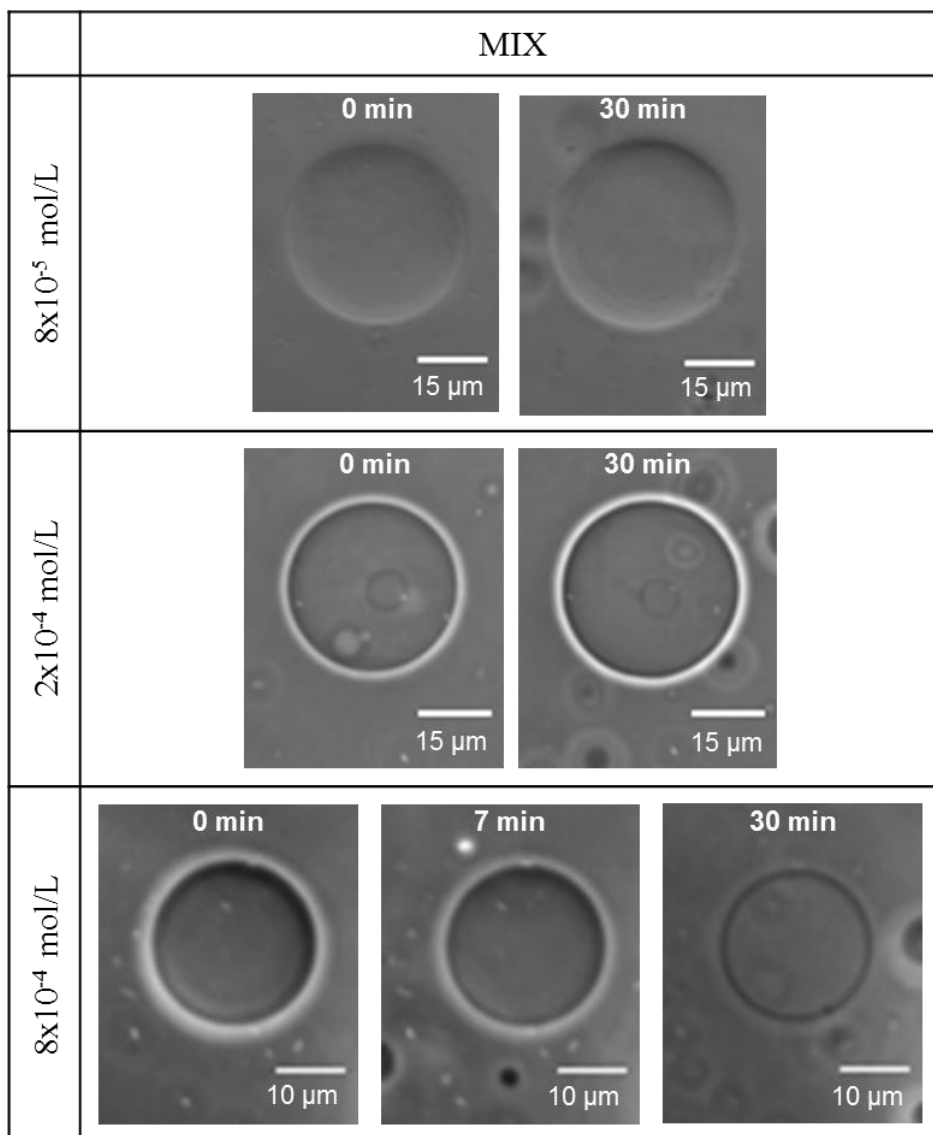


Figura 44: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC para a MIX nas concentrações de 8×10^{-5} , 2×10^{-4} e 8×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Na Tabela 10 é apresentada a análise quantitativa das GUVs de DOPC na presença da MIX após 30 min para a concentração mais alta (8×10^{-4} mol/L), relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas. Nota-se que, assim como os resultados obtidos para o AM, a porcentagem de GUVs afetadas depende do diâmetro (tamanho), visto que 76,5 % das vesículas maiores que 30 μm apresentaram a perda do contraste de fase. O que mostra que nesta concentração a quantidade de

vesículas afetadas pela presença do poluente depende do tamanho, ou seja, o raio de curvatura da GUV.

Tabela 10: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC na presença de 8×10^{-4} mol/L da MIX após o intervalo de 30 min.

GUVs DOPC em Mistura			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (perda de contraste)	Porcentagem (%)
< 10 μm	186	41	22,0
10 e 30 μm	82	42	51,2
> 30 μm	17	13	76,5
Geral	285	96	33,7

Capítulo 6

Conclusões

Capítulo 6 – Conclusões

Os modelos-simples de membrana empregados neste estudo mostraram que os poluentes afetam de várias maneiras os fosfolipídios DPPC e DOPC, tanto as monocamadas dos filmes de Langmuir, quanto as bicamadas das GUVs. As isotermas π -A mostraram que a compressão da monocamada expulsa os poluentes da interface ar-água conforme a fase condensada é atingida, enquanto o DOPC permitiu o AM permanecer na interface ar-água, permeando parte da monocamada. Entretanto, para ambos os fosfolipídios a mistura dos poluentes mostrou ser mais efetiva nos deslocamentos das isotermas π -A para maiores áreas, sugerindo uma ação potencializadora da mistura sobre as monocamadas lipídicas. As análises da elasticidade da monocamada mostraram um pequeno aumento da fluidez para os filmes de DPPC na presença dos poluentes, porém tal fato não foi observado para o DOPC, que naturalmente é mais fluido do que o DPPC.

Nas imagens de BAM, o DPPC apresentou mudanças na formação dos domínios lipídicos, alterando a morfologia de “trevo”, tradicional da monocamada, sendo este efeito mais significativa para o AM e a MIX. O DOPC apresentou a formação de domínios lipídicos característicos do lipídio em subfase aquosa, porém, após inserção dos poluentes, não se observou a formação de qualquer domínio lipídico, mesmo nas pressões mais altas. Isso sugere que o DOPC é mais afetado pela presença dos poluentes, em concordância com os efeitos observado nas isotermas π -A.

Os espectros PM-IRRAS revelaram que o DPPC foi menos afetado pela presença dos poluentes se comparado ao DOPC. Foram observadas mudanças principalmente nos grupos onde podem ocorrer principalmente interações eletrostáticas, i.e., o grupo colina e fosfato no caso da AMX e o grupo fosfato no caso do AM. Ainda, foi observada alguma desordem na região das caudas, evidenciadas pela variação na intensidade relativa das

bandas de vibração dos grupos simétricos e antissimétricos do CH₂. O DOPC apresentou mudanças mais significativas, visto que para a AMX e AM diversos deslocamentos de banda foram observados, inclusive para grupos que deveriam apresentar repulsão entre si, i.e., como o grupo colina para o AM, indicando que alguma interação química provavelmente está ocorrendo. Ainda, é observada uma mudança significativa na região da cauda por parte do AM e a MIX, revelada pela inversão da banda simétrica do CH₂ normalmente positiva para valores negativos, o que sugere uma desordem na região da cauda do lipídio. A MIX dos poluentes apresentou mudanças para ambos os lipídios, principalmente nos grupos fosfato e carbonila, indicando alguma interação entre estes grupos e a MIX. As diferenças nas interações dos lipídios ocorreram devido as insaturações nas caudas do DOPC, pois tal conformação concede a monocamada uma maior fluidez, se comparada a rigidez do DPPC.

No entanto, quando se trata de bicamadas lipídicas, os resultados diferiram dos obtidos para as monocamadas, pois as análises de LAURDAN-GP revelaram um aumento da rigidez, ao contrário do observado para as monocamadas via módulo compressional. E ainda, a mistura dos poluentes que havia se mostrado como a subfase que mais influenciava nas monocamadas, não se mostrou tão efetiva nas GUVs, pois somente em concentração da ordem de 8×10^{-4} mol/L é que começou a se observar algum efeito. Porém, a respeito dos poluentes aplicados individualmente os resultados foram mais significativos, pois o AM causou a perda do contraste de fase em cerca de 47,8 % das GUVs de DPPC e cerca de 48,3 % para as de DOPC. Já a AMX ocasionou uma instabilidade nas GUVs de DOPC, gerando o chamado “formato pera”, em cerca de 33 % de todas as GUVs analisadas

De forma geral, conclui-se que o DPPC é mais estável à presença dos poluentes devido a sua cauda ser saturada. Já o DOPC, devido as suas insaturações, se mostra mais

suscetível à presença dos poluentes AMX e AM, assim como a mistura de ambos. Em relação à mistura, os resultados de FTIR revelaram que ocorre a formação de um aduto entre AMX e AM, provavelmente entre o grupo β -lactamase da AMX e a amina do AM. Esse aduto formado entre AMX+AM, o qual denominamos MIX, causou mudanças significativas nas monocamadas para ambos os fosfolipídios, porém, não mostrou efeitos significativos nas bicamadas.

Contudo, as diferenças observadas entre os resultados das monocamadas e bicamadas estão ligadas às diferenças estruturais e de formação que tais modelos assumem, pois nas monocamadas os lipídios já estavam expostos aos poluentes antes do empacotamento das moléculas, o que sem dúvida afeta o resultado. Soma-se o fato de se tratar de uma conformação plana e de apenas uma camada lipídica. Já no caso das bicamadas, estas já estavam formadas quando expostas ao poluente, além de possuírem duas camadas lipídicas e uma estrutura esférica (raio de curvatura), que certamente influenciam nos resultados. Logo, presume-se que as monocamadas são mais afetadas pela presença do poluente devido a MIX já estar contida na subfase antes da monocamada atingir a fase condensada, enquanto as GUVs já estavam formadas antes de exposição aos poluentes.

Portanto, este trabalho mostra a importância do estudo dos efeitos dos poluentes e suas misturas em modelos de membrana, para a construção de um conhecimento que possa ser comparado com estudo em *in-vitro* ou *in-vivo*, podendo assim entender melhor os efeitos de tais compostos na saúde humana. Sendo necessário a realização de mais estudos envolvendo poluente e suas misturas, justamente para se preencher a lacuna de conhecimento desta área.

Referências

Referências

- [1] SIDDIQUE, S.; KUBWABO, C.; HARRIS, S. A. A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women, **Emerg. Contam.**, 2, 204–219, 2016.
- [2] TYLER, C. R.; JOBLING, S. Roach, sex, and gender-bending chemicals: The feminization of wild fish in English rivers. **Bio Science**, 58, 1051-1059, 2008.
- [3] TYLER, C. R.; ROUTLEDGE, E. J., Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. **Pure & Appl. Chem.**, 70, 1795-1804, 1998.
- [4] ALVES, A. et al. Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential. **Anal Bioanal Chem**, 406, 4063–4088, 2014.
- [5] MURRAY, K. E.; THOMAS, S. M.; BODOUR A. A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, 158, 3462-3471, 2010.
- [6] SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Diagnóstico dos serviços de Água e Esgotos**. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/Diagnostico_AE2014.pdf . Acessado em 20/03/18
- [7] GONÇALVES, E. S., **Revista de Química Industrial**, 738, 4-13, 2013. Disponível em: www.abq.org.br/rqi/dl.php?arquivo=2013/738/RQI-738.pdf. Acessado em 20/03/18.
- [8] GÁGNE, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64, 329–336, 2006.
- [9] METCALFE, C. D. et al. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22, 2872–2880, 2003.
- [10] SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, 68, 369–392, 2004.
- [11] IMS INSTITUTE. **The Global Use of Medicines: Outlook Through 2016**. Disponível em: https://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Reports/The%20Global%20Use%20of%20Medicines%20Outlook%20Through%202016/Medicines_Outlook_Through_2016_Report.pdf Acessado em 20/03/18.
- [12] THE CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY. **The State of World's Antibiotics 2015**. Disponível em: https://cddep.org/sites/default/files/swa_2015_final.pdf. Acessado em 20/03/18.

- [13] ANVISA. **Bula do Medicamento Amoxicilina (Medley)**. Disponível no link: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7167972015&pIdAnexo=2795143. Acessado em 20/03/18.
- [14] SCARCELA, A. M. A.; MUNIZ, J. W. A.; CIRQUEIRA, J. Z. Investigação do uso indiscriminado de amoxicilina em crianças na faixa etária de 2 a 10 anos. **Cenarium Phamacêutico**, 4, 4, 2011.
- [15] ANVISA. **Bula do Medicamento Amoxicilina (Neo Química)**. Disponível no link: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=24623972016&pIdAnexo=3999814. Acessado em 20/03/18.
- [16] JI, W. et al. Quantitative analysis of amoxicillin residues in foods by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, 47, 451–457, 2014.
- [17] NASCIMENTO, T. S. et al. Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Rev. Bras. Anestesiologia**, 58, 651-664, 2008.
- [18] TAWFIK, A. A. et al. A study of the treatment of cutaneous fungal infection in animal model using photoactivated composite of methylene blue and gold nanoparticle. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 15, 59–69, 2016.
- [19] ZAKARIA, A.; HAMDI, N.; ABDEL-KADER, M. R. Methylene blue improves brain mitochondrial ABAD functions and decreases A β in a neuroinflammatory Alzheimer's disease mouse model. **Mol Neurobio**, 53, 1220–1228, 2016.
- [20] XU, Y. J. et al. Simultaneous Determination of Malachite Green, Crystal Violet, Methylene blue and the Metabolite Residues in Aquatic Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, 50, 591-597, 2012.
- [21] LI, C. et al. Analysis of trace methylene blue in fish muscles using ultra-sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. **Food Control**, 65, 99-105, 2016.
- [22] MUTHURAMAN, G.; TENG, T. T. Extraction and recovery of rhodamine B, methyl violet and methylene blue from industrial wastewater using D2EHPA as an extractant. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 15, 841-846, 2009.
- [23] RAZMARA, R. S.; DANESHFAR, A.; SAHRAI, R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid–liquid extraction. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 17, 533-536, 2011.
- [24] HUANG, J. ET al. Evaluation of micellar enhanced ultrafiltration for removing methylene blue and cadmium ion simultaneously with mixed surfactants. **Separation and Purification Technology**, 125, 83–89, 2014.
- [25] HEINBURG, T., **Thermal Biophysics of Membranes**, Berlin, Wiley-VCH, 2007.

- [26] AOKI, P. H. B. et al. Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems. **Vibrational Spectroscopy**, 54, 93–102, 2010.
- [27] AOKI, P. H. B. et al. Taking Advantage of Electrostatic Interactions To Grow Langmuir–Blodgett Films Containing Multilayers of the Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylglycerol. **Langmuir**, 25, 13062–13070, 2009.
- [28] CAETANO, W. et al. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. **Langmuir**, 23, 1307-1314, 2007.
- [29] MERTINS, O. et al. Physical damage on giant vesicles membrane as a result of methylene blue photoirradiation. **Biophysical Journal**, 106, 162–171, 2014.
- [30] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Information Sheet: Pharmaceuticals in Drinking-water**. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases-risks/risks/info_sheet_pharmaceuticals/en/. Acessado em 20/03/18.
- [31] SEZGIN, E.; SCHWILLE, P. Model membrane platforms to study protein-membrane interactions. **Molecular Membrane Biology**, 29, 144–154, 2012.
- [32] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, 175, 720–731, 1972.
- [33] MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1286, 183-223, 1996.
- [34] LIPOWSKI, R.; SACKMANN, E., **Handbook of Biological Physics**, Amsterdam, Elsevier, 1995.
- [35] VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, 124, 5-8, 2011.
- [36] GONG, Y. K.; WINNIK, F. M. Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, 4, 360-368, 2012.
- [37] MOURITSEN, O. G., **Life - As a Matter of Fat**, New York, Spinger, 2005.
- [38] BHATIA, T. et al. Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1848, 3175–3180, 2015.
- [39] JURAK, M. et al. Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin. **Advances in Colloid and Interface Science**, 222, 385–397, 2015.
- [40] MIÑONES JR. et al. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes—A Langmuir monolayer study. **Biophysical Chemistry**, 140, 69–77, 2009.

- [41] BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. **Mutation Research**, 608, 157–162, 2006.
- [42] HIDALGO, A. A. et al. Interaction of two phenothiazine derivatives with phospholipid monolayers. **Biophysical Chemistry**, 109, 85-104, 2004.
- [43] JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 36, 87-93, 1996.
- [44] RAMU, A.; RAMU, N. Reversal of multidrug resistance by phenothiazines and structurally related compounds. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 30, 165-173, 1992.
- [45] RICCHELLI, F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 29, 109-118, 1995.
- [46] LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of The American Chemical Society**, 39, 1848-1906, 1917.
- [47] PETTY, M.C. **Langmuir-Blodgett Films – an Introduction**, Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
- [48] PENG, J.B.; BARNES, G.T.; GENTLE, I.R. The structures of Langmuir–Blodgett films of fatty acids and their salts. **Advances in Colloid and Interface Science**, 91, 163-219, 2001.
- [49] DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K., **Interfacial Phenomena**. New York, Academic Press, 1963.
- [50] HÉNON, S.; MEUNIER, J. Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. **Review of Scientific Instruments**, 62, 936-939, 1991.
- [51] HÖNIG, D.; MÖBIUS D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, 95, 4590-4592, 1991.
- [52] BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; TURLET, J. M. Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films: experimental procedure and quantitative analysis. **Applied Spectroscopy**, 45, 380-389, 1991.
- [53] GREENLER, R. G. Infrared study of adsorbed molecules on metal surfaces by reflection techniques. **Journal of Chemical Physics**, 44, 310-315, 1966.

- [54] BLAUDEZ, D. et al. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, 47, 869-874, 1993.
- [55] MENDELSON, R.; BRAUNER, J. W.; GERICKE, A. External infrared reflection absorption spectrometry of monolayer films at the air-water interface. **Annual Reviews Physics Chemistry**, 46, 305-34, 1995.
- [56] ZHENG, J.; LEBLANC, R. M. Infrared Reflection Absorption Spectroscopy of Monolayers at the Air–Water Interface. **Interface Science and Technology**, 14, 247-276, 2007.
- [57] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**, Toronto, Brooks Cole, 2006.
- [58] AROCA, R., **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**, Chichester, Wiley, 2006.
- [59] HABEL, J. et al. How molecular internal-geometric parameters affect PB-PEO polymersome size in aqueous solution. **Journal of Polymer Science**, 54, 699–708, 2016.
- [60] SCHAAR, V. et al. Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β -lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. **J Antimicrob Chemother**, 69, 117–120, 2014.
- [61] BALDACCHINI, T. et al. **Laser 3D Manufacturing II**, 9353, 1-14, 2015.
- [62] DUA, J. S.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. Liposome: methods of preparation and applications. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, 3, 14-20, 2012.
- [63] ANGELOVA, M. I.; DIMITROV, D. S. Liposome electroformation. **Faraday Discussions**, 81, 303-311, 1986.
- [64] DU, H. et al. Astaxanthin protecting membrane integrity against photosensitized oxidation through synergism with other carotenoids. **J. Agric. Food Chem**, 63, 9124–9130, 2015.
- [65] MONIRUZZAMAN, M. et al. Antimicrobial peptide lactoferricin B-induced rapid leakage of internal contents from single giant unilamellar vesicles. **Biochemistry**, 54, 5802–5814, 2015.
- [66] KOLESINSKA, B. et al. Interaction of β^3/β^2 -Peptides, Consisting of Val-Ala-Leu Segments, with POPC Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) and White Blood Cancer Cells (U937) – A New Type of Cell-Penetrating Peptides, and a Surprising Chain-Length Dependence of Their Vesicle- and Cell-Lysing Activity. **Chemistry & Biodiversity**, 12, 697-732, 2015.
- [67] ISRAELCHIVILI, J. N., **Intermolecular and Surface Forces**, London, Academic Press, 1992.

- [68] SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Química Nova**, 25., 1181-1185, 2002.
- [69] KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1376, 91–145, 1998.
- [70] SANCHEZ, S. et al. Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope. **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, 1007–1014, 2007.
- [71] SANCHEZ, S.; TRICERRI, M.; GRATTON, E. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 109, 7314–7319, 2012.
- [72] DE VEQUI-SUPLICY, C. C.; BENATTI, C. R.; LAMY, M. T. Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity. **Journal of Fluorescence**, 16, 431–439, 2006.
- [73] BAGATOLLI, L. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. **Biochim. Biophys. Acta – Biomembrane**, 1758, 1541–1556, 2006.
- [74] GOODMAN, J. W., **Introduction to Fourier Optics**, New York, McGraw-Hill International Editions, 1996.
- [75] OLYMPUS. **Introduction to phase contrast**. Disponível em: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html>. Acessado em 20/03/18.
- [76] NIKON MICROSCOPYU. **Introduction to Phase Contrast Microscopy**, Disponível em: <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>. Acessado em 20/03/18.
- [77] HECHT, E., **Optics**, New York, Addison-Wesley Publishing Company, Inc, 2002.
- [78] RUIZ, G. C. M. et al. Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. **Material Science and Engineering C**, 77, 102-110, 2017.
- [79] STUNGES, G. M. et al. Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: The role of charged headgroups. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 158, 627–633, 2017.
- [80] LOPES, D. et al. Proof of pore formation and biophysical perturbations through a 2D amoxicillin-lipid membrane interaction approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1859, 803-812, 2017.
- [81] EL-SHAHAT, M. F.; BURHAM, N.; ABDEL AZEEM, S. M. Flow injection analysis–solid phase extraction (FIA–SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam, **Journal of Hazardous Material**, 177, 1054-1060, 2010.

- [82] PAZIN, W. M. et al. Interaction of Artepillin C with model membranes. **European Biophysics Journal**, 46, 383–393, 2017.
- [83] KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; JÁNCZYK, A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. **Biomacromolecules**, 12, 4144–4152, 2011.
- [84] WANG, Z.; YANG, S. Effects of fullerenes on phospholipid membranes: A langmuir monolayer study. **Chem.Phys. Chem.**, 10, 2284 – 2289, 2009.
- [85] SANVER, D. et al. Experimental Modeling of Flavonoid–Biomembrane Interactions. **Langmuir**, 32, 13234-13243, 2016.
- [86] MATAR, G.; BESSON, F. Influence of the lipid composition of biomimetic monolayers on the structure and orientation of the gp41 tryptophan-rich peptide from HIV-1. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1808, 2534–2543, 2011.
- [87] SCHIMDT, T. F. et al. Binding of methylene blue onto Langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. **Langmuir**, 31, 4205-4212, 2015.
- [88] AOKI, P. H. B. **Sistemas bioinspirados aplicados no estudo de interação e sensoriamento de derivados xantêmicos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciência e Tecnologia – UNESP, Presidente Prudente, 2011.
- [89] HAC-WYDRO, K. et al. The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, 150, 22–34, 2007.
- [90] MARIANI, N. E.; SÁNCHEZ-BORZONE, M. E.; GARCÍA, D. A. Effects of bioactive monoterpenic ketones on membrane organization. A langmuir film study. **Chemistry and Physics of Lipids**, 198, 39-45, 2016.
- [91] MIÑONES JR, J. et al. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes—A Langmuir monolayer study. **Biophysical Chemistry**, 140, 69–77, 2009.
- [92] JAGODA, A. et al. Head Group Influence on Lipid Interactions With a Polyhydroxyalkanoate Biopolymer. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 213, 1922–1932, 2012.
- [93] AOKI, P. H. B. et al. Molecular-level modifications induced by photo-oxidation of lipid monolayers interacting with erythrosine. **Langmuir**, 32, 3766-3773, 2016.
- [94] PAVINATTO, A. et al. Experimental evidence for the mode of action based on electrostatic and hydrophobic forces to explain interaction between chitosans and phospholipid Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 145, 201–207, 2016.

- [95] GERALDO, V. P. N. et al. Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids. **Chemical Physics Letters**, 559, 99–106, 2013.
- [96] LEVIN, I. W. et al. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers, **Biochemistry**, 24, 6282–6286, 1985.
- [97] GOTO, T. E.; CASELI, L. The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, 431, 24–30, 2014.
- [98] CASELI, L. et al. An intraocular dye solution based on lutein and zeaxanthin in a surrogate internal limiting membrane model: a Langmuir monolayer study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 107, 124–129, 2013.
- [99] LOPEZ, R. F. et al. Effect of carrageenans of different chemical structures in biointerfaces: a Langmuir film study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 111, 530–535, 2013.
- [100] BISSON-BOUTELLIEZ, C. et al. Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin β -cyclodextrin complexes. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, 11, 574–581, 2010.
- [101] SHURVELL, H. S., **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, John Wiley, 2006.
- [102] BEBU, A. et al. IR, Raman, SERS and DFT study of amoxicillin. **Journal of Molecular Structure**, 993, 52–56, 2011.
- [103] OKAMURA, E.; UMEMURA, J.; TAKENAKA, T. Orientation studies of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers by polarized FTIR-ATR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1025, 94–98, 1990.
- [104] KAMATA, T.; UMEMURA, J.; TAKENAKA, T. Fourier transform-infrared spectra and molecular orientation in thin Langmuir–Blodgett films of dodecyloxyphenylpyrazine carboxylic acid and its barium salt. **Journal of Molecular Structure**, 240, 187–199, 1990.
- [105] PARASASSI, T. et al. Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. **Journal of Fluorescence**, 8, 365–373, 1998.
- [106] PARASASSI, T. et al. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. **Biophys. J. Biophysical Society**, 60, 179–189, 1991.
- [107] PARASASSI, T. et al. Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. **Biophysical Journal**, 72, 2413–2429, 1997.
- [108] NIELSEN, S. B.; OTZEN, D. E. Impact of the antimicrobial peptide Novicidin on membrane structure and integrity. **Journal of Colloid and Interface Science**, 345, 248–256, 2010.

[109] FRANKE, T. et al. Phase transition induced adhesion of giant unilamellar vesicles. **ChemPhysChem**, 10, 2858–2861, 2009.

[110] LEE, M. et al. Process of inducing pores in membranes by melittin. **PNAS**, 110, 14243-14248, 2013.

[111] KERDOUS, R.; HEUVINGH, J.; BONNEAU, S. Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: shape transitions and permeabilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1808, 2965–2972, 2011.

[112] YANAGISAWA, M.; IMAI, M.; TANIGUCHI, T. Shape deformation of ternary vesicles coupled with phase separation. **Physical Review Letters**, 100, 148102(1)-148102(4), 2008.