

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

**Estudo da interação de disruptores do sistema endócrino e
modelos de membrana biológica**

Presidente Prudente/SP

2023

Mateus Dassie Maximino

Estudo da interação de disruptores do sistema endócrino e modelos de
membrana biológica

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor 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

2023

M464e Maximino, Mateus Dassie
Estudo da interação de disruptores do sistema endócrino e modelos de membrana biológica / Mateus Dassie Maximino. -- Presidente Prudente, 2023
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente
Orientadora: Priscila Aléssio Constantino

1. disruptores endócrinos. 2. mistura de poluentes. 3. filmes de Langmuir. 4. vesículas unilamelares gigantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

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

Aos 05 dias do mês de maio do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de MATEUS DASSIE MAXIMINO, intitulada **Estudo da interação de disruptores do sistema endócrino e modelos de membrana biológica**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. AMANDO SIUITI ITO (Participação Virtual) do(a) Centro de Engenharia, Modelagem, e Ciências Humanas / Universidade Federal do ABC- Santo André, Prof. Dr. LUCIANO CASELI (Participação Virtual) do(a) Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema, Profa. Dra. ANA PAULA RAMOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade de São Paulo (USP) - FFCLRP, Prof. Dr. WALLANCE MOREIRA PAZIN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Universidade Estadual Paulista (UNESP). Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO
Data: 08/05/2023 09:25:18-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO

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.

Também gostaria de agradecer aos colegas de grupo, pois na vida a maior parte das coisas não se alcança sozinho. A princípio gostaria de agradecer ao Luis Fernando, que juntos compartilhamos um lar, todos os bons momentos que compartilhamos no período que vivemos juntos, ajudando e tolerando um ao outro. Também gostaria de agradecer ao pessoal mais experiente do laboratório, a “velha guarda”. Se possível escreveria um parágrafo para cada um deles, pois todos foram muito importantes na minha jornada. Gostaria de agradecer ao Leonardo, Rafael, Gilia, Wallance, Diego, Jaqueline, Tibebe e Marcelo, tenho todos você em meu coração. Agradeço também ao pessoal que, apesar de eu não tanto contato ainda, me ajudaram de uma forma ou de outra, Celina, Grazi e Guilherme.

Gostaria também de agradecer aos alunos de IC, mestrado e doutorado da Priscila, que sem dúvida foram as pessoas com quem eu mais interagi nestes últimos anos Henry, Carla, Carol, Cristiano, Victória, Vitória, Felipe e Melina. Espero, apesar de minha demora em responder mensagens, ter ajudado de alguma forma ou de outra.

Gostaria de agradecer ao Casé, que apesar não ser mais o meu orientador, sem dúvida me serviu como exemplo de pessoa e conduta não só na pesquisa, como na vida.

Em especial gostaria de agradecer a Cibely, que em todos esses anos me aguentou, respondendo minhas perguntas e dúvidas. Me ajudando a melhorar em todas as minhas deficiências. Com todo o meu coração, gostaria de agradece-la, pois ela não só uma colega de trabalho, mais sim, uma grande amiga, e agora parceira de leitura dos melhores livros.

E por fim, não tenho palavras para agradecer a Priscila, umas das pessoas mais incríveis com qual tive o prazer de conviver. Por quase dez anos me orientou, mudando a minha vida e me tornando uma pessoa melhor. Sem ela certamente não teria alcançado o que sou hoje. Muito OBRIGADO Priscila.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com financiamento de bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES-PROEX), processo nº 88882.330137/2019-01.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2021/14235-6 e nº 2018/22214-6.

"As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP".

“I love the sport; I love the feeling that it gives me. In this life, you know, you can get material wealth, you can get all sorts of things, but the real treasure I think is these feelings, and to me this is a feeling a will treasure forever.”

Devon Larratt – Canadian Arm-wrestler

MAXIMINO, M. D. **Estudo da interação de disruptores do sistema endócrino e modelos de membrana biológica**. 2023. 124f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2023.

Resumo

Todos os dias entramos em contato com os mais diferentes compostos, seja pelo ar, pela água ou pela alimentação. Dentre esses compostos estão os disruptores do sistema endócrino, que são moléculas que afetam a comunicação e funcionamento das glândulas e órgãos do sistema endócrino. No entanto, uma característica não abordada pela maioria dos estudos reside no fato de que tais compostos são encontrados na natureza misturados, ou seja, em geral não sabemos se a combinação de diferentes poluentes pode causar a potencialização de alguns efeitos. Sendo assim, nessa tese de doutorado propomos estudar a influência de mistura dos disruptores do sistema endócrino, o bisfenol A (BPA) e o 17 α -etinilestradiol (EE2) sobre modelo simples de membrana biológica. Para isso, foram utilizados dois fosfolipídios como base para no sistema o DPPC e o DOPC, sendo aplicadas diferentes variáveis durante as análises como variação do pH e temperatura. Os efeitos da mistura dos poluentes (MIX) sobre mono e bicamadas lipídicas foram avaliados utilizando diferentes métodos de caracterização como isothermas π -A, microscopia de ângulo de Brewster, PM-IRRAS, microscopia de contraste de fase e medidas de distribuição de tamanho e potencial zeta em vesículas. Na presença dos poluentes o estudo das monocamadas indicou vários efeitos, dentre eles a expansão de área nas isothermas, assim como interações entre os poluentes e a cabeça dos lipídios, que nas bicamadas foram observados efeitos como a perda no contraste de fase, flutuações, formação de protusões e aumento de tamanho. Apesar de todas essas variações, a MIX apresentou um comportamento na maior parte das vezes aditivo, ou seja, não ocorreu nenhuma potencialização de efeitos devido à mistura do BPA com o EE2.

Palavras chave: disruptores endócrinos, bisfenol A, 17 α -etinilestradiol, mistura de poluentes, filmes de Langmuir, vesículas unilamelares gigantes.

Abstract

Every day we come into contact with different compounds, whether through air, water, or food. Among those compounds are the endocrine system disruptors, which are molecules that affect the communication and function of glands and organs from the endocrine system. However, a characteristic not addressed in most studies, resides in the fact that such compounds are found in nature mixed, in other words, in general we do not know if the combination of different pollutants could cause the potentiation of some effects. Therefore, in this Ph.D. thesis, we propose studying the influence of the mixture of two endocrine disruptors, bisphenol A (BPA) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) over simple membrane models. For that, we use two phospholipids as bases for our system DPPC and DOPC, where different variables were applied during the analysis such as the variation of pH and temperature. The effects of the mixture of pollutants (MIX) over mono and bilayer systems were evaluated using different characterization methods such as pi-A isotherms, Brewster angle microscopy, PM-IRRAS, phase contrast microscopy, and size distribution and zeta potential in vesicles. In the presence of the pollutants, the monolayer studies indicated various effects, among them the expansion in the isotherms, and interaction between the pollutants and the lipid head, while in the bilayers were observed effects such as the loss of phase contrast, fluctuations, the formation of protrusions, and an increase in size. Despite all these variations, the MIX presented a behavior in most of the time additive, in other words, any potentiation occurred due to the mixture of BPA and EE2.

Keywords: endocrine disruptors, bisphenol A, 17 α -ethinylestradiol, mixture of pollutants, Langmuir films, giant unilamellar vesicles.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura molecular dos fosfolipídios DPPC e DOPC, além dos poluentes emergentes bisfenol A e 17 α -etinilestradiol nos pHs estudados.

Figura 2: Fotos dos (a) substratos de ITO e o espaçador de teflon e (b) célula de eletroformação pronta para hidratação.

Figura 3: Espectros de FTIR para os filmes *cast* para os poluentes BPA, EE2 e MIX, nos intervalos de (A) 500 à 1700 cm⁻¹ e (B) 2700 à 3600 cm⁻¹.

Figura 4: Isotermas π -A obtidas para os testes de atividade superficial das subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Todas as subfases dos poluentes foram realizadas a uma concentração de 1x10⁻⁵ mol/L.

Figura 5: Isotermas π -A obtidas para os testes de atividade superficial do BPA a uma concentração de 1x10⁻⁴ mol/L.

Figura 6: Estrutura química do BPA mostrando característica bolaamfifílica da molécula, indicado as regiões hidrofílicas (verde) e hidrofóbicas (vermelho).

Figura 7: (A) Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1x10⁻⁵ mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 8: Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1x10⁻⁵ mol/L, obtidas à temperatura ambiente para as soluções tampão de (A) citrato e (C) HEPES. Valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases nas soluções tampão de (B) citrato e (D) HEPES.

Figura 9: Variação da área molecular média na pressão de *onset*. Em detalhe os valores numéricos de cada subfase.

Figura 10: (A) Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1x10⁻⁵ mol/L, obtidas à 37 °C e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 11: Isotermas π -A de DPPC obtidas em solução aquosa, tampão citrato, tampão HEPES e à 37 °C, para as subfases (A) sem os poluentes e na presença de 1x10⁻⁵ mol/L de (B) BPA, (C) EE2 e (D) MIX.

Figura 12: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DPPC para as subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Para os sistemas em (A) água ultrapura, (B) citrato, (C) HEPES e (D) à 37 °C.

Figura 13: (A) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1x10⁻⁵ mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 14: Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à temperatura ambiente para as soluções tampão de (A) citrato e (C) HEPES. Valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases nas soluções tampão de (B) citrato e (D) HEPES.

Figura 15: (A) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à 37 °C e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Figura 16: Isotermas π -A de DOPC obtidas em solução aquosa, tampão citrato, tampão HEPES e à 37 °C, para as subfases (A) sem os poluentes e na presença de 1×10^{-5} mol/L de (B) BPA, (C) EE2 e (D) MIX.

Figura 17: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC para as subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Para os sistemas em (A) água ultrapura, (B) citrato, (C) HEPES e (D) à 37 °C.

Figura 18: Imagens de BAM para as subfases de (A) BPA, (B) EE2 e (C) MIX sem a presença do lipídio.

Figura 19: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases aquosa (A)(B)(C), BPA (D)(E)(F), EE2 (G)(H)(I) e MIX (J)(K)(L).

Figura 20: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases aquosa (A)(B)(C), BPA (D)(E)(F), EE2 (G)(H)(I) e MIX (J)(K)(L).

Figura 21: Espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosas e dos poluentes BPA, EE2 e MIX com concentração de 1×10^{-5} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.

Figura 22: (A) Espectro PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosa, BPA, EE2 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 estiramento simétrico e antissimétrico do CH₂ para cada uma das subfases estudadas.

Figura 23: Espectros PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosas e dos poluentes BPA, EE2 e MIX com concentração de 1×10^{-5} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.

Figura 24: (A) Espectro PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosa, BPA, EE2 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 estiramento simétrico e antissimétrico do CH₂ para cada uma das subfases estudadas.

Figura 25: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (A) água ultrapura e (B) BPA. As regiões circuladas em vermelho representam possíveis interações entre o BPA e os lipídios.

Figura 26: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (A) EE2 e (B) MIX. As regiões circuladas em vermelho (BPA) e azul (EE2) representam possíveis interações entre os poluentes e os lipídios.

Figura 27: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (A) água ultrapura e (B) BPA. As regiões circuladas em vermelho representam possíveis interações entre o BPA e os lipídios.

Figura 28: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (A) EE2 e (B) MIX. As regiões circuladas em vermelho (BPA) e azul (EE2) representam possíveis interações entre os poluentes e os lipídios.

Figura 29: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC para o controle e na presença de BPA, EE2 e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 30: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min.

Figura 31: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min (A) após 24 e (B) 48 horas de envelhecimento.

Figura 32: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 horas de envelhecimento.

Figura 33: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC para o controle e na presença de BPA, EE2 e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Figura 34: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min.

Figura 35: Imagens de fluorescência confocal das GUVs de DOPC na presença de 1×10^{-4} mol/L de BPA. Imagens obtidas utilizando as sondas (A) DiIC18 na bicamada lipídica e (B)(C) AlexaFluor marcando o meio exterior.

Figura 36: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min.

Figura 37: (A) Porcentagem de GUVs afetadas pela presença de 1×10^{-4} mol / L de BPA. O gráfico exibe os diferentes efeitos observados, incluindo as vesículas não afetadas, as GUVs que apresentaram processo de endocitose, budding, flutuações e vesículas com múltiplos efeitos (observação de mais de um efeito nas mesmas vesículas). Os efeitos observados também foram agrupados em tamanhos de vesículas: < 10 , entre 10 e 30 e $> 30 \mu\text{m}$. (B) Porcentagem de GUVs que apresentaram aumento de tamanho durante a análise. Análise agrupada em dois grupos de tamanho: < 30 e $> 30 \mu\text{m}$.

Figura 38: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 de envelhecimento.

Figura 39: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença do BPA e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 horas de envelhecimento.

Figura 40: (A) Distribuição de tamanho das vesículas de DPPC medidas durante um período de exposição de 60 min nas amostras aquosa, BPA, EE2 e MIX. A concentração dos poluentes foi de 1×10^{-5} mol/L e as análises foram realizadas em temperatura ambiente (~ 23 °C). (B) Tabela com os valores médios de diâmetro das LUVs e do PdI nos intervalos de 0 e 60 min.

Figura 41: (A) Distribuição de tamanho das vesículas de DOPC medidas durante um período de exposição de 60 min nas amostras aquosa, BPA, EE2 e MIX. A concentração dos poluentes foi de 1×10^{-5} mol/L e as análises foram realizadas em temperatura ambiente (~ 23 °C). (B) Tabela com os valores médios de diâmetro das LUVs e do PdI nos intervalos de 0 e 60 min.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Atribuições dos espectros FTIR para o BPA e EES

Tabela 2: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC na presença de 1×10^{-5} mol/L de EE2 e MIX após o intervalo de 30 min.

Tabela 3: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC para o controle e na presença de 1×10^{-4} mol/L de BPA após o intervalo de 30 min.

Tabela 4: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC para as amostras de 1×10^{-4} mol/L de BPA fresca e envelhecidas durante 24 e 48 horas.

Tabela 5: Valores médios de diâmetro das LUVs e do PDI para LUVs DPPC e DOPC expostas a 1×10^{-4} mol/L de BPA nos intervalos de 0 e 60 min.

Tabela 6: Valores de potencial zeta para as LUVs de DPPC e DOPC.

Tabela 7: Valores de anisotropia estática obtidos para os lipídios DPPC e DOPC para as amostras controle, BPA, EE2 e MIX (1×10^{-5} mol/L), expostas no intervalo de 60 min, utilizando a sonda NBD-PE.

Lista de Siglas

AC	Corrente Alternada
AM	Azul de Metileno
AMX	Amoxicilina
BAM	Microscopia ad ângulo de Brewster
BPA	Bisfenol A
Cs ⁻¹	Módulo Compressional
DiIC18	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DOPC	1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSE	Disruptores do Sistema Endócrino
EE2	17 α -etinilestradiol
FTIR	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
GUV	Vesículas Unilamelares Gigantes
HEPES	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
I _R	Intensidade Relativa
ITO	Óxido de Zinco Dopado com Estanho
L _{β}	Fase gel
L _{α}	Fase líquido-cristalina
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MIX	Mistura
MTT	Ensaio de Viabilidade Celular
NBD-PE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Fosfatidilcolina
PdI	Índice de polidispersão
PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
PVC	Policloreto de Vinila
R	Anisotropia de estado estacionário
SE	Sistema Endócrino
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
T _m	Temperatura de Transição de Fase
USP	Universidade de São Paulo
ΔA	Variação da Área

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	19
1.1. Poluentes Emergentes	19
1.2. Mistura de Poluentes	20
1.3. Disruptores Endócrinos	21
1.3.1. Bisfenol A	22
1.3.2. 17 α -etinilestradiol	23
1.4. Modelos de Membrana	24
Capítulo 2 – Objetivos	27
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	29
3.1. Compostos	29
3.2. Filmes de Langmuir	29
3.3. Módulo compressional	30
3.4. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	31
3.5. PM-IRRAS	31
3.6. FTIR de filmes cast	32
3.7. Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)	33
3.8. Microscopia de Contraste de Fase	34
3.9. Microscopia de Fluorescência Confocal	35
3.10. Análise Quantitativa	35
3.11. Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)	35
3.12. Medidas de Espalhamento Dinâmica de Luz (DLS) e Potencial Zeta	36
3.13. Medidas de Anisotropia	36
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	39
4.1. Interação entre os analitos – FTIR de filmes cast	39
4.2. Filmes de Langmuir	42
4.2.1. Atividade Superficial	42
4.2.2. DPPC	44
4.2.3. DOPC	57
4.3. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	66
4.4. PM-IRRAS	72
4.5. Estruturação das monocamadas	81
4.5.1. DPPC	81
4.5.2. DOPC	84
4.6. Vesículas unilamelares gigante (GUVs)	87
4.6.1. DPPC	87

4.6.2. DOPC	95
4.7. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)	106
4.7.1. DPPC	106
4.7.2. DOPC	108
4.7.3. Análises BPA concentrado	109
4.8. Potencial Zeta	110
4.9. Anisotropia do estado estacionário.....	112
Capítulo 5 - Conclusão.....	116
6. Referências.....	118

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Poluentes Emergentes

Diariamente somos expostos aos mais variados tipos de compostos, seja pelo ar que respiramos, pelos alimentos que ingerimos ou pela água que bebemos. Na maioria das vezes nem percebemos sua presença, ou mesmo pensamos a respeito. No entanto, entramos em contato com uma ampla gama de materiais, que podem parecer inofensivos aos seres humanos num curto período de tempo. Contudo, a maior parte desses poluentes nem sequer foi estudada profundamente na literatura, sendo seus efeitos colaterais ainda desconhecidos. Essa classe de compostos é chamada de “Poluentes Emergentes”, sendo sua definição estabelecida como:

- *“Os poluentes emergentes são produtos químicos sintéticos ou naturais ou quaisquer microrganismos que não são comumente monitorados no meio ambiente, mas têm o potencial de entrar no meio ambiente e causar efeitos adversos ecológicos e/ou à saúde humana conhecidos ou suspeitos”* (Siddique, Kubwabo e Harris, 2016).

Dentre os compostos que se incluem nesta classe estão produtos farmacêuticos, pesticidas, produtos químicos industriais, surfactantes e produtos de cuidados pessoais que são consistentemente encontrados em rios, lençóis freáticos, esgotos, na água potável e em fontes de alimentos (Tang *et al.*, 2019; Vasilachi *et al.*, 2021). Eles também incluem compostos disruptores endócrinos, analgésicos, antibióticos, hormônios e toda uma gama de outros compostos farmacêuticos, incluindo drogas anti-inflamatórias, antidiabéticas e antiepiléticas.

Outro problema associado aos poluentes emergentes é que em sua maioria as estações de tratamento de água e esgotos não são capazes de remover tais materiais por completo do ambiente devido à falta de estrutura e tecnologia adequada para a remoção de tais moléculas (Teodosiu *et al.*, 2018). Inclusive se analisarmos os dados do Sistema Nacional de Informações

sobre Saneamento (SNIS) do ano de 2019, apenas 49 % de todo o esgoto produzido no Brasil foi coletado. Contudo, de todo o esgoto coletado apenas 78,5 % foi tratado em estações de tratamento. Sendo assim, diariamente ingerimos tais compostos, e pouca informação está disponível sobre os efeitos que tais poluentes encontrados geralmente em baixas concentrações, possam causar à saúde. Portanto, estudos nesta área são originais, necessários e de interesse público.

1.2. Mistura de Poluentes

No meio ambiente os poluentes emergentes são encontrados na maioria dos casos em baixas concentrações e misturados com todo o tipo de substâncias ou compostos presentes no meio. Inclusive, a respeito da mistura dos poluentes e sua pertinência, a Organização Mundial da Saúde (OMS) 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 e da escassez de estudos a respeito das misturas de compostos (World Health Organization, 2013). Além disso, a OMS reconhece que os principais desafios encontrados estão na ocorrência limitada de dados a respeito dos efeitos de produtos farmacêuticos na água potável. Além da ampla gama de produtos farmacêuticos em uso, assim como as limitações técnicas relacionadas à avaliação de riscos de doenças crônicas devido a baixas doses de medicamentos e misturas dos mesmos (World Health Organization, 2013).

Em particular, existe uma necessidade de se estudar os efeitos “coquetel” da mistura de moléculas (resultado do efeito de compostos de diferentes ações no organismo, normalmente utilizado na interação de moléculas farmacológicas). Dentre os possíveis tipos de interação estão os efeitos aditivo, antagônico e sinérgico. Ou seja, a maneira como diferentes contaminantes emergentes podem interagir para produzir efeitos adversos (Scott e Sloman, 2004).

Nas buscas realizadas na literatura encontram-se trabalhos que relatam efeitos da mistura de poluentes em diversos sistemas, incluindo sistemas *in vitro*. Avaliando os efeitos da mistura de poluentes na viabilidade celular e na produção de hormônios como a progesterona e testosterona em células de humanos (Krawczyk *et al.*, 2021; Wilson *et al.*, 2016) e animais (Gregoraszczuk *et al.*, 2008). No entanto, apesar de haver estudos da mistura de poluentes em outros sistemas como mencionado acima. Particularmente, na literatura não há praticamente nenhum estudo que reporte efeitos causados pela mistura de um ou mais poluentes com modelos de membrana biológica em sistemas similares ao utilizada neste trabalho. Com exceção de trabalhos previamente publicados durante o estudo das misturas realizado durante meu mestrado. O que reforça ainda mais a importância de se avaliar tais efeitos, devido à escassez de informação a respeito da mistura de poluentes e seus possíveis efeitos nas membranas.

1.3. Disruptores Endócrinos

Dentre os poluentes emergentes, uma classe de compostos em particular vem recentemente recebendo atenção de uma série de estudos, os disruptores do sistema endócrino (DSE). Os disruptores endócrinos são uma gama de substâncias químicas que interferem no sistema hormonal, alterando a forma natural de comunicação do sistema endócrino (SE) (Soto e Sonnenschein, 2010). O sistema endócrino é composto de múltiplas glândulas que secretam hormônios diretamente na corrente sanguínea. As glândulas do SE tem funções muito importantes no corpo humano, tais como desenvolvimento e manutenção dos tecidos, saúde dos ossos, metabolismo, reprodução, lactação e entre outros (Macon e Fenton, 2013). Os hormônios secretados pelo SE afetam praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano. Sendo assim, DSE, como o próprio nome sugere, são compostos que alteram o funcionamento normal do sistema endócrino. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define os DSE como:

“Um disruptor endócrino é uma substância exógena ou uma mistura que altera as funções do sistema endócrino, causando consequentemente efeitos adversos à saúde de um organismo intacto”
(Bergman *et al.*, 2012).

Na literatura, a exposição a tais compostos vem sendo relacionada com aumento da ocorrência de algumas doenças e problemas, tais como diabetes, infertilidade, distúrbios na tireoide e alguns cânceres(Costa *et al.*, 2014). Dentre os vários DSE existentes, dois em específico foram estudados nesta tese: o bisfenol A (BPA), um subproduto da indústria de produtos plásticos, sendo amplamente produzido em países como Estados Unidos e China(Corrales, Kristofco, Baylor Steele, *et al.*, 2015) e o 17 α -etinilestradiol (EE2), um hormônio semissintético amplamente utilizado como anticoncepcional, figurando sempre na lista de fármacos mais consumidos no mundo (Clinical Drug Stats Database, 2019).

1.3.1. Bisfenol A

O BPA é um monômero utilizado na fabricação de derivados plásticos, especialmente em resinas epóxi e nos plásticos policarbonato, sendo um dos materiais mais produzidos em volume no mundo (Corrales, Kristofco, Steele, *et al.*, 2015), com quantidades que ultrapassaram 7,7 milhões de toneladas em 2015 (Research and Markets, 2016). BPA está presente em vários produtos de origem plástica como por exemplo garrafas de água, tubulações de PVC, no revestimento de enlatados e muitas outras aplicações. Logo, a ampla utilização de polímeros com BPA está levando a contaminação da água e alimentos que ingerimos. Uma das maneiras com a qual o BPA é liberado no ambiente é pelo processo conhecido de lixiviação, que consiste na liberação do BPA pela superfície do plástico, através de atrito ou temperatura (Sun, P. *et al.*, 2021). O BPA apresenta uma alta lipofilicidade, ou seja, ele possui uma afinidade por lipídios, o que pode ajudar a explicar suas diversas implicações em sistemas biológicos

(Flint *et al.*, 2012). Na literatura, os efeitos DSE do BPA estão relacionados com uma série de efeitos colaterais, dentre eles estão a inibição da ação do hormônio da tireoide (Zoeller, 2007), proliferação de células de câncer de próstata (Wetherill *et al.*, 2002) e bloqueio da síntese da testosterona (Akingbemi *et al.*, 2004).

Mesmo com uma maior consciência a respeito dos efeitos negativos do BPA, como por exemplo a remoção de sua utilização em mamadeiras e com a popularização do rótulo “*BPA free*” ou “*livre de BPA*”, os materiais que substituem o BPA são normalmente derivados muito próximos e com propriedade parecidas, que também demonstram efeitos colaterais (como o bisfenol S ou bisfenol AF) (Qiu *et al.*, 2019).

1.3.2. 17 α -etinilestradiol

O EE2 é um hormônio semissintético amplamente utilizado em anticoncepcionais, estando na lista dos medicamentos mais consumidos do mundo em 2019 (Clinical Drug Stats Database, 2019). Devido ao grande consumo, o EE2 vem se tornando um poluente bastante reportado na literatura (Du *et al.*, 2020; Martyniuk *et al.*, 2020). Um dos principais problemas relacionados ao EE2 reside no fato de que as doses ingeridas do medicamento são excretadas pelo organismo através da urina e fezes, sendo cerca de 6 a 8 % ainda em sua forma ativa (Stanczyk, Archer e Bhavnani, 2013). No entanto, esta propriedade tem se tornando um problema ao meio ambiente, devido a sua alta resistência ao processo de degradação, principalmente em ambientes aquáticos (Kidd *et al.*). Inclusive, na literatura é reportado que doses subterapêuticas, com concentrações muito baixas (da ordem de ng/L) de EE2 afetam o sistema endócrino e reprodutivo de algumas espécies de peixes (Aris, Shamsuddin e Praveena, 2014; Laurenson *et al.*, 2014), sendo observadas a feminização de peixes machos, o atraso de maturidade sexual, assim como a diminuição da atividade sexual (Rose, Paczolt e Jones, 2013). Há diversos

trabalhos que reportam os efeitos do EE2 sobre peixes que entram em contato com o hormônio nos diferentes continentes, inclusive no Brasil (Bhandari *et al.*, 2015; Warner e Jenkins, 2007).

Em seres humanos o uso contínuo de produtos contraceptivos que contém EE2 pode levar ao aumento do risco de doenças como tromboembolismo venoso (Tchaikovski e Rosing, 2010) e problemas cardiovasculares (Collins, 2006). E uma vez que o EE2 age diretamente no sistema reprodutivo feminino, ou seja, no sistema endócrino, é esperado que se tenham estudos dos efeitos colaterais causados diretamente nos órgãos que compõe o sistema endócrino, assim como consequências causadas pelo contato com o EE2 durante pontos chave do desenvolvimento humano como a puberdade (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021). Além disso, outros estudos indicam seu potencial no aumento do câncer de mama (Jerry *et al.*, 2018).

1.4. Modelos de Membrana

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 (Boffetta, 2006). A membrana celular é um sistema biológico muito complexo contendo diversos compostos dentre fosfolipídios, esfingolipídios, proteínas, carboidratos e outros. Devido a estas características, estudos *in-vivo* são complexos e dificultam conclusões específicas. Busca-se então meios que possam mimetizar a membrana celular de forma mais simples, para se observar interações mais específicas em nível molecular que podem contribuir para elucidar reações que acontecem na membrana. Além disso, a membrana celular é o primeiro ponto de interação com as moléculas com atividade farmacológica (Hidalgo *et al.*, 2004; Jori, 1996; Ramu e Ramu, 1992).

Dentre os fosfolipídios utilizados nestes estudos (Bhatia *et al.*, 2015; Jurak *et al.*, 2015; Miñones *et al.*, 2009), as fosfatidilcolinas (PC) se destacam por representarem a maior porcentagem na composição da membrana celular dos mamíferos (Gong e Winnik, 2012; Meer

et al., 2011; Mouritsen e Bagatolli, 2016). As fosfatidilcolinas são os fosfolipídios mais abundantes de todos tipos de células de mamíferos e organelas subcelulares. Em geral, as PCs representam de 40-50% do total de fosfolipídios, embora células e organelas de diferentes tipos possam conter diferentes composições (Vance, 2015; Veen, van der *et al.*, 2017). Dessa forma, nesse trabalho utilizamos os fosfolipídios DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) e DOPC (1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Figura 1) como modelos simples de membrana através dos estudos em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares grandes e gigantes (LUV e GUV – do inglês large e giant unilamellar vesicle).

A utilização de modelos simples de membrana contento apenas um lipídio (neste caso DPPC e DOPC) podem não simular perfeitamente a membrana, pois a composição da membrana poderia ser mais bem simulada com a adição de outras substâncias presentes nas membranas, como colesterol ou mesmo de outros lipídios. No entanto, o foco principal deste trabalho reside na avaliação dos efeitos da mistura, logo, queremos observar se a combinação de dois compostos (BPA + EE2) altera as respostas obtidas para os mesmos materiais separados. No entanto, optamos pela variação do pH e da temperatura como forma de aprofundamento do sistema, ao invés de fazermos misturas binárias ou ternárias de lipídios, pois pretendíamos observar como a mistura afeta um único lipídio separado em diferentes circunstâncias.

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a interação entre os disruptores endócrinos bisfenol A e 17 α -etinilestradiol, simulando o efeito coquetel em modelos-simples de membrana biológica, utilizando para isso as técnicas de filmes de Langmuir (monocamadas) e GUVs (bicamadas). Os objetivos específicos do trabalho contemplaram as seguintes atividades:

1. Estudar a interação do BPA, EE2 e mistura com monocamadas lipídicas compostas pelos fosfolipídios DPPC e DOPC via filmes de Langmuir em subfase aquosa. Nesse estudo foram avaliadas as interações por isothermas π -A, BAM e PM-IRRAS.
2. Avaliar possíveis mudança na interação do BPA, EE2 e mistura com monocamadas lipídicas de DPPC e DOPC via filmes de Langmuir nos valores de pHs 3,0 e 7,4 (soluções tampão de citrato e HEPES, respectivamente). Nesse estudo foram avaliadas as interações via filmes de Langmuir.
3. Analisar mudanças na interação do BPA, EE2 e mistura com monocamadas lipídicas de DPPC e DOPC na temperatura corporal ($\sim 37^\circ\text{C}$) via filmes de Langmuir.
4. Estudar a interação do BPA, EE2 e mistura com bicamadas lipídicas, utilizando GUVs dos fosfolipídios DPPC e DOPC. Esse estudo foi realizado com o intuito de observar possíveis alterações através de imagens de microscopia de contraste de fase.
5. Estudar a interação do BPA, EE2 e mistura com bicamadas lipídicas, utilizando LUVs dos fosfolipídios DPPC e DOPC. Esse estudo foi realizado com o intuito de observar possíveis mudanças no tamanho, no potencial zeta e nos valores de anisotropia das vesículas na presença dos disruptores.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. 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., o bisfenol A (BPA) e o 17 α -etinilestradiol (EE2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich co. As massas molares do DPPC, DOPC, BPA e EE2 são respectivamente 745, 786, 228,3 e 296,4 g/mol. O BPA tem valores de pKa de 9,6-10,3 (Sambe *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2016), enquanto o EE2 tem valores de pKa de 10,5-10,7 (Fredj, Ben *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2020). A fim de estabelecer um padrão, a mistura dos poluentes (MIX) foi feita pela combinação de ambos os poluentes em uma proporção de 1:1, sendo a maior parte das análises realizadas na concentração de 1×10^{-5} mol/L. As estruturas dos lipídios e dos poluentes nos pH utilizado no trabalho estão representadas na Figura 1.

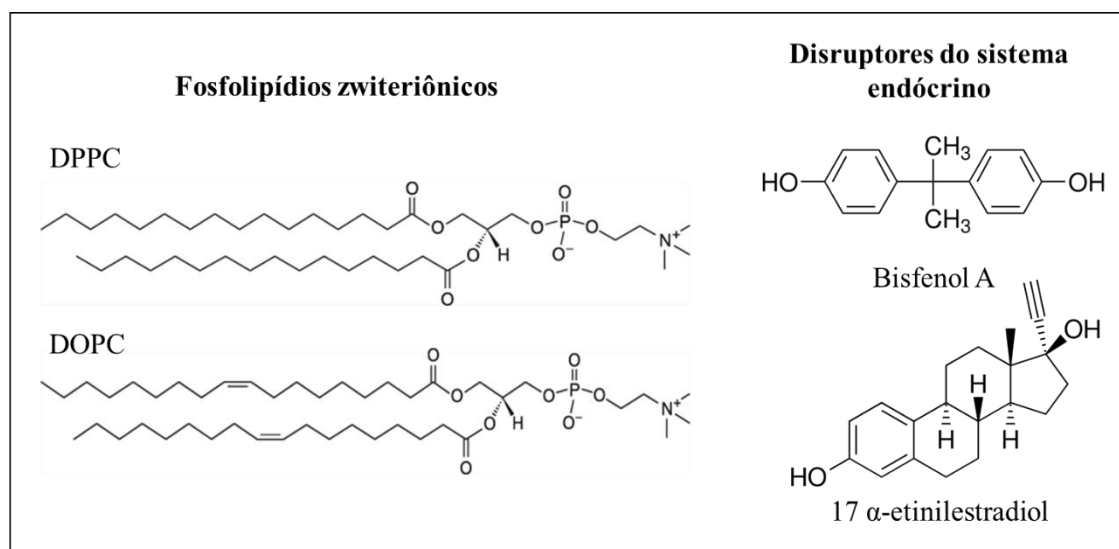


Figura 1: Representação esquemática da estrutura molecular dos fosfolipídios DPPC e DOPC, além dos poluentes emergentes bisfenol A e 17 α -etinilestradiol nos pHs estudados.

3.2. 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 quatro diferentes subfases aquosas, BPA, EE2 e a mistura de ambos os poluentes, todos com a mesma concentração de 1×10^{-5} mol/L em uma cuba com volume de 220 mL, sendo todas presentes na cuba antes do espalhamento dos fosfolipídios. Os filmes de Langmuir foram produzidos espalhando 25 μ L das soluções de DPPC e DOPC, ambas com concentração de 1×10^{-3} mol/L dissolvidas em clorofórmio. As isotermas π -A realizadas em temperatura ambiente foram obtidas a 23 °C utilizando o sensor Wilhelmy. Nas isotermas realizadas com diferentes pHs as soluções tampão foram preparadas em uma concentração de 10 mM. Os pHs foram ajustados para o valor de interesse utilizando soluções de HCl (tampão citrato) e NaOH (tampão HEPES) de forma que se obteve os pHs 3 e 7,4, sendo então o BPA e EE2 solubilizados nestas soluções tampão. Para as análises realizadas 37 °C, a subfase foi pré-aquecida antes da inserção na cuba, a temperatura foi controlada com a passagem de um fluxo com temperatura próxima à de interesse, de forma a evitar a queda na temperatura. 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.

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.

3.3. 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 1, mostrada abaixo. Por fim, os gráficos foram obtidos plotando C_S^{-1} em função da pressão de superfície.

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

3.4. 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 1×10^{-3} mol/L e todas as subfases com a concentração de 1×10^{-5} mol/L. 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 compressão das barreiras 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 possuir este valor pressão lateral.

3.5. 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 1×10^{-3} mol/L e todas a subfase com a concentração de 1×10^{-5} mol/L. O procedimento experimental se dá de forma similar ao dos filmes de Langmuir, com apenas algumas mudanças. Tanto para as análises em BAM como para o PM-IRRAS, a caracterização das isotermas a 37 °C não foi realizada, devido ao nível de umidade causado pelo aumento da temperatura, o que poderia causar problemas na parte ótica dos equipamentos.

3.6. FTIR de filmes cast

As medidas dos filmes *cast* consiste na fabricação de filme depositado na superfície de um substrato pela adição de gotas da solução de interesse, de forma a se formar uma camada contendo os compostos a serem medidos. As medidas 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 poluentes BPA, EE2 e MIX, todas com as mesmas concentrações 1×10^{-2} mol/L e em etanol (para aumentar a solubilidade e diminuir o tempo de evaporação). Foram então espalhados 100 μL da solução sobre a superfície do substrato, sendo aplicado um vácuo por 30 min para a evaporação do solvente, e em seguida efetuada a medida.

3.7. 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 2 (A)). Em seguida foi espalhada sobre cada superfície condutora dos ITOs 10 μL do fosfolipídio, com concentração de 1×10^{-3} mol/L, deixando evaporar o solvente em vácuo por 1 hora. Após a evaporação do solvente a célula foi montada como está representado na Figura 2 (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 (Biltonen e Lichtenberg, 1993). 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.

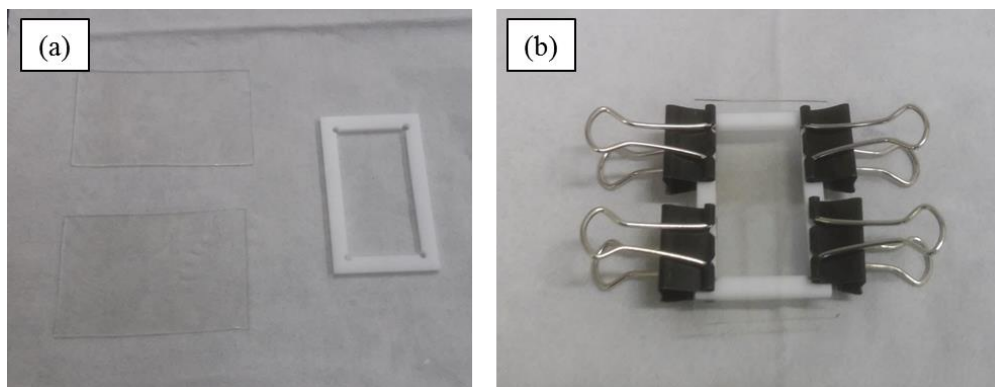


Figura 2: Fotos dos (a) substratos de ITO e o espaçador de teflon e (b) célula de eletroformação pronta para hidratação.

3.8. 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 amostras foram colocadas sobre uma lamínula do tipo *Ibidi μ -Slide 8 Well Glass Botton*, adicionando-se 200 μ L de uma solução de glicose com concentração de 0,2 mol/L que já continha o poluente solubilizado, devido à baixa solubilidade dos poluentes. A princípio, foram realizadas medidas em apenas um concentrações do poluente (1×10^{-5} mol/L). No entanto, para as amostras em BPA foram realizadas medidas em uma concentração de 1×10^{-4} mol/L. Para o EE2 e MIX as análises se limitaram a concentração de 1×10^{-5} mol/L, devido a limitação da solubilidade do EE2 em água. 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 mesmo 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.

3.9. Microscopia de Fluorescência Confocal

Nas medidas de fluorescência confocal o mesmo microscópio da marca Nikon, modelo C2/C2si foi utilizado, sendo empregado na captura das imagens os lasers 488 e 561 nm. A metodologia empregada para a eletroformação das GUVs foi bastante similar ao descrito na seção 3.8, no entanto com apenas algumas diferenças. A análise na qual a bicamada foi marcada, utilizou-se a sonda fluorescente DiIC18 (*1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate*), misturada na solução do lipídio numa proporção molar de 0,5%. Para as medidas na qual o ambiente externo foi marcado, foi utilizada a sonda AlexaFluor™ 488 C5 Maleimide, preparando uma solução junto a glicose (0,2 mol/L de glicose + 5×10^{-6} mol/L de AlexaFluor + poluente).

3.10. Análise Quantitativa

A análise quantitativa foi realizada pela contagem do número de vesículas coletadas após 30 min de exposição aos poluentes. Uma série de imagens foram coletadas em diferentes regiões da amostra. As GUVs foram separadas em três grupos de tamanhos diferentes. Menores que 10 μm , entre 10 e 30 μm e maior que 30 μm . A partir das quantidades totais obtidas foram as porcentagens das GUVs afetadas. A análise da variação do tamanho das GUVs foi coletada a partir dos vídeos, onde um grupo de vesículas foi acompanhado do início a fim (30 min), de forma que foram coletados o diâmetro inicial e final das GUVs.

3.11. Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)

As LUVs (do inglês *large unilamellar vesicles*) foram preparadas pelo processo conhecido por extrusão. Foram preparadas soluções dos lipídios DPPC e DOPC em clorofórmio na concentração de 1×10^{-3} mol/L, posteriormente evaporou-se o solvente em um tubo de ensaio,

pela aplicação de uma agitação em vortex e com um fluxo de nitrogênio de forma que se obteve um filme dos lipídios na parede do tubo. As amostras foram mantidas em vácuo por 1 hora para a remoção completa do solvente. As amostras foram então hidratadas pela adição de 1 mL de solução aquosa sobre agitação por dois minutos, obtendo-se assim vesículas multilamelares. Para a obtenção de vesícula unilamelares grandes as amostras passaram pelo processo de extrusão, que consiste pela passagem das vesículas por filtros com tamanho de poros definidos (membrana de polycarbonato), nesse caso de 100 nm, de forma a obter-se um tamanho padrão e consistente. Para o DPPC, as amostras foram preparadas em temperatura acima de transição de fase do lipídio (~50 °C).

3.12. Medidas de Espalhamento Dinâmica de Luz (DLS) e Potencial Zeta

As medidas de DLS (do inglês *dynamic light scattering*) e potencial zeta foram realizadas em um equipamento modelo ZetaSize Nano ZS90 da Malvern (laser 633 nm). As amostras das LUVs foram diluídas pela proporção 1:10, sendo medidas nas amostras controle, BPA, EE2 e MIX. Para os poluentes, as amostras foram expostas a uma concentração de 1×10^{-5} mol/L pelos períodos de 0, 30 e 60 min (as medidas de 0 min são coletadas imediatamente após a exposição dos poluentes). Todas as análises foram realizadas em triplicata e em temperatura ambiente (~23 °C). Em algumas amostras a concentração do BPA foi aumentada para 1×10^{-4} mol/L.

3.13. Medidas de Anisotropia

A preparação das amostras para as medidas de anisotropia foi realizada de forma similar ao procedimento utilizado na preparação das LUVs, a única diferença consiste na adição da sonda NDB-PE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)) junto ao lipídio na concentração de 10 µM. As amostras foram expostas

aos poluentes na concentração de 1×10^{-5} mol/L durante um intervalo de 60 min. As medidas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro modelo Hitachi F-7000 FL, que possui uma lâmpada de xenônio com potência de 150 W como fonte de excitação. Os dados foram coletados utilizando uma fenda de 5 nm, sendo a amostra excitada pelo comprimento de onda de 465 nm. O equipamento possui uma base acoplada para realização de medidas com polarizadores. Foram coletados espectros para as quatro diferentes posições dos polarizadores de forma vertical (V) e horizontal (H). Para a obtenção dos valores de anisotropia (R), foi primeiramente calculado o valor do Fator-G da seguinte maneira:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

onde I_{HV} é intensidade da banda do espectro de fluorescência para os polarizadores na posição horizontal-vertical, e I_{HH} é a intensidade para os polarizadores na posição horizontal- horizontal.

Uma vez obtido o valor de G, a anisotropia R pode ser calculada da seguinte maneira:

$$R = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

onde I_{VV} é a intensidade na posição vertical-vertical e I_{VH} é intensidade na posição vertical-horizontal.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Interação entre os analitos – FTIR de filmes cast

Para dar início a análise de possíveis interações entre o BPA e EE2 quando misturados, foi realizado um estudo utilizando medidas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) de filmes *cast* dos disruptores endócrinos. Na Figura 3 são apresentados os espectros FTIR dos filmes *cast* dos analitos.

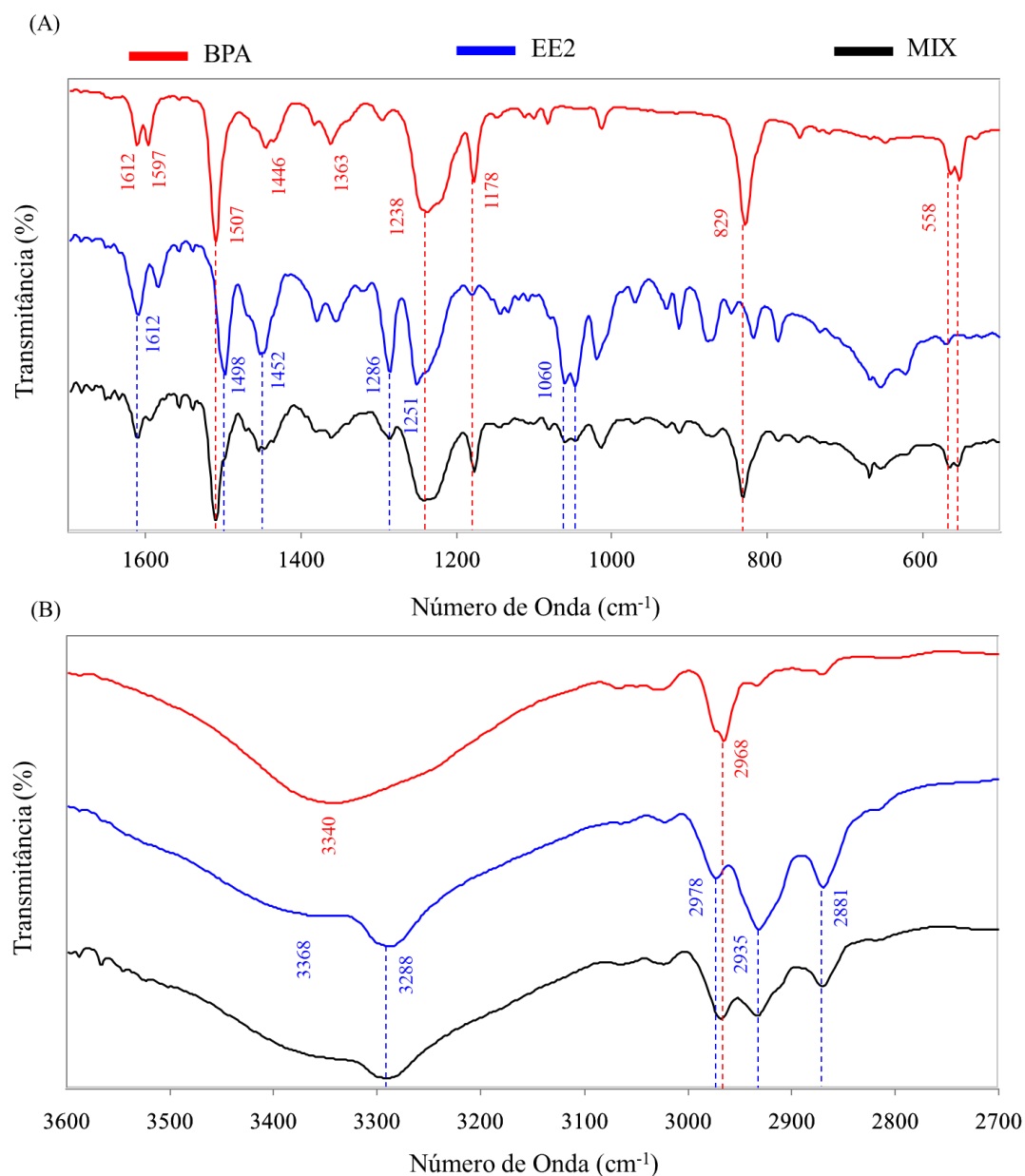


Figura 3: Espectros de FTIR para os filmes *cast* para os poluentes BPA, EE2 e MIX, nos intervalos de (A) 500 a 1700 cm^{-1} e (B) 2700 a 3600 cm^{-1} .

Os espectros obtidos para o filme *cast* do BPA e EE2 são coerentes com os resultados encontrados na literatura, sendo que a maioria das bandas reportadas foram observadas nos espectros capturados experimentalmente (Barnett *et al.*, 1995; Sun, K. *et al.*, 2021; Ullah, Ahmad e Zheng, 2016; Zhao *et al.*, 2015). No entanto, para a MIX pode se observar que o espectro capturado contém exatamente a mesmas bandas observadas para os compostos separados, sem deslocamentos, mudanças ou desaparecimentos de bandas (Tabela 1). Isso indica que os materiais não interagem entre si. Esse resultado é interessante se comparado com os estudos realizados durante meu mestrado, no qual foi estudada a interação entre a amoxicilina (AMX) e o azul de metileno (AM) (Maximino, 2018). Para a mistura realizada durante o mestrado, os materiais interagem entre si formando um aduto (produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto contendo os componentes iniciais). Por motivos de comparação os resultados obtidos neste estudo serão comparados com os resultados obtidos durante meu mestrado. Afim de avaliar a influência da diferença de interação entre as misturas e como elas afetaram de forma diferentes as mono e bicamadas.

Tabela 1: Atribuições dos espectros FTIR para o BPA e EES

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições para o BPA	Ref.
558	Deformação angular fora do plano (C-C-C em ambos os anéis), deformação angular através do átomo conectando os anéis, deformação angular (<i>wagging</i>) dos átomos de hidrogênio em ambos os anéis	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
829	Estiramento C-C em ambos os anéis, estiramento através do átomo conectando os anéis, estiramento C-O em ambos os anéis	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1178	Deformação angular (<i>wagging</i>) dos átomos de hidrogênio ligados ao oxigênio, deformação angular (<i>wagging</i>) dos átomos de hidrogênio	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)

	em ambos os anéis, estiramento C-C em ambos os anéis	
1238	Deformação angular do C-O-H do grupo fenol	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1363	Deformação angular do C-H dos grupos CH ₂ e CH ₃	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1446	Deformação angular do C-H dos grupos CH ₂ e CH ₃	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1507	Estiramento C-C em ambos os anéis, deformação angular (<i>wagging</i>) dos átomos de hidrogênio através de ambos os anéis, estiramento através dos átomos que conectam os anéis	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1597	Estiramento C-C em ambos os anéis, deformação angular (<i>wagging</i>) dos átomos de hidrogênio, deformação angular através dos átomos que conectam os anéis	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
1612	Estiramento do anel aromático	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
2968	Estiramento do CH ₂	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
3340	Estiramento O-H do grupo fenol	(Ullah e Wang, 2018; Zhao <i>et al.</i> , 2015)
Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições para o EE2	Ref.
1060	Estiramento do C-O	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
1251	Deformação angular (<i>rocking</i>) do CH ₃	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
1286	Deformação angular do O-H	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
1452	Respiração do anel aromático, deformação angular do C-H do grupo metil	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
1498	Respiração do anel aromático, deformação angular do C-H do grupo metil	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
1610	Respiração do anel aromático e estiramento do C-O	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
2881	Estiramento simétrico do CH ₂	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
2935	Estiramento antissimétrico do CH ₂	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
2978	Estiramento simétrico do C-H	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)
3288	Estiramento O-H do grupo fenol	(Barnett <i>et al.</i> , 1995; Sun, K. <i>et al.</i> , 2021)

4.2. Filmes de Langmuir

4.2.1. Atividade Superficial

A princípio todas as subfases foram testadas de forma a avaliar se os disruptores endócrinos apresentavam alguma atividade superficial, comprimindo as barreiras da cuba na ausência dos lipídios na interface ar-água. A Figura 4 mostra os perfis da atividade superficiais da água, BPA, EE2 e da MIX. Todas as isotermas foram capturadas em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) e com concentração de 1×10^{-5} mol/L.

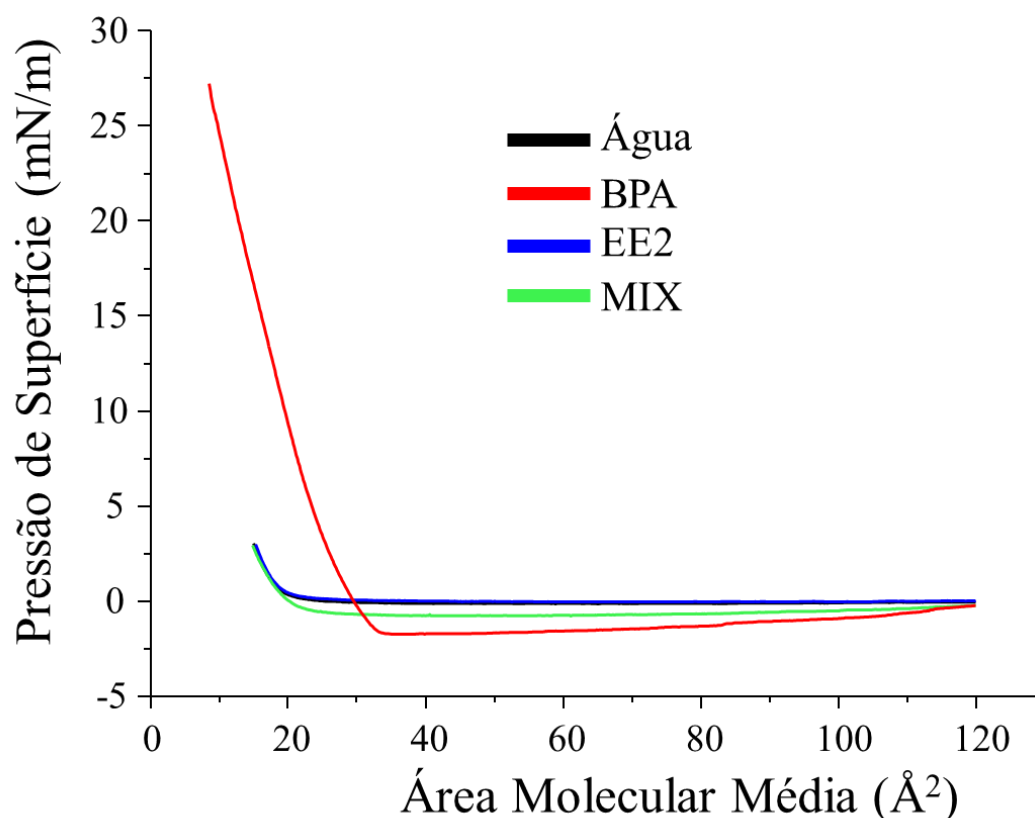


Figura 4: Isotermas π -A obtidas para os testes de atividade superficial das subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Todas as subfases dos poluentes foram realizadas a uma concentração de 1×10^{-5} mol/L.

A atividade superficial para o EE2 não apresentou nenhuma alteração significativa visto que o valor da pressão superficial não se alterou durante a maior parte da compressão das barreiras. O ligeiro aumento na pressão observado no fim da compressão foi causado devido à proximidade do sensor das barreiras móveis. As subfases que continham o BPA apresentaram uma atividade superficial com valores de área maiores, porém sem apresentarem colapso e com pouco reprodutibilidade. Dessa forma, foi realizada uma nova análise de atividade superficial com uma concentração maior de 1×10^{-4} mol/L. Tal análise se limitou somente ao BPA, devido ao limite de solubilidade do EE2 ser de próximo de 1×10^{-5} mol/L, o que impedia a fabricação de uma solução da MIX na mesma concentração do BPA, uma vez que seria necessário que metade das moléculas fossem de EE2 (5×10^{-5} mol/L), o que não é possível, pois ele é insolúvel nesta concentração.

A Figura 5 mostra a isoterma π -A obtidas para os testes de atividade superficial na concentração de 1×10^{-4} mol/L de BPA.

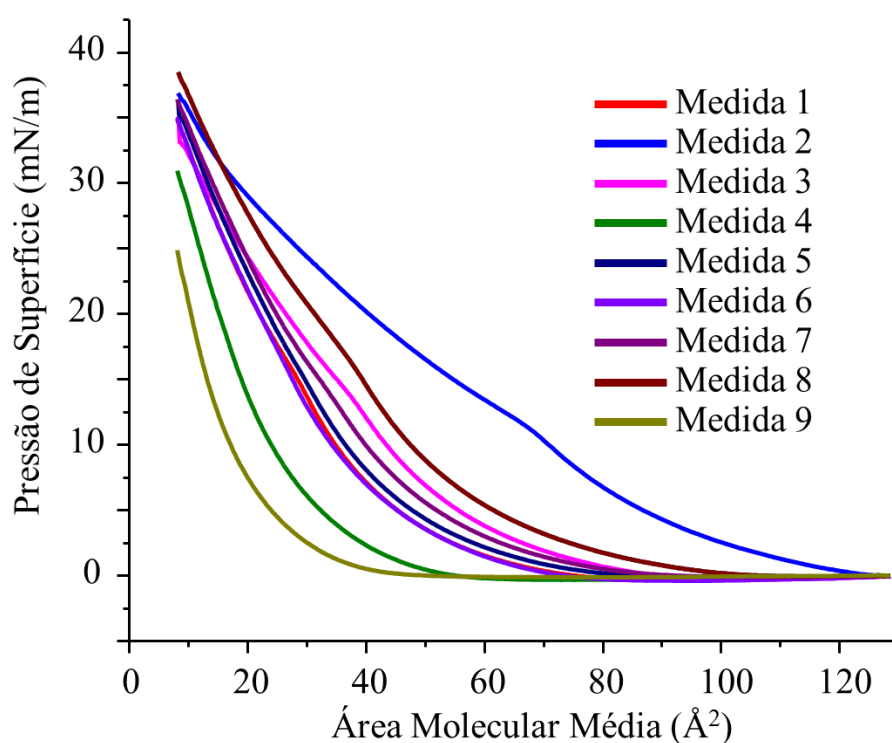


Figura 5: Isotermas π -A obtidas para os testes de atividade superficial do BPA a uma concentração de 1×10^{-4} mol/L.

As isotermas obtidas apresentaram valores de área bem maiores do que os observados para a concentração de 1×10^{-5} mol/L. A atividade superficial do BPA por ser atribuída a uma propriedade de sua estrutura, conhecida como

uma molécula “bolaamfifílica” (do inglês *bolamphiphilic*) (Nuraje, Bai e Su, 2012), que como característica principal possui uma estrutura química com um centro hidrofóbico e as bordas da molécula hidrofílicas, assim como pode ser observado na Figura 6. Tal

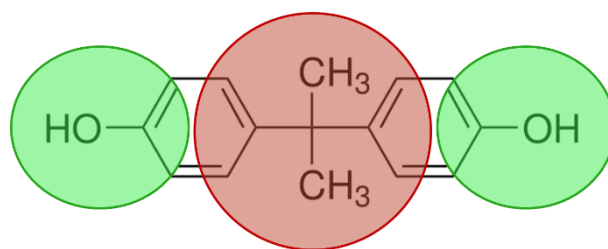


Figura 6: Estrutura química do BPA mostrando característica bolaamfifílica da molécula, indicado as regiões hidrofílicas (verde) e hidrofóbicas (vermelho).

característica garante a solubilidade em água e também sua atividade superficial. No entanto, não se observou uma reprodutibilidade dos resultados, mesmo com a realização de nove compressões, o que indica uma atividade superficial aleatória, devido principalmente a tendência do BPA de se agregar em solução aquosa (Chen et al., 2016). Contudo, uma vez que qualquer lipídio (DOPC ou DPPC) é espalhado na interface ar-água a contribuição do BPA nos valores de área molecular média é reduzida significativamente, uma vez que o perfil da isoterma passa ser parecido com o perfil do lipídio separado, indicando que o BPA, apesar de possuir atividade superficial, não é estável o suficiente para formar uma monocamada de Langmuir. As características de agregação do BPA, assim como seus efeitos nos modelos de membrana vão ser discutidos em mais detalhes nas seguintes seções.

4.2.2. DPPC

Na Figura 7 (A) são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolipídio DPPC na ausência e presença dos disruptores endócrinos, todas realizadas em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) e com a mesma concentração (1×10^{-5} mol/L). A Figura 7 (B) mostra o gráfico dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases.

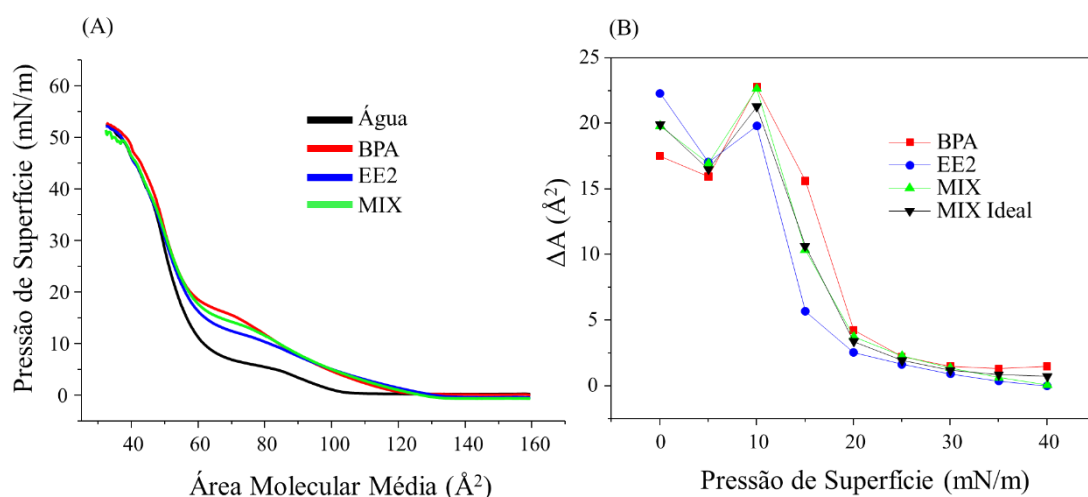


Figura 7: (A) Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Os resultados obtidos para as isotermas π -A em subfase aquosa para o DPPC é similar aos resultados encontrados na literatura (Ruiz *et al.*, 2017), com valor de área extrapolada de $62 \text{ \AA}^2$, possuindo na pressão de 30 mN/m um valor de área de aproximadamente $49 \text{ \AA}^2$. Além disso, pode-se observar a presença das fases gasosa, líquido-expandida e líquido-condensada de forma bem definida.

Para ambos os poluentes, ocorreu uma expansão para maiores áreas durante quase toda a compressão, inclusive causando uma variação no perfil da curva onde as transições das fases líquido-expandida e líquido-condensada normalmente ocorrem. Além disso, os valores de área extrapolada variaram em relação a água para $68 \text{ \AA}^2$ para ambos os compostos. No entanto, conforme os valores de pressão superficial aproximaram-se de $25 \text{ \AA}^2$, tanto o BPA quanto o

EE2 foram aparentemente expulsos da interface ar-água. A expansão observada pode ter sido causada pela presença dos analitos na interface, possivelmente devido a uma interação secundária (eletroestática ou ligações de hidrogênio) entre partes da molécula do analito e a cabeça do lipídio. Porém, essas interações podem ter sido superadas pela pressão superficial que expulsa os poluentes da interface conforme os valores de pressão aumentam. Outra possibilidade é a de os analitos terem se acomodado abaixo da interface, o que resultaria na manutenção da área molecular média, apesar da interação. Outras considerações relacionadas às interações serão discutidas em mais detalhes na seção do PM-IRRAS. Tal comportamento de expulsão do analito da interface foi reportado em um trabalho anteriormente publicado a partir dos estudos da mistura de poluentes (Maximino *et al.*, 2019), onde se avaliou os efeitos causados em monocamadas de DPPC expostas a dois poluentes emergentes a AMX e o AM. Naquele estudo, assim como o obtido para o BPA e EE2, ambos os compostos foram expulsos da interface uma vez que as pressões de superfície mais altas foram atingidas.

No trabalho de Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2020) foi estudada a influência do EE2 em modelos binários de membrana utilizando o DPPC e o colesterol. Nas análises contendo 100 % DPPC e expostas ao EE2, o resultado foi bastante similar ao apresentado neste trabalho, sendo o mesmo comportamento observado, consistindo na expansão durante as menores pressões e consequente expulsão da interface.

A MIX apresentou um perfil similar aos dos analitos separados, inclusive com transições e valores de áreas extrapoladas semelhantes. Nota-se ainda que a isoterma apresentou o comportamento equivalente à de uma mistura ideal, conforme mostrado na Figura 7 (B). Por definição, para a farmacologia, um efeito aditivo seria o resultado teoricamente esperado da combinação de um ou mais medicamentos. Normalmente, usa-se a analogia do $1 + 1 = 2$, para exemplificá-la (Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017). Contudo, para nosso sistema uma mistura considerada ideal (para lipídios), na qual metade das moléculas pertence a cada um dos dois

analitos, espera-se que o resultado seja intermediário aos obtidos para os compostos. Tal resultado ideal está representado pela curva preta da Figura 7 (B), na qual se posiciona exatamente entre as curvas obtidas experimentalmente para o BPA e EE2. Pode-se observar que a MIX (curva verde) apresentou valores de ΔA bem próximos dos valores esperados em uma mistura ideal (curva preta) durante quase toda a compressão. Isso indica que a mistura do BPA e EE2 farmacologicamente apresenta uma interação aditiva, produzindo um efeito final esperado pela combinação dos compostos (Roell, Reif e Motsinger-Reif, 2017). Na literatura, não há uma grande quantidade de estudos que avaliem a interação entre dois ou mais compostos na subfase. No entanto, nos resultados obtidos durante meu mestrado reportados em (Maximino, 2018), a mistura dos poluentes apresentou uma tendência diferente. No caso, foi estudada a mistura entre dois poluentes a AMX e o AM em monocamadas de DPPC e DOPC. Para tal mistura sabia-se que ambos analitos interagiam entre si, formando um “aduto” (produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto contendo os componentes iniciais), o que resultou em um efeito sinérgico entre os compostos e a monocamada, devido a expansão observada na isoterma da MIX. Para o sistema deste estudo (BPA e EE2) observou-se via medida de FTIR de filmes *cast* que os analitos não interagem entre si (Figura 3), permanecendo separados (ver seção FTIR). Tal fato ajuda a explicar o efeito aditivo observado na Figura 7 (B), pois se ambas as moléculas não interagem entre si, é coerente que na MIX seu efeito seja aditivo.

Uma vez que as análises em água foram realizadas para se obter o padrão de resposta, deu-se continuidade nos estudos com a obtenção das isotermas exposta aos disruptores endócrinos em soluções tampão com valores de pH que simulam diferentes ambientes corporais, nos quais os compostos podem ser encontrados no corpo, como por exemplo no estômago e no sangue (pHs 3 e 7,4, respectivamente) (Beasley et al., 2015; Kellum, 2022). Nas Figuras 8 (A) e (C) são apresentados os resultados das isotermas π -A nas soluções tampão de

citrato (pH 3) e HEPES (pH 7,4) ambas com concentração de 0,01 mol/L, para o fosfolípido DPPC na ausência e presença dos três poluentes, todas realizadas em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) e com a mesma concentração dos poluentes (1×10^{-5} mol/L). Nas Figura 8 (B) e (C) são apresentados os gráficos dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases nas soluções tampão de citrato e HEPES.

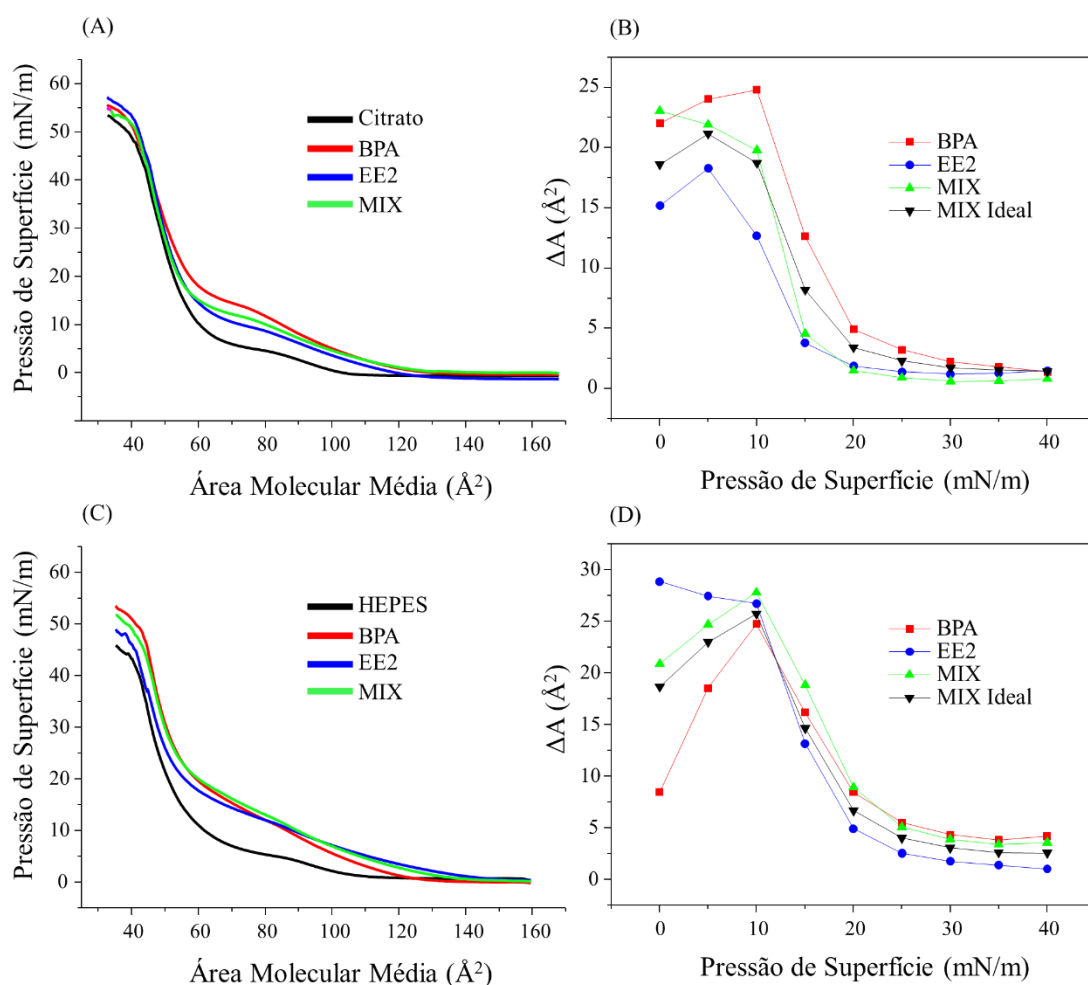


Figura 8: Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à temperatura ambiente para as soluções tampão (0,01 mol/L) de (A) citrato (pH 3) e (C) HEPES (pH 7,4). Valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases nas soluções tampão de (B) citrato e (D) HEPES.

As medidas realizadas nos diferentes pHs não causaram uma mudança significativa para o lipídio DPPC (na ausência dos analitos na subfase), sendo que o mesmo perfil e valores de

área extrapolada foram obtidos ($62 \text{ \AA}^2$) (Lúcio *et al.*, 2008; Pazin *et al.*, 2019). Isso ocorreu devido aos pHs utilizados não alterarem a estrutura do lipídio, uma vez que o pKa das fosfatidilcolinas são próximos de 1 (Marsh, 2013), logo o DPPC permanece inalterado em ambas as amostras da Figura 8.

Os resultados para ambas as análises (pH 3 e 7,4) foram similares aos obtidos para a análise em água, pois todas as subfases causaram expansões para maiores áreas durante o início da compressão. No entanto, para as maiores pressões de superfícies os resultados variaram dependendo do pH utilizado. Para o pH 3, todos os poluentes foram aparentemente expulsos da interface ar-água a partir de $30 \text{ \AA}^2$. Para o pH 7,4, tanto o BPA quanto a MIX apresentaram uma pequena expansão ($\sim 5 \text{ \AA}^2$), mesmo nas pressões mais altas, permanecendo assim na interface. Inclusive, este efeito pode estar ligado ao BPA, pois a MIX também deslocou neste mesmo intervalo, enquanto o EE2 foi expulso de interface.

Analizando detalhadamente o perfil das isotermas não se notou variações após a inserção das soluções tampão, pois o lipídio continuou a apresentar as transições de fase tradicionais do DPPC. No entanto, notam-se oscilações nos valores de área inicial (*onset* - 0 mN/m) e final das compressões (40 mN/m). O padrão de resposta das isotermas no pH 7,4 foi parecido ao obtido para as amostras em água, pois em ambos os casos, o EE2 apresentou uma maior expansão no início da compressão, porém após as pressões de 10 e 15 mN/m esse padrão se inverteu e o BPA passou a ter o maior deslocamento (Figura 7 (C)).

No entanto, para o pH 3, esse perfil se alterou, o BPA apresentou uma maior expansão nas isotermas tanto no início quanto no fim da compressão. Todavia, tal mudanças não está relacionada ao BPA, pois na Figura 11 (B) observa-se que as isotermas de BPA variaram muito pouco entre os diferentes pHs, enquanto isso as isotermas de EE2, diminuíram os valores de área conforme o pH diminuiu (Figura 11 (C)). A Figura 9 mostra os valores de ΔA na pressão

de 0 mN/m (*onset* - início da compressão) para todas as subfases. Entretanto o BPA e EE2 apresentam comportamentos opostos conforme o pH aumenta. Enquanto os valores de ΔA diminuem para BPA (curva vermelha), os valores de ΔA aumentam para o EE2 (curva azul) conforme o pH aumenta. Isso indica que a mudança do pH (ou a inserção dos sais do tampão) está afetando a forma como os poluentes alteram a monocamada no início da compressão. Contudo, vale ressaltar que tais mudanças são minoritárias, apenas possíveis reorganizações da monocamada.

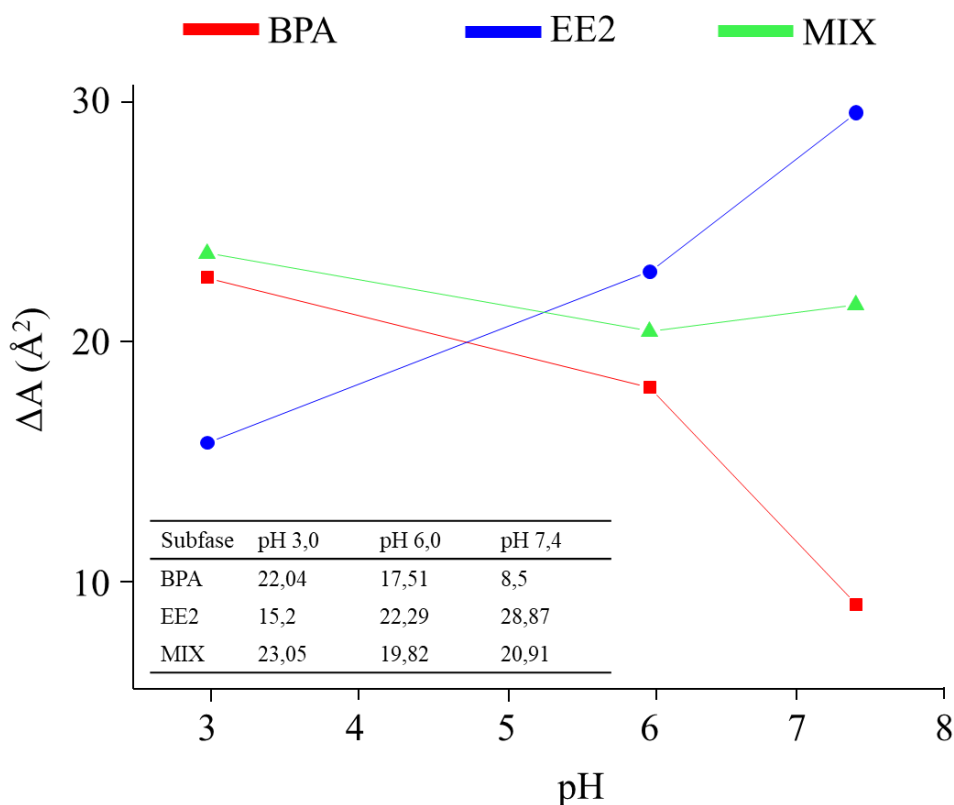


Figura 9: Variação da área molecular média na pressão de *onset*. Em detalhe os valores numéricos de cada subfase

Uma observação importante para este sistema reside no fato de que para ambos os poluentes a variação do pH não afeta a estrutura das moléculas, pois ambos os compostos possuem valores de pKa acima de 10. De forma similar, os lipídios também não são afetados uma vez que o pKa das fosfatidilcolinas é próximo de 1, logo não se alterando no intervalo do

pH utilizado (Marsh, 2013). Sendo assim, tais variações podem ter sido causadas simplesmente pela adição das soluções tampão na subfase, alterando assim algumas propriedades da monocamada ou subfase, o que levou consequentemente a uma expansão e/ou uma reorganização da monocamada (Casillas-Ituarte *et al.*, 2010; Pazin *et al.*, 2019). No trabalho de Casillas-Ituarte *et al.* (Casillas-Ituarte *et al.*, 2010) foi estudada a influência de íons de sódio e cálcio em monocamadas de DPPC, onde foram observadas pequenas mudança para valores de maiores áreas, sem a alteração do perfil da isoterma. Os autores argumentaram que tais mudanças podem ser atribuídas a interações na cabeça do lipídio, que consequentemente induziram uma maior desordem na região da cauda (Aroti *et al.*, 2004; Sovago *et al.*, 2007). Em outro trabalho, de Cutró *et al.* (Cutró *et al.*, 2015), foi estudada a influência do aminoácido fenilalanina em monocamadas de DPPC em dois diferentes pHs (5 e 7,3). Os autores observaram que no pH 5 os efeitos dos analito foram aumentados, atribuindo tais mudanças a uma reorganização da estrutura da monocamada, devido a uma mudança na conformação do aminoácido, o que permitiu o analito permanecer na interface ar-água entre as moléculas de DPPC.

O comportamento da MIX para ambos os pHs foi até certo ponto similar, pois como pode ser observado na Figura 8 (B) e (D) durante a compressão a MIX apresentou valores de área que divergiram de um comportamento ideal, conforme observado na Figura 7 (B). Por exemplo, para o pH 7,4 (Figura 8 (D)), os valores de ΔA oscilaram durante diferentes partes da compressão. De 0 até 10 mN/m e de 25 até 40 mN/m a MIX teve valores de ΔA próximos da curva preta. Entretanto, entre 10 e 25 mN/m os valores de ΔA oscilaram para valores maiores do que os poluentes separados. Devido a esta variação dos dados, estabelecer uma conclusão a respeito do comportamento aditivo ou sinérgico da MIX se torna complicado.

Após a finalização da análise em soluções tampão, iniciou-se as análises próximas da temperatura corporal ($\sim 37^\circ\text{C}$). Na Figura 10 (A) são apresentados os resultados das isotermas

π -A realizadas na temperatura de 37 °C, para o fosfolipídio DPPC na ausência e presença dos três poluentes, todas realizadas com a mesma concentração (1×10^{-5} mol/L). Nas Figura 10 (B) são apresentados os gráficos dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases à 37 °C.

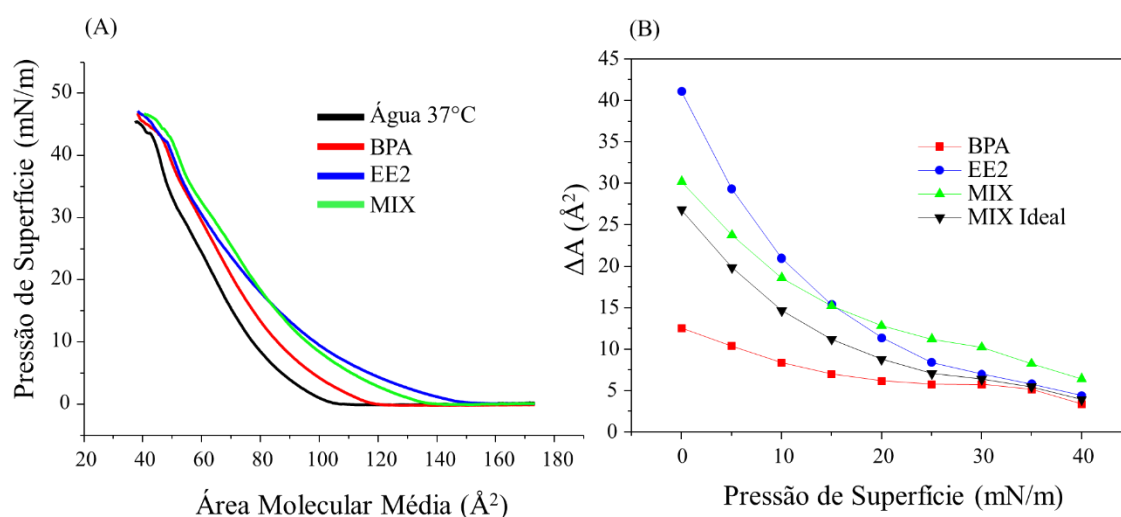


Figura 10: (A) Isotermas π -A de DPPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à 37 °C e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Com a aplicação da temperatura de 37 °C o perfil das isothermas foram alterados, o DPPC apresentou um resultado semelhante ao reportado na literatura com uma variação das transições de fase do lipídio (Krajewska, Kyzioł e Wydro, 2013). A expansão da área ocorre devido ao aumento da temperatura, expandindo assim a monocamada. Diferentemente do observado para as análises em temperatura ambiente, todas as subfases causaram uma expansão para maiores áreas durante toda a compressão. Este fato pode estar relacionado com o aumento da fluidez causado pelo aumento da temperatura, permitindo assim, uma maior liberdade entre as cabeças do lipídio, deixando que os disruptores permaneçam na interface ar-água. Além disso, o EE2 causou uma maior expansão se comparado com o BPA, porém após 30 mN/m ambos apresentaram o mesmo deslocamento. Uma possível explicação para a maior expansão inicial

por parte do EE2 pode estar relacionada ao tamanho da molécula, uma vez que o EE2 possui um maior volume do que a molécula do BPA (Ahmed *et al.*, 2018; Pan e Xing, 2010). Uma resposta parecida foi obtida por Krajewska *et al.* (Krajewska, Kyzioł e Wydro, 2013), onde foi estudada a influência da quitosana em modelo de membrana de DPPG na temperatura de 37 °C. Os autores observaram, assim como neste trabalho, que o aumento da temperatura induziu uma maior liberdade entre as moléculas do lipídio, o que consequentemente facilitou a alteração causada pelo composto.

Assim como as análises em HEPES o comportamento da MIX oscilou bastante. Durante as pressões mais baixas (de 0 à 10 mN/m), a MIX permaneceu entre as curvas do BPA e EE2, divergindo assim desse comportamento após 15 mN/m. No entanto, dentre todas as análises realizadas para o DPPC foi a que mais variou, principalmente nas pressões mais altas. Aparentemente o aumento da fluidez influenciou a expansão das isotermas, e até certo ponto o padrão com o qual elas interagem, pois os valores de ΔA oscilaram durante a compressão das barreiras, se comparados as análises em temperatura ambiente. O motivo pelo qual a MIX variou mais durante as pressões mais altas, pode estar ligado ao aumento da fluidez, o que permitiria ambos os analitos interagirem com a cabeça com um maior grau de liberdade. O que não acontece nas medidas em temperatura ambiente (Figura 7 e 8). Tal comparação entre monocamadas rígidas e fluidas será discutida em mais detalhes na análise das isotermas de DOPC.

Para sumarizar os resultados do lipídio DPPC na Figura 11 são apresentadas todas as isotermas π -A realizadas para o fosfolipídio DPPC, incluindo as análises em diferentes pHs (3 e 7,4) e em temperatura (37 °C).

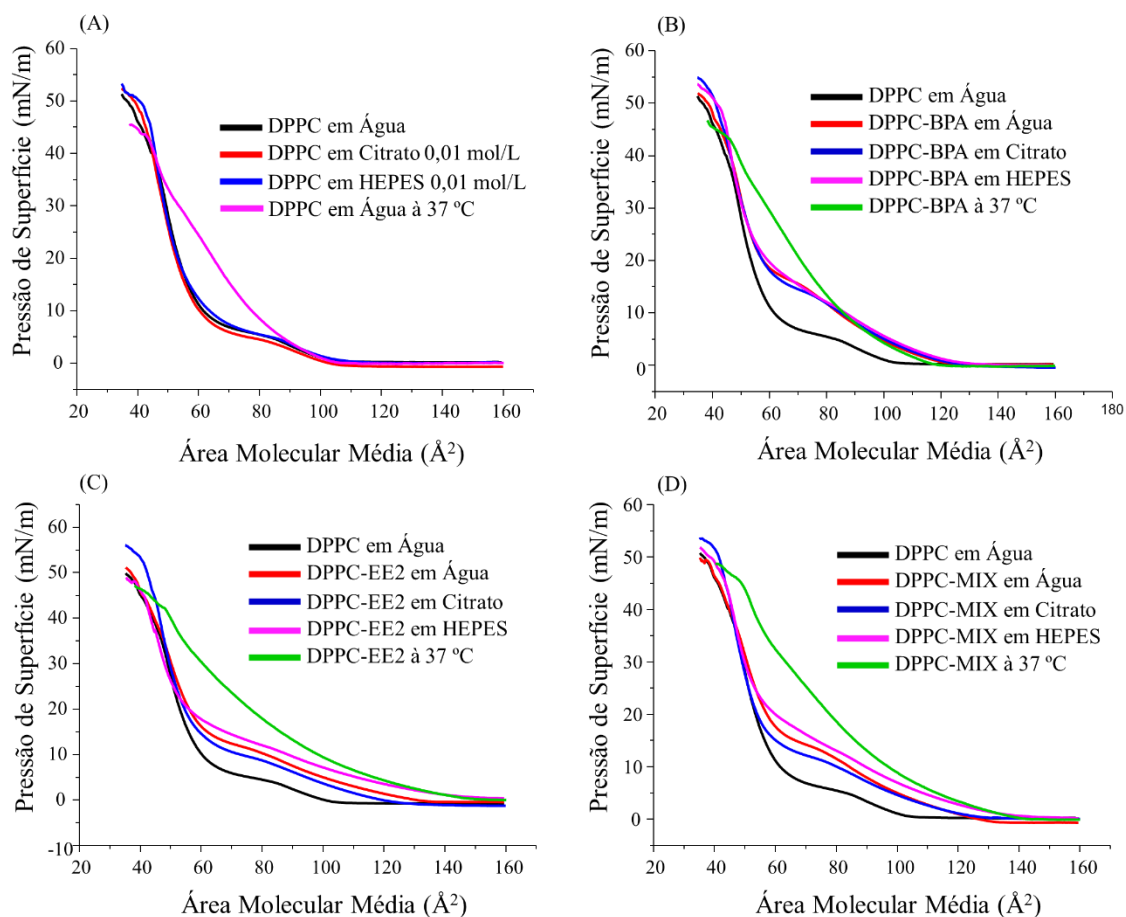


Figura 11: Isotermas π -A de DPPC obtidas em solução aquosa, tampão citrato, tampão HEPES e à 37 °C, para as subfases (A) sem os poluentes e na presença de 1×10^{-5} mol/L de (B) BPA, (C) EE2 e (D) MIX.

As isotermas obtidas para o DPPC na ausência dos poluentes na subfase (Figura 11 (A)) mostraram que a variação do pH não causou mudança na expansão e perfil das isotermas, para as concentrações utilizadas nos experimentos (concentração do tampão de 10 mM). Para as isotermas obtidas na presença do BPA, pode-se notar que a variação do pH não alterou a resposta obtida, uma vez que as isotermas apresentaram um perfil semelhante, indicando que o BPA não é alterado pela variação dos pH 3 e 7,4. Contudo, diferentemente do BPA, o EE2 demonstrou uma variação entre as diferentes soluções tampão, demonstrando uma dependência do pH e/ou da presença dos sais da solução tampão, o que causou uma expansão da isoterma para maiores áreas, assim como uma pequena mudança no perfil. Essas variações podem estar

relacionadas a presença de íons dos sais da solução tampão, o que pode ter facilitado um melhor empacotamento e reorganização da monocamada, assim como ligeiras alterações na desordem na região da cauda (Aroti *et al.*, 2004; Casillas-Ituarte *et al.*, 2010; Sovago *et al.*, 2007). Inclusive, tal variação também foi observada na mistura, o que reforça a hipótese de que tal efeito ocorre devido a uma mudança no EE2. Tal mudança, pode estar relacionada ao fato da molécula de EE2 possuir um maior volume (em questão de espaço) (Ahmed *et al.*, 2018; Pan e Xing, 2010), sendo assim, ocupando uma maior área entre as moléculas de DPPC, se comparado à molécula do BPA, que permaneceu entre as moléculas de DPPC sem causar a mesma expansão que o EE2.

Para se obter maiores informações sobre possíveis mudanças na elasticidade da monocamada, foram obtidos os valores de módulo compressional a partir dos dados das Figura 7, 8 e 10. Na Figura 12 são apresentados os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio DPPC nas subfases de água ultrapura, BPA, EE2 e MIX.

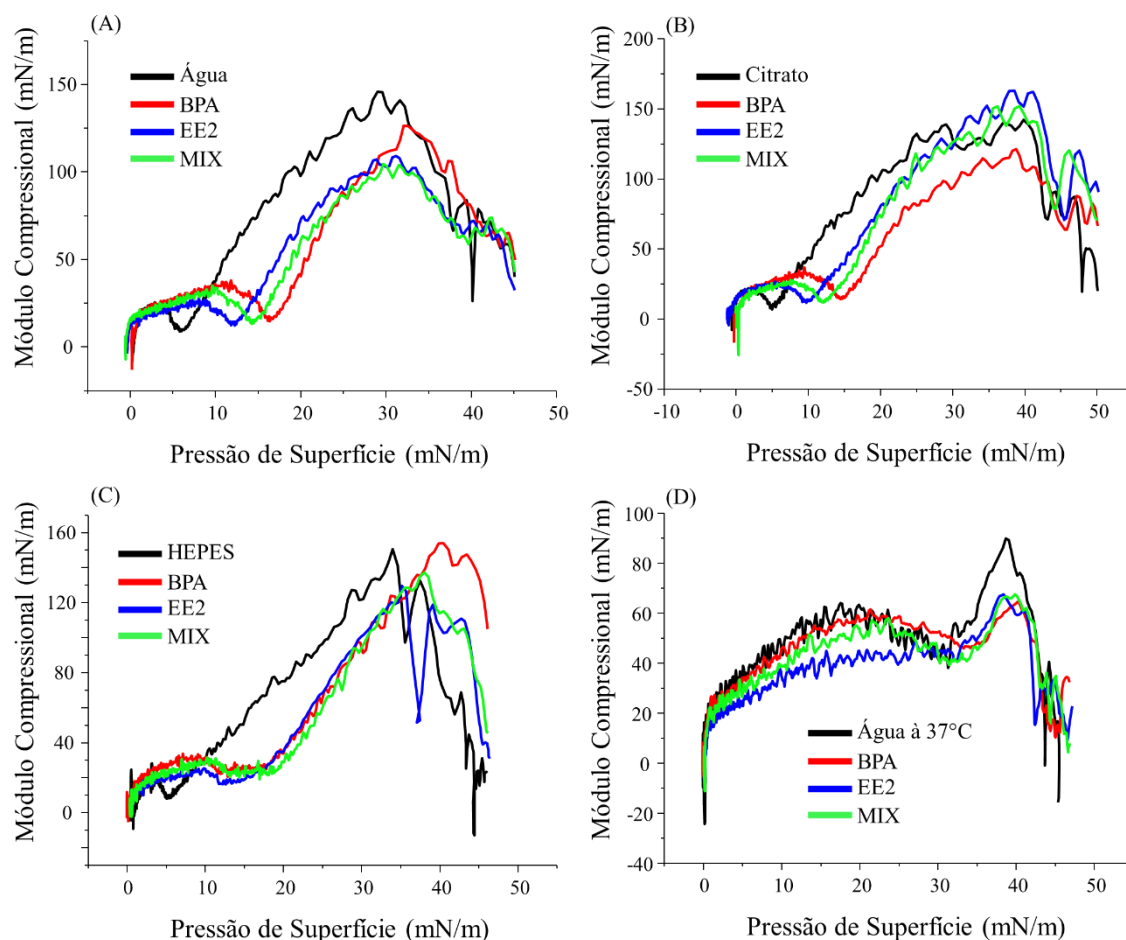


Figura 12: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DPPC para as subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Para os sistemas em (A) água ultrapura, (B) citrato, (C) HEPES e (D) à 37 °C

O DPPC em subfase aquosa apresentou um resultado coerente com o que é reportado na literatura (Wang e Yang, 2009). Os valores obtidos estão dentro da faixa da fase líquido-condensada referente ao intervalo de C_s^{-1} entre 100 e 250 mN/m (Davies e Rideal, 1963). De forma geral, para as análises à temperatura ambiente, a inserção dos poluentes causou uma diminuição dos valores de C_s^{-1} , o que indica um aumento da elasticidade. Contudo, não se observa um padrão claro nos resultados. Por exemplo, nas amostras em tampão HEPES as curvas estão muito próximas umas das outras, principalmente se olharmos para a pressão de 30 mN/m, uma vez que esse valor de pressão é biologicamente relevante, devido ao fato de que

lipídios em membranas celulares possuem valores pressão lateral em torno de 30 mN/m (Marsh, 1996). Para o tampão citrato o BPA apresentou uma maior variação na compressibilidade se comparado as outras subfases, ficando com valores de C_s^{-1} ligeiramente abaixo do intervalo da fase líquido-condensada (~99 mN/m). Estes resultados demonstram que não há um padrão de resposta nos valores de módulo compressional. No entanto, isso não quer dizer que a fluidez não é fator importante na interação, pois vimos que para as isotermas à 37 °C (monocamada mais fluida) a mudança foi maior se comparada as análises à temperatura ambiente (monocamada mais rígida) (Khattari, Maghrabi e Al-Abdullah, 2015).

Para as análises à 37 °C, o perfil da curva de módulo compressional se alterou, devido ao aumento da fluidez causado pelo aumento da temperatura. Além disso os valores ficaram abaixo do intervalo de 100-250 mN/m, o que indica que o lipídio não atingiu a fase líquido-condensada (Davies e Rideal, 1963), permanecendo na fase líquido-expandida (12,5-50 mN/m). Vale notar ainda que a temperatura de transição de fase do DPPC é de 41,3 °C (T_m), ou seja, para que o lipídio altere sua estruturação da fase gel (L_β) para a fase líquido-cristalina (L_α) é necessário que este valor esteja acima da T_m (Nagarajan *et al.*, 2012). Com a inserção dos poluentes os valores de C_s^{-1} diminuíram ainda mais, o que indica um incremento na elasticidade da monocamada, em especial para o EE2 que apresentou a maior queda, seguido pela MIX. Isso indica que essa diminuição é uma influência do EE2, visto que o BPA apresentou a menor variação no valor de C_s^{-1} se comparado ao DPPC em água. Essa variação maior por parte do EE2, pode estar relacionada ao uma maior presença do analito no início da compressão, o que levou a uma maior elasticidade da monocamada durante da compressão da isoterma.

4.2.3. DOPC

Na Figura 13 (A) são apresentados os resultados das isotermas π -A para o fosfolipídio DOPC na ausência e presença dos disruptores endócrinos, todas realizadas em temperatura

ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) e com a mesma concentração dos poluentes (1×10^{-5} mol/L). A Figura 13 (B) mostra o gráfico dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases.

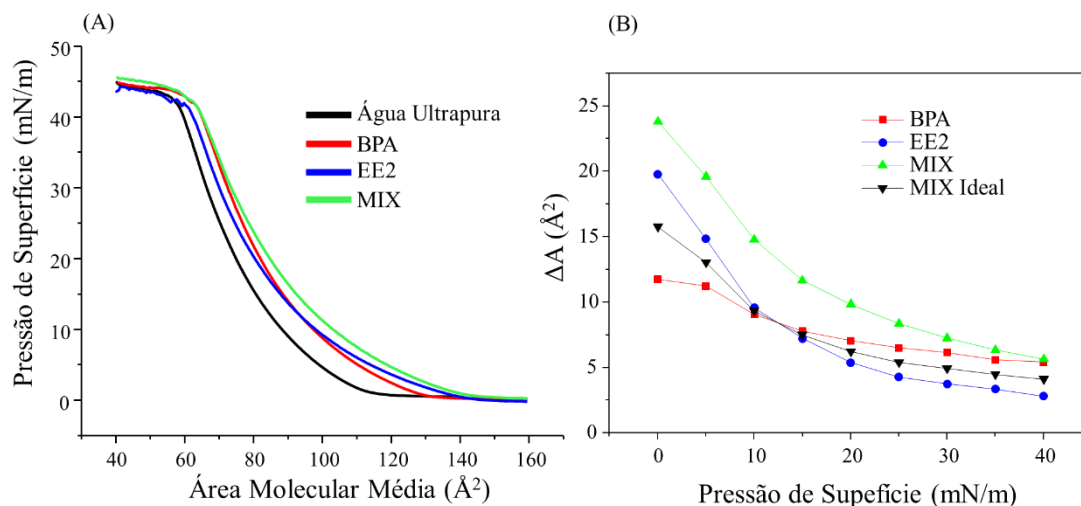


Figura 13: (A) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à temperatura ambiente e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

O resultado obtido para as isotermas π -A em subfase aquosa para o DOPC é similar aos resultados encontrados na literatura (Sanver *et al.*, 2016) com valor de área extrapolada de 90 Å², possuindo na pressão de 30 mN/m um valor de área de 66 Å².

De forma geral todas as subfases causaram uma expansão da isoterma para maiores valores de área durante toda a compressão. Isso indica que os poluentes estão presentes na interface ar-água, mesmo nas maiores pressões de superfície. No entanto é possível observar através da Figura 13 (B) que o BPA e o EE2 apresentam um comportamento interessante. Note que o EE2 no início da compressão apresenta uma maior expansão de área se comparado ao BPA (ΔA de 20 e 12 Å², respectivamente). Conforme a compressão da monocamada ocorre o BPA passa a apresentar uma maior variação se comparado ao EE2. Na pressão de 40 mN/m o BPA apresenta um valor de ΔA de 5,5 Å², enquanto o EE2 apresenta um valor de 3 Å². Esta maior

expansão do EE2 no início da compressão pode ser comparada com os resultados obtidos para o DPPC à 37 °C, em ambos os casos as monocamadas possuem um maior grau de liberdade, ou seja, há mais espaços entre as cabeças dos lipídios. Logo, permitindo que poluente permaneça na interface ar-água. Outro estudo realizado em monocamadas mais fluidas foi realizado por Ruiz *et al.* (Ruiz et al., 2021), neste estudo a exposição do EE2 ao POPC induziu uma expansão da monocamada similar aos resultados obtidos para o DOPC. Os autores atribuíram essa mudança a única insaturação presente na cadeia hidrofóbica POPC, o que dificulta o empacotamento da monocamada, diminuindo sua compressibilidade, o que parece ser um fator primordial para a maior interação com o hormônio.

No resultado experimental obtido para a MIX a isoterma apresentou uma maior expansão do que os poluentes separados, divergindo assim de uma mistura ideal, como mostrado pela curva preta da Figura 13 (B). Isso pode indicar que a MIX apresenta um efeito sinérgico, ou seja, seu efeito em conjunto é maior do que os efeitos dos poluentes separados. Tanto o DPPC quanto o DOPC possuem a mesma cabeça lipídica, a diferença reside na região da cauda. Tal expansão pode ser atribuída a uma maior fluidez da monocamada o que permite uma maior facilidade do analito se posicionar na região da cabeça. E uma vez que o DOPC é menos rígido e menos empacotado, o mesmo não expulsa as moléculas do poluente da monocamada. Sabe-se que o BPA e EE2 não interagem entre si na MIX, logo o efeito sinérgico observado nas isotermas da Figura 13 (A) não é relacionado a interação dos analitos na subfase, mas sim dos analitos com a monocamada. Sendo assim, é possível que a fase líquido-expandida da monocamada permita que ambos os poluentes permaneçam na interface ao mesmo tempo, contribuindo assim de uma forma maior para a expansão da monocamada. Um efeito menos expressivo foi observado nas análises em temperatura ambiente para o DPPC devido a rigidez do lipídio o que impede que ambos contribuam de forma conjunta. Observa-se ainda que a MIX contém um início da compressão similar ao EE2 e um término parecido com

o do BPA. Nos resultados obtidos durante o meu mestrado, o DOPC também apresentou uma expansão maior para a mistura dos poluentes do que ambos os compostos separados. No entanto, se tratava de uma mistura que os compostos da subfase interagem quimicamente. Isso levou a um deslocamento proporcionalmente maior, se comparado ao presente estudo. Por exemplo, a diferença entre os valores de ΔA para o BPA e a MIX na pressão de 30 mN/m é quase nula, porém para a mistura estudada anteriormente esse valor aumentou para quase 5 Å² ($\Delta A_{AM} = 7$ e $\Delta A_{MIX} = 10$ – valores do mestrado). As análises das interações serão feitas em detalhes na seção do PM-IRRAS.

Nas Figuras 14 (A) e (C) são apresentados os resultados das isotermas π -A nas soluções tampão de citrato (pH 3) e HEPES (pH 7,4) ambas com concentração de 0,01 mol/L, 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^{-5} mol/L). Nas Figura 14 (B) e (C) são apresentados os gráficos dos valores de diferença de área em função da pressão de superfície para cada uma das diferentes subfases nas soluções tampão de citrato e HEPES.

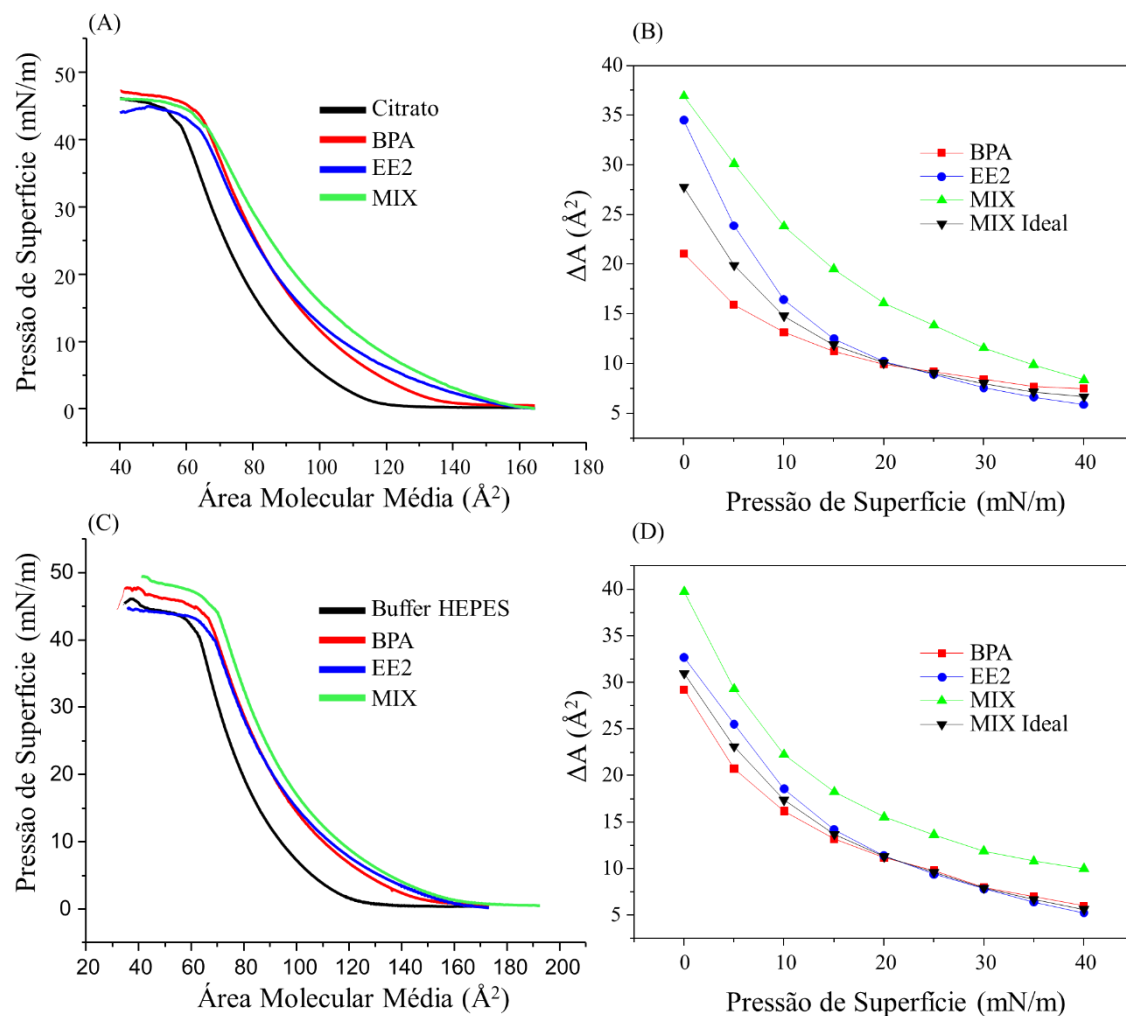


Figura 14: Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à temperatura ambiente para as soluções tampão (0,01 mol/L) de (A) citrato e (C) HEPES. Valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases nas soluções tampão de (B) citrato e (D) HEPES.

As isotermas obtidas para as soluções tampão apresentaram um resultado coerente com o reportado na literatura para o DOPC (Pazin *et al.*, 2021), com valores de área extrapolada de 92 e 95 Å² para os pHs 3 e 7,4, respectivamente. Para a análise na presença dos disruptores endócrinos, um resultado similar ao obtido para a solução aquosa foi observado. A inserção do BPA e EE2 causou uma expansão para maiores áreas durante toda a compressão. Inclusive com o mesmo padrão de resposta com o EE2 apresentando uma maior expansão no início da

compressão e o BPA com uma maior no término. O mesmo tipo de expansão em isotermas de DOPC no pH 7,4 foi observado no trabalho de Pazin *et al.* (Pazin *et al.*, 2021), na qual foi estudada a influência que a artepelin C (um dos compostos presentes na própolis verde) tem sobre monocamadas mais fluidas. Os autores argumentam que as monocamadas DOPC menos compactadas permitiram uma maior penetração da artepelin C, resultando em maior expansão nas isotermas π -A, principalmente se comparado ao DPPC, como foi estudado pelos autores em outro estudo (Pazin *et al.*, 2019)

Além do mesmo padrão de resposta para os poluentes separados, o mesmo comportamento sinérgico por parte da MIX foi observado. Apesar da mudança dos pHs, nenhuma dos poluentes apresentou mudança em sua estrutura, pois tanto o BPA, quanto o EE2 apresentam valores de pKa próximos de 10. Assim como os lipídios apresentam um valor de pKa bem baixo (~ 1). Ou seja, essa mudança reside provavelmente na maior fluidez da monocamada de DOPC, assim como discutido anteriormente.

Na Figura 15 são apresentados os resultados das isotermas π -A realizadas na temperatura de 37 °C, para o fosfolipídio DOPC na ausência e presença dos três poluentes, todas realizadas com a mesma concentração dos poluentes (1×10^{-5} mol/L).

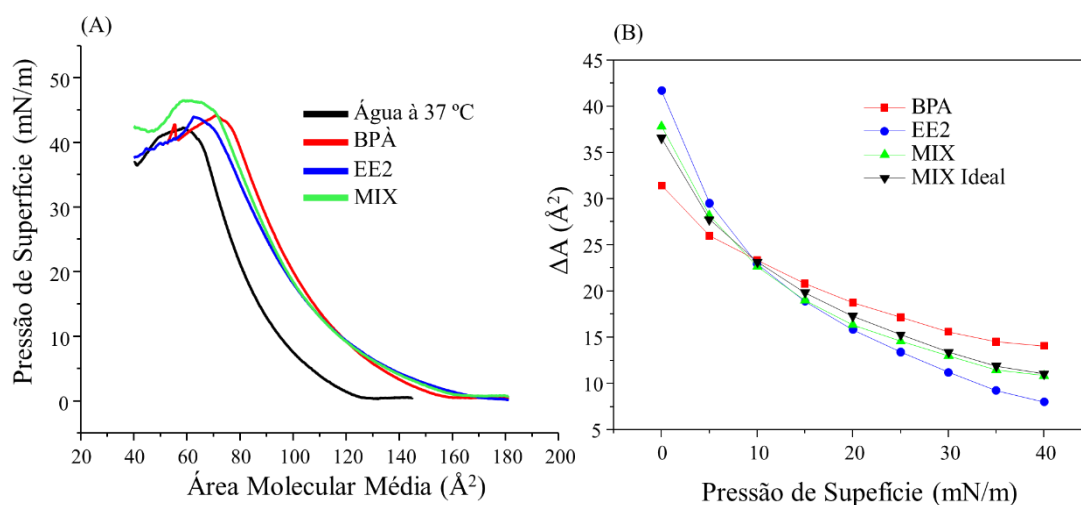


Figura 15: (A) Isotermas π -A de DOPC obtidas para as diferentes subfases com concentração de 1×10^{-5} mol/L, obtidas à 37 °C e (B) valores de diferença de área (ΔA) para as diferentes subfases.

Na temperatura de 37 °C o DOPC se encontra em sua fase líquido-cristalina devido a sua temperatura transição de fase (T_m) ser em -16 °C (A~ta *et al.*, 1994). Logo, as isotermas de DOPC não apresentam uma variação no perfil, assim como reportado na literatura (Li *et al.*, 2020), com valor de área extrapolada de $98 \text{ \AA}^2$. As isotermas obtidas a 37 °C para o BPA e EE2 apresentaram uma expansão para maiores áreas através de toda a compressão, de forma similar aos resultados anteriormente discutidos. Além disso, o mesmo padrão de maior expansão do EE2 no início da compressão e consequente inversão para um maior deslocamento do BPA nas pressões mais alta foi observado.

No entanto, a MIX apresentou um comportamento diferente das análises anteriores do DOPC. Em 37 °C a MIX apresentou uma característica de uma mistura ideal, como pode ser observado na Figura 15 (B), as curvas verde e preta apresentaram perfis similares, o que indica que a amostra não apresentou um efeito sinérgico como observado anteriormente. Tal resultado é conflitante com o observado até então, no entanto, a temperatura pode ter influenciado numa melhor organização das moléculas, devido a maior agitação do sistema, gerando assim uma estruturação mais otimizada das moléculas dos poluentes, uma vez que processos de reestruturação são dependentes da temperatura (Kamilya e Talapatra).

Na Figura 16 são apresentadas todas as isotermas π -A realizadas para o fosfolipídio DOPC, incluindo as análises em soluções tampão (citrato e HEPES) e em temperatura (37 °C).

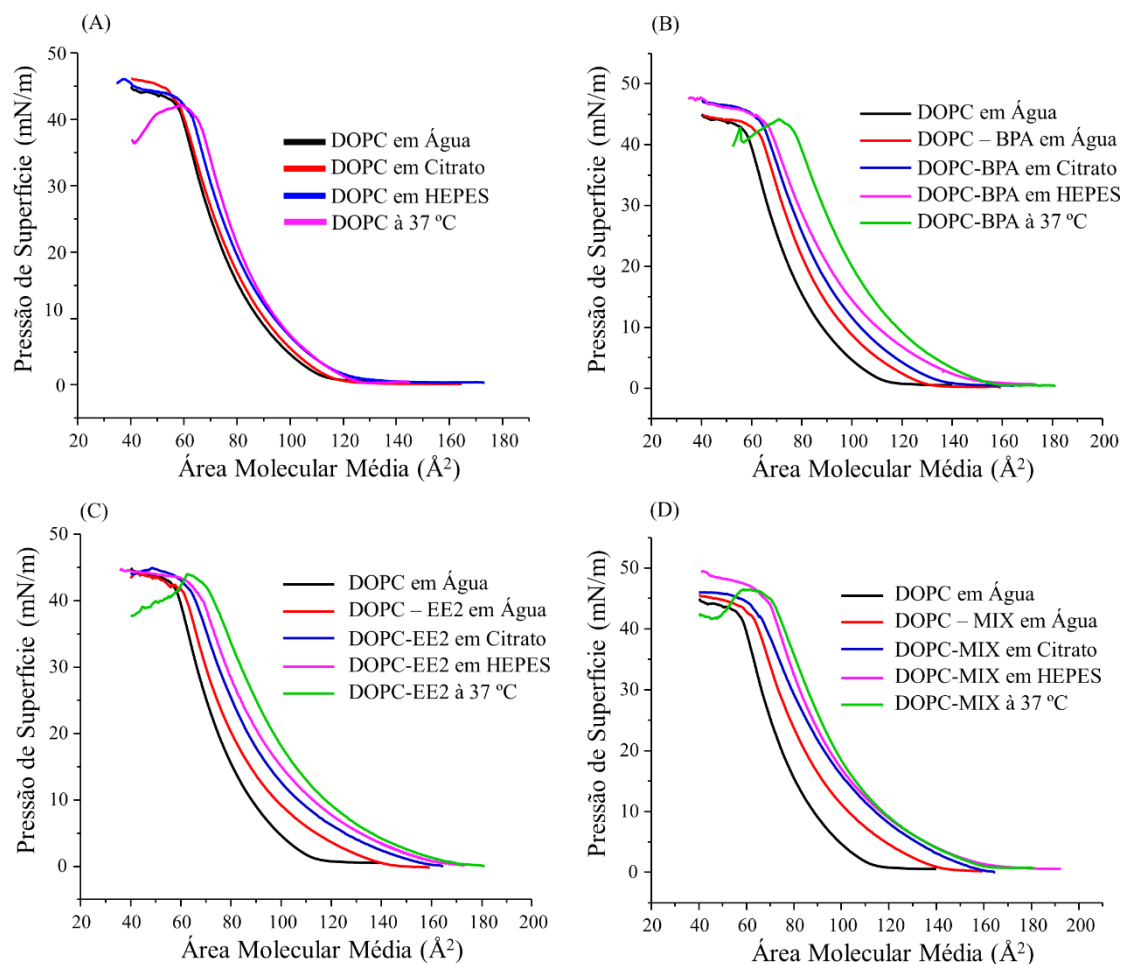


Figura 16: Isotermas π -A de DOPC obtidas em solução aquosa, tampão citrato, tampão HEPES e à 37 °C, para as subfases (A) sem os poluentes e na presença de 1×10^{-5} mol/L de (B) BPA, (C) EE2 e (D) MIX.

As isotermas obtidas para o DOPC na ausência dos poluentes na subfase (Figura 16 (A)) mostrou que a presença das soluções tampão de citrato e HEPES, não causaram uma mudança na expansão e perfil das isotermas, assim como é reportado na literatura para as concentrações utilizadas nos experimentos (10 mM) (Pazin *et al.*, 2019). Pode-se observar que a inserção das soluções tampão causaram um mínimo deslocamento nas isotermas, principalmente se comparado com as análises na presença dos poluentes. De mesma forma para as análises à 37 °C, devido ao lipídio não apresentar uma transição de fase.

De modo geral, a inserção dos poluentes causou expansões para maiores áreas em todas as análises. No entanto, pode se notar que dentre as amostras em diferentes pHs, as isotermas em 7,4 deslocaram-se mais do que as amostras no pH 3, e da mesma forma como havíamos discutido, tal mudança não deve estar relacionada a variação no pH, mas sim pela presença dos sais do tampão, pois tanto os analitos, quanto os lipídios não têm suas moléculas alteradas nesse intervalo. Além disso, a análise em temperatura causou a maior expansão entre todas as amostras, devido a maior agitação do sistema.

Na Figura 17 são apresentados os gráficos de módulo compressional por pressão de superfície para o lipídio DOPC nas subfases de água ultrapura, BPA, EE2 e MIX, sendo esta análise realizada utilizando os dados das isotermas mostrados anteriormente.

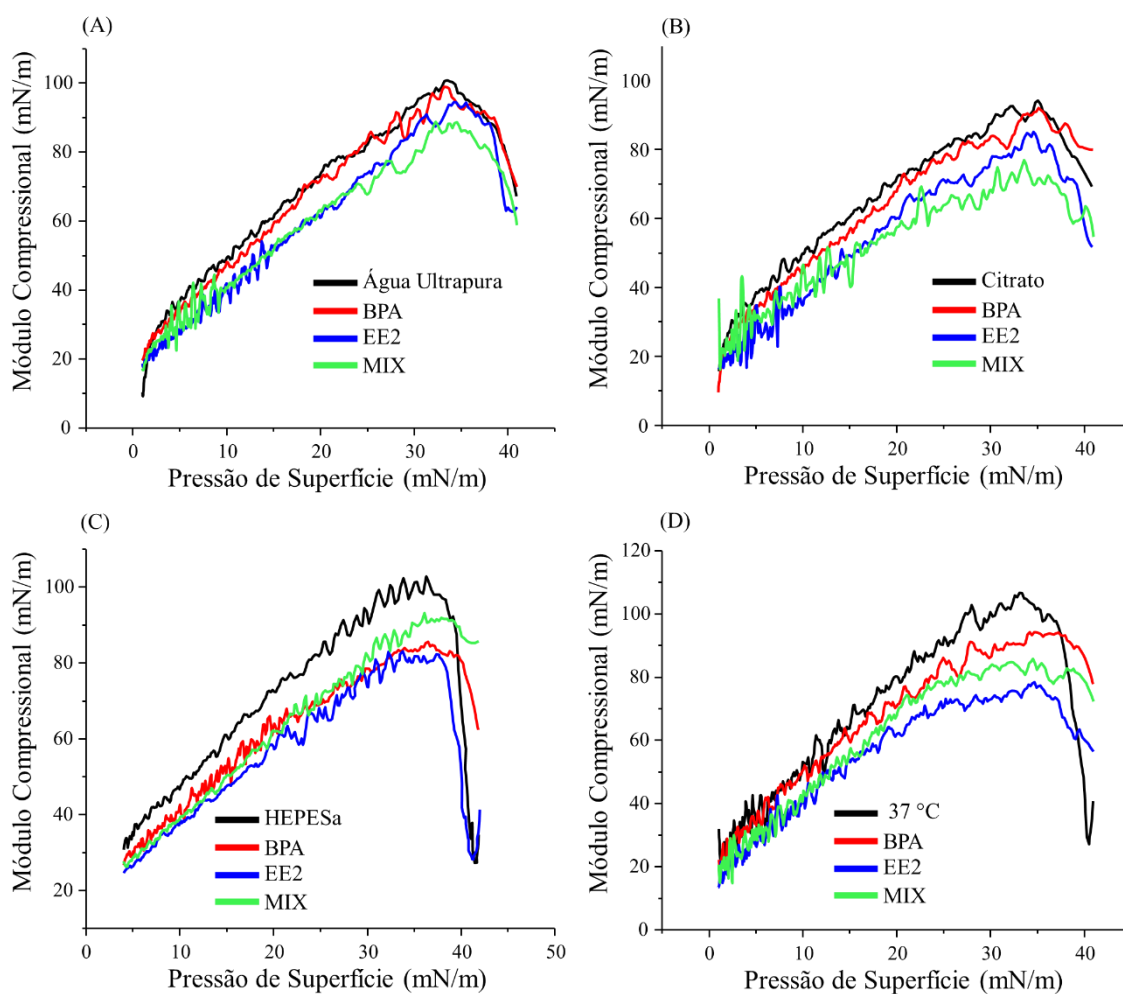


Figura 17: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC para as subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX. Para os sistemas em (A) água ultrapura, (B) citrato, (C) HEPES e (D) à 37 °C

Para o DOPC, um resultado semelhante ao de módulo compressional reportado na literatura foi observado (Hac-Wydro *et al.*, 2007), com valores de C_s^{-1} de próximos a 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. De forma geral, todas as subfases apresentaram ligeiras mudanças nos valores de compressibilidade. Em todas as amostras o EE2 apresentou um maior aumento na elasticidade se comparado com o BPA. Assim como observado para a análise do DPPC à 37 °C, que também possui uma maior fluidez, ou seja, o EE2 parece induzir uma maior fluidez em monocamadas menos rígidas. Duas possibilidades podem ter contribuído para a maior elasticidade da monocamada. Uma delas reside no fato que em todas as isotermas de DOPC o EE2 apresentou a maior expansão durante o início das compressões. E, se compararmos os valores no final da compressão, nota-se a atenuação da curva da isoterma se comparado com o BPA, o que explica a variação na compressibilidade. Um comportamento similar foi observado por Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2021) para o lipídio POPC, onde também ocorreu uma expansão para maiores áreas, principalmente no início da compressão. Os autores atribuíram a mudança à única insaturação presente na cadeia hidrofóbica do POPC, dificultando assim o empacotamento da monocamada, diminuindo sua compressibilidade que parece ser um fator primordial para a maior interação com o hormônio. A MIX apresentou um aumento na elasticidade se comparado com o DOPC puro, no entanto, não se observou um padrão claro nos resultados se comparados aos resultados dos poluentes separados.

4.3. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

Antes do estudo da influência dos disruptores endócrinos na morfologia da monocamada, foram capturadas imagens das subfases na ausência dos lipídios na interface ar-água, devido principalmente ao BPA possuir atividade superficial (como observada na Figura 5). A Figura 18 mostra as imagens obtidas para cada subfase (BPA, EE2 e MIX) sem a presença do DPPC na interface.

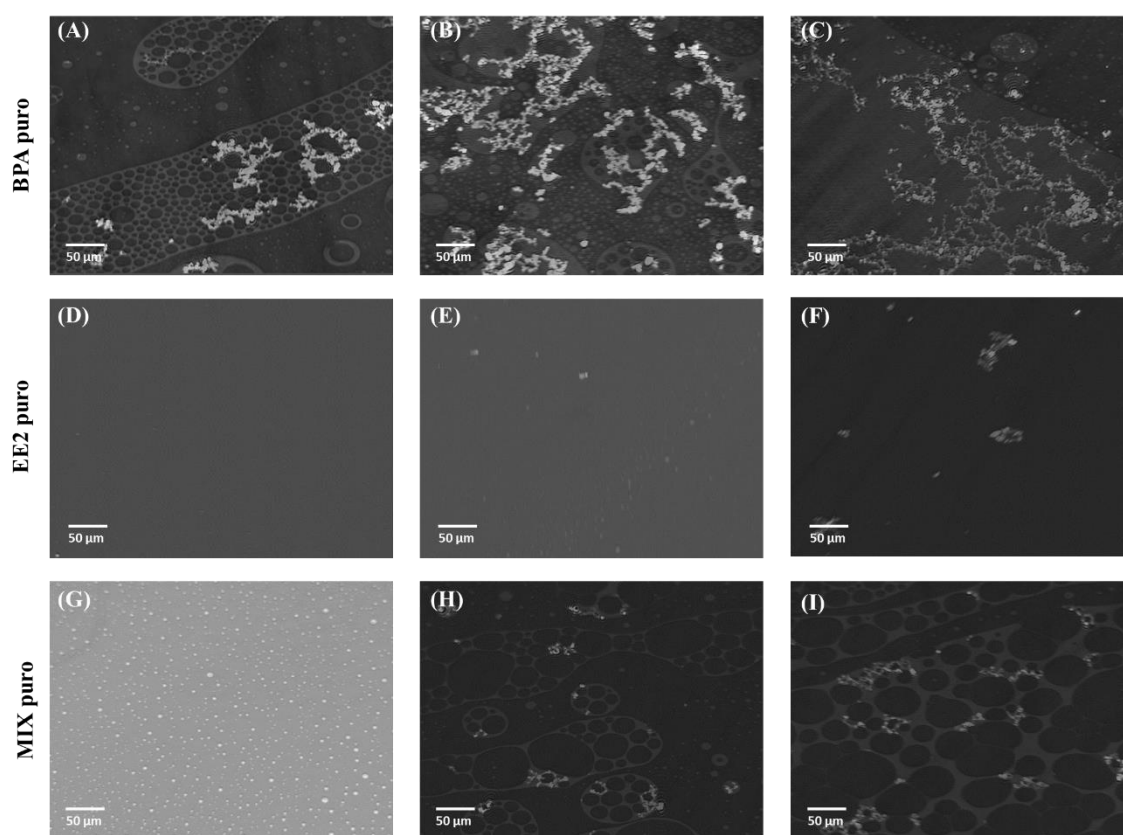


Figura 18: Imagens de BAM para as subfases de (A) BPA, (B) EE2 e (C) MIX sem a presença do lipídio.

As imagens de BAM obtidas para o BPA comprovam a atividade superficial observada na Figura 5, devido ao aparecimento de agregados “brancos” (agregados de maior refletividade) na subfase de BPA sem a presença do lipídio na interface. No entanto, não se obteve um

aumento dos valores de pressão, devido ao espaço requisitado para a realização das medidas do BAM ser maior, o que impossibilitou a compressão total das barreiras. A MIX também apresentou a formação de alguns agregados, porém em uma quantidade menor, devido a diferença na quantidade de moléculas em relação ao BPA puro. O EE2 não apresentou nenhum perfil de formação de domínios ou agregados.

Na Figura 19 são apresentadas imagens obtidas por microscopia BAM em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$), para monocamadas de DPPC próximo às pressões de 10, 20 e 30 mN/m nas subfases de água ultrapura e em soluções 1×10^{-5} mol/L dos poluentes BPA, EE2 e MIX.

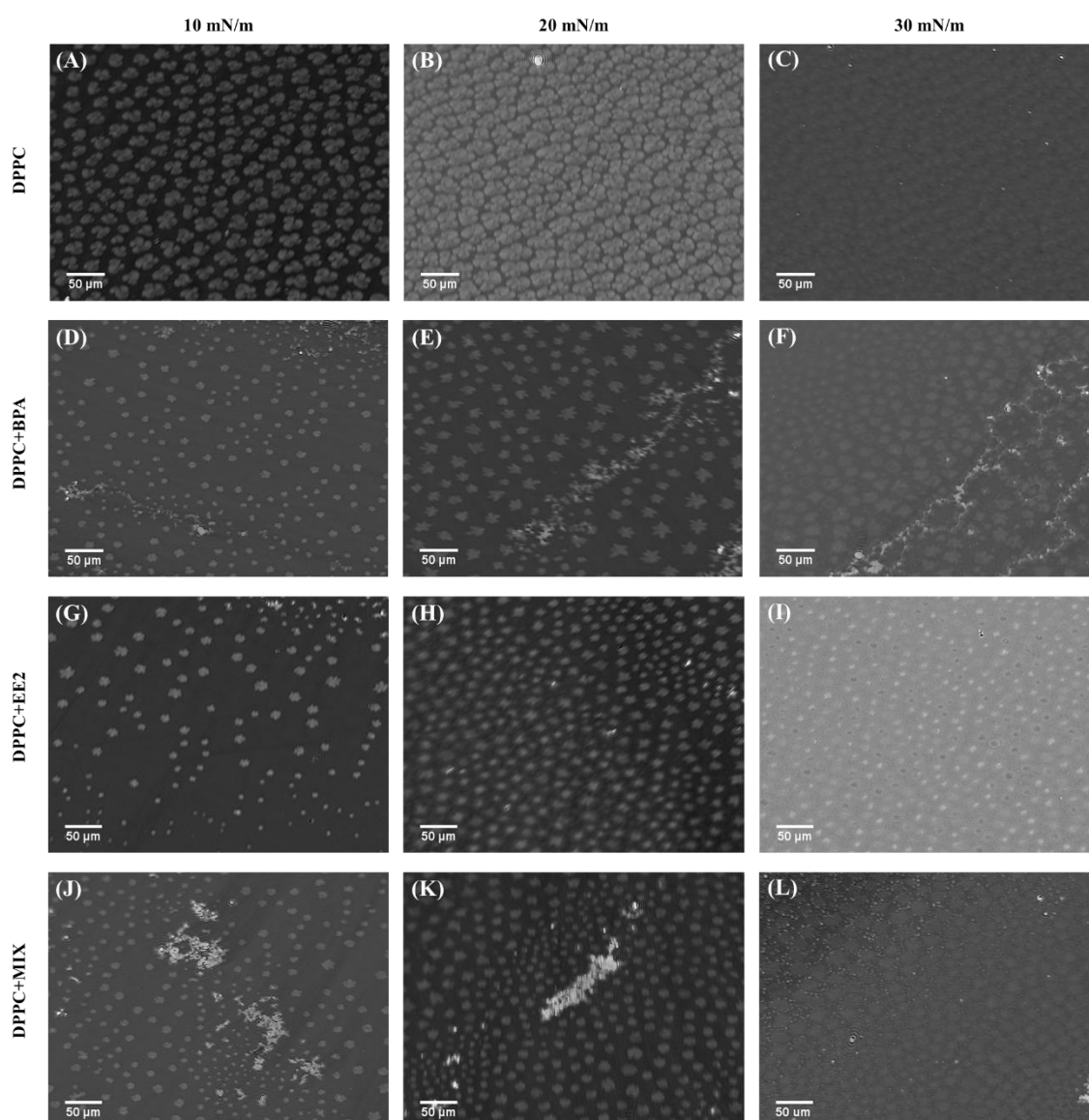


Figura 19: Imagens de BAM para o DPPC nas subfases aquosa (A)(B)(C), BPA (D)(E)(F), EE2 (G)(H)(I) e MIX (J)(K)(L).

Os resultados de BAM para o DPPC em subfase aquosa são similares aos resultados encontrados na literatura (Mariani, Sánchez-Borzone e García, 2016), apresentando a formação de domínios referentes à fase líquido-expandida (Figura 19 (A)), atingindo a fase líquido-condensada, e em seguida a homogeneidade lipídica na pressão de 30 mN/m, correspondente à fase condensada da monocamada.

Os domínios lipídicos de DPPC normalmente apresentam uma forma conhecida como “formato de trevo” durante as pressões de superfície mais baixas (de aproximadamente 5 até 20 mN/m). Com a inserção do BPA na subfase, nota-se que ocorreu uma mudança tanto no formato, quanto no tamanho dos domínios, o que indica que o BPA afeta a morfologia da monocamada. Além disso, nota-se a presença de pequenos agregados, entre as estruturas dos domínios. Tais agregados são atribuídos ao BPA, uma vez que sabemos que o mesmo possui atividade superficial e que os agregados possuem um formato parecido com o do BPA observado na Figura 18. Um resultado semelhante foi observado por Broniatowsky *et al.* (Broniatowski *et al.*, 2016), onde foi avaliada a influência do BPA na morfologia de monocamadas de fosfatidilgliceróis e cardiolipinas. A mesma característica de formação de agregados na pressão de *onset* foi observada, porém os autores não atribuíram tal alteração diretamente ao BPA, mais sim a um efeito induzido pelo BPA no lipídio.

As imagens obtidas para as amostras expostas ao EE2 apresentaram uma similaridade aos dados obtidos para o BPA, com a alteração do tamanho e formato dos domínios lipídicos, no entanto o EE2 não apresentou a formação dos mesmos agregados atribuídos ao BPA. Os resultados obtidos para o EE2 foram bem similares aos observados durante o meu mestrado, onde a presença dos poluentes também induziu alterações na morfologia (mudança nos

domínios com formato de “trevo” do DPPC). Um resultado similar foi observado por Lopes *et al.* (Lopes *et al.*, 2017), onde a inserção do antibiótico amoxicilina na monocamada de DPPC induziu mudanças no formato de trevo dos domínios. Os autores argumentam que a presença do antibiótico causou a geração de diferentes domínios lipídicos devido a reestruturações da monocamada.

A MIX seguiu o mesmo perfil de alteração observados para os poluentes separados (variação do tamanho e formato dos domínios). Inclusive, observa-se os mesmos agregados presentes nas amostras de BPA, o que reforça a hipótese de que os agregados sejam realmente um efeito causado pela presença do BPA.

Na Figura 20 são apresentadas imagens obtidas por microscopia BAM em temperatura ambiente ($\sim 23\text{ }^{\circ}\text{C}$), para monocamadas de DOPC próximo às pressões de 10, 20 e 30 mN/m nas subfases de água ultrapura e em soluções 1×10^{-5} mol/L dos poluentes BPA, EE2 e MIX.

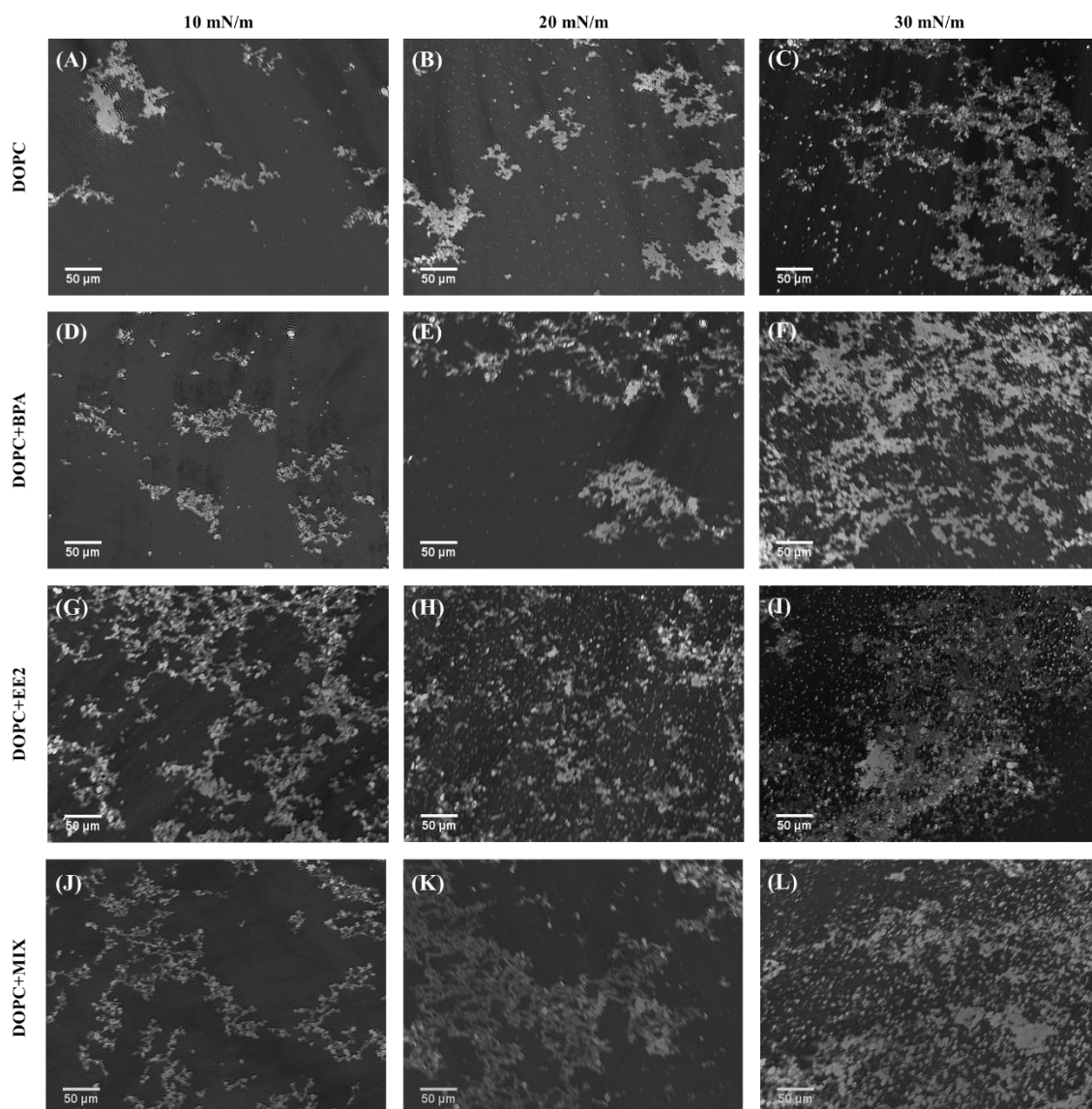


Figura 20: Imagens de BAM para o DOPC nas subfases aquosa (A)(B)(C), BPA (D)(E)(F), EE2 (G)(H)(I) e MIX (J)(K)(L).

Os resultados de BAM para o DOPC em subfase aquosa são similares aos resultados encontrados na literatura (Jr *et al.*, 2009), apresentando a formação de pequenos domínios lipídicos em pressões mais baixas (Figura 20 (A)), e maiores conforme a pressão superficial aumenta (Figura 20 (B) e (C)).

Os domínios lipídicos do DOPC não apresentam um formato característicos como DPPC. Sendo assim, a inserção dos poluentes não causou a variação visual como a observada

para o DPPC. Os resultados foram semelhantes entre si, sem variação no formato ou homogeneidade da monocamada. Além disso, mesmo as amostras que continham BPA não apresentaram mudanças visíveis, uma vez que os agregados observados para o BPA possuem um tamanho e formato parecido, o que torna a comparação inconclusiva. Apesar disso, no trabalho de Broniatowski *et al.* (Broniatowski *et al.*, 2016) foi estudada a influência do BPA e seus derivados em modelos de membrana de lipídios (Maximino *et al.*, 2021) aniônicos saturados (DSPG). Nos resultados obtidos para o BAM, um comportamento semelhante (o aparecimento de agregados similares ao BPA) pode ser observado em 0 mN/m. No entanto, os autores atribuíram o surgimento dos domínios a uma influência do BPA sobre o lipídio, ao invés de atribuir a presença do próprio composto na interface. Nossos estudos anteriores usando BPA e o lipídio DPPC (Maximino *et al.*, 2021), observamos que o BPA tem atividade de superfície e um comportamento semelhante na análise de BAM durante as mesmas pressões de superfície (0 mN/m) sem a presença do lipídio (Figura 18).

4.4. PM-IRRAS

Na Figura 21 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, BPA, EE2 e MIX, no intervalo de 900 a 1800 cm⁻¹.

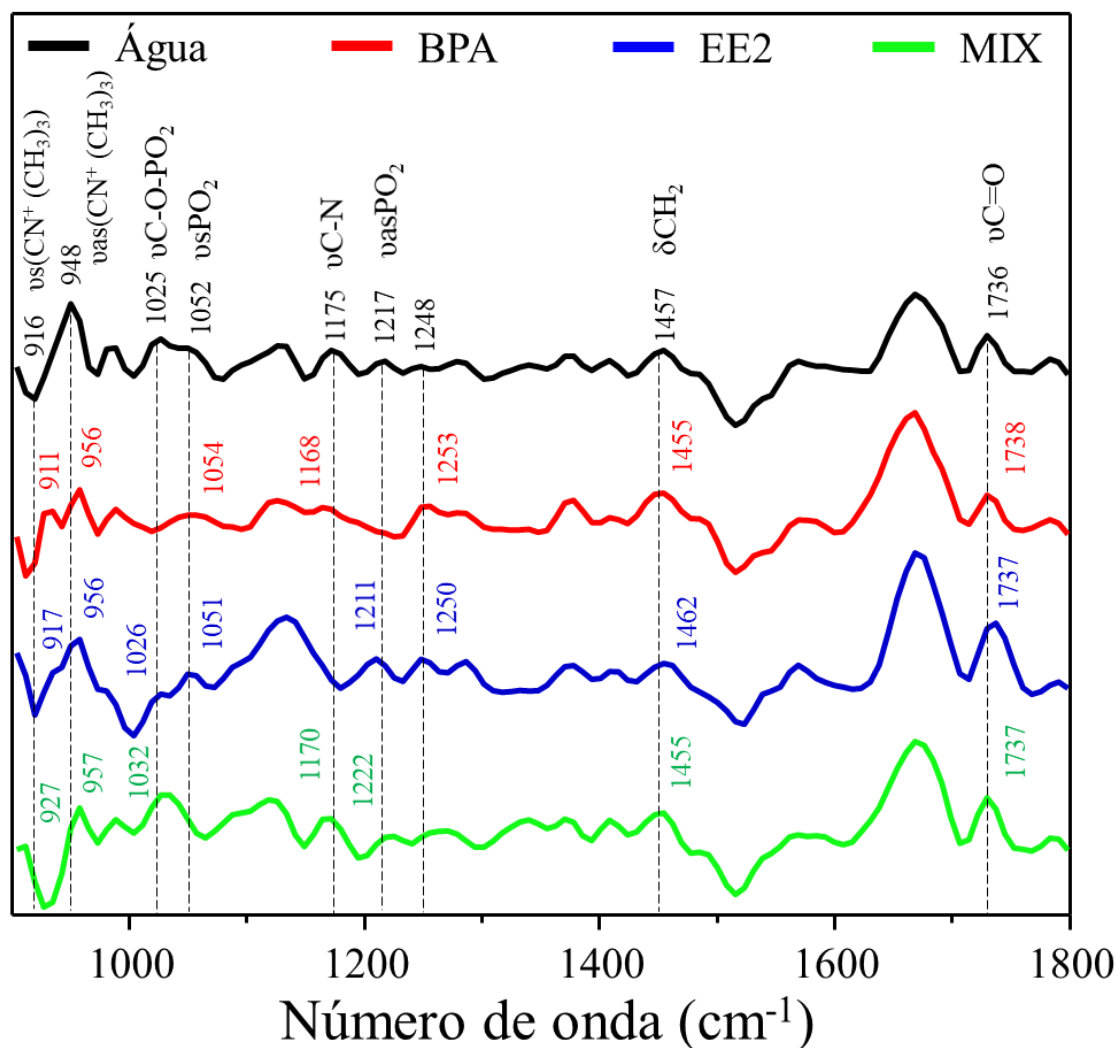


Figura 21: Espectros PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosas e dos poluentes BPA, EE2 e MIX com concentração de 1×10^{-5} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.

O espectro de PM-IRRAS para a subfase de água ultrapura (Figura 21) apresentou as bandas características do DPPC tradicionalmente reportadas na literatura (Aoki et al., 2013; Pavinatto et al., 2016). Nota-se a presença do estiramento (ν) do grupo carbonila ($C=O$, 1736cm^{-1}), a deformação angular (δ) do grupo CH_2 (1457cm^{-1}), além das bandas simétrica (ν_s) e antissimétrica (ν_{as}) do grupo fosfato ($P=O$, $\nu_s = 1052\text{cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1217\text{cm}^{-1}$), assim com as bandas ν_{CO-PO_2} (1025cm^{-1}) e ν_{C-N} (1175cm^{-1}) e ainda as atribuições do grupo colina simétrico ($\nu_s(CN^+(CH_3)_3)$, 916cm^{-1}) e antissimétrico ($\nu_{as}(CN^+(CH_3)_3)$, 948cm^{-1}).

Na presença do BPA notou-se mudança em diferentes bandas, principalmente relacionadas com o grupo fosfato. As bandas $\nu_{\text{C-O-PO}_2}$ e $\nu_{\text{asP=O}}$ apresentaram uma perda de intensidade, ao ponto de não serem observadas no espectro. Além disso, ocorreram deslocamento no grupos $\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ (de 948 a 956 cm^{-1}) e $\nu_{\text{C-N}}$ (de 1175 a 1168 cm^{-1}). Tais mudanças podem ser atribuídas a uma interação entre o BPA e a cabeça do lipídio. Provavelmente a interação envolve parte do grupo fosfato devido às mudanças observadas, sendo assim, presume-se que uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fosfato do DPPC e o hidrogênio do grupo fenol do BPA esteja ocorrendo. Este tipo de interação é amplamente discutido na literatura em estudos de monocamadas afetadas por poluentes. Por exemplo, Hac-Wydro *et al.* (Hac-Wydro, Połec e Broniatowski, 2019) estudou os efeitos do BPA e seus derivados em diversas monocamadas, inclusive a de POPC. Os autores chegaram a uma conclusão similar, sendo que o BPA interage com a cabeça dos lipídios via interações de hidrogênio.

Para o EE2 também se observou mudanças em múltiplos grupos, porém as variações foram menores do que o observado para o BPA. Ocorreram deslocamentos nos grupos antissimétricos dos grupos colina (de 948 para 956 cm^{-1}) e fosfato (de 1217 para 1211 cm^{-1}) assim como uma perda de intensidade/desaparecimento da banda $\nu_{\text{C-N}}$ (anteriormente em 1175 cm^{-1}). Tais mudanças indicam uma possível interação do EE2 com o grupo colina do DPPC. Possivelmente, a interação ocorre devido a uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fosfato e alguma das hidroxilas do EE2. Contudo, vale ressaltar que as mudanças observadas nos grupos colina e C-N podem estar associadas a uma mudança na conformação da cabeça do lipídio (Maximino *et al.*, 2019; Zawisza *et al.*, 2007; Zawisza, Bin e Lipkowski, 2007). Outra possibilidade é que tal mudança pode estar relacionada às interações eletrostáticas entre o grupo colina (parcialmente positivo) e as regiões polares do EE2 (com uma densidade de carga mais negativa) (Scheidt, Badeau e Huster, 2010). De forma similar ao observado neste trabalho,

Stunges *et al.* (Stunges *et al.*, 2017) estudou a interação do EE2 com alguns tipos de lipídios com características diferentes, dentre eles o DPPC. Analogamente, os autores também atribuíram as mudanças ao grupo fosfato, devido à ligação de hidrogênio entre um grupo hidroxila do EE2 e o grupo fosfato de DPPC.

Os resultados obtidos para a MIX apresentaram mudanças nas bandas atribuídas a quase todos os grupos químicos presentes no fosfolipídio. Como foi discutido acima, o BPA afetou de forma mais efetiva os grupos relacionados ao fosfato, enquanto o EE2 afetou os grupos relacionados ao colina. Nota-se que a MIX aparenta ser uma combinação dos efeitos separados dos poluentes, uma vez que todos os grupos apresentaram um deslocamento de pelo menos $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$. Apesar de a MIX ter afetado todos os grupos químicos analisados, essa interação não se converteu para um maior deslocamento na isotermas (Figura 7). Tal relação reforça o fato de MIX não interagir entre si, pois observa-se que cada composto contribuiu separadamente para as mudanças. Inclusive, vale ressaltar que as interações na cabeça do fosfolipídio podem não ser tão representativas em mudanças diretas na expansão das isotermas, devido ao acomodamento dos analitos na parte inferior da monocamada, voltada para o interior da subfase, ou seja, longe da interface. Comparando essa mistura trabalhada aqui com as medidas realizadas durante meu mestrado, algumas diferenças foram observadas. A MIX usada no mestrado (amoxicilina e azul de metileno) era sinérgica, ou seja, seus efeitos nas isotermas eram maiores devido a formação do aduto. Neste trabalho, os mesmos tipos de interação entre lipídios e analitos foram observados, no entanto, tais mudanças não tiveram um efeito direto na expansão das isotermas. Além disso, para MIX de meu mestrado se observou um deslocamento (que não foi observado neste trabalho) no grupo carbonila do DPPC, que fica essencialmente mais próxima da interface ar-água, logo, se a MIX causa um efeito na ligação C=O, isso significa que as moléculas dos poluentes estão próximos ao grupo, logo causando a expansão, devido à proximidade com a interface (Maximino *et al.*, 2021). Portanto, como neste trabalho

a mistura do BPA e EE2 não causaram uma mudança no grupo carbonila, este talvez tenha sido o motivo para a monocamada não expandir.

Na Figura 22 (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 nas caudas dos fosfolipídios, nas subfases de água ultrapura, BPA, EE2 e MIX na pressão superficial de 30mN/m. A Figura 22 (B) mostra um gráfico de barras das intensidades relativas para os estiramentos simétrico e antissimétrico do CH_2 para cada uma das subfases estudadas.

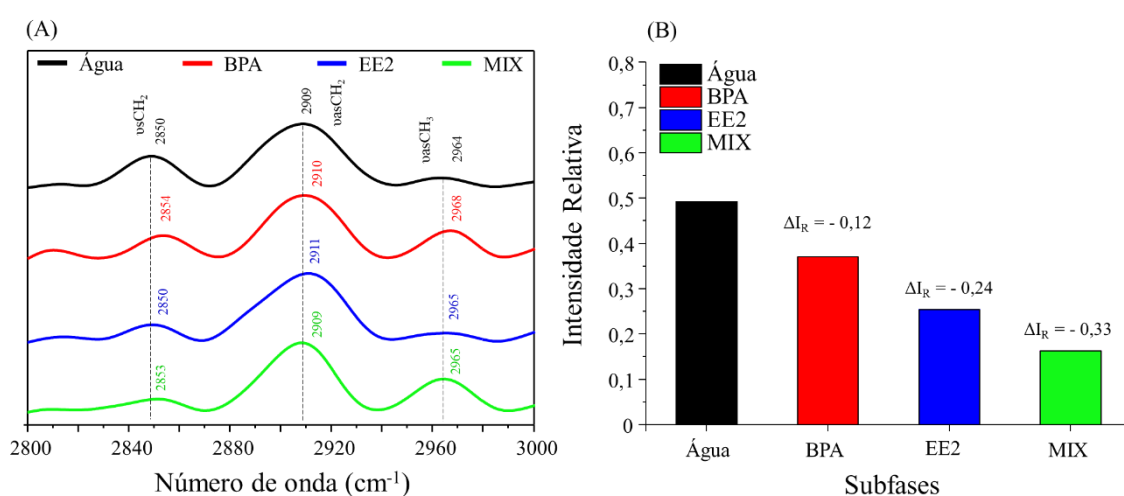


Figura 22: (A) Espectro PM-IRRAS do DPPC nas subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX na região da cauda do fosfolipídio, obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (B) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 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 fosfolipídio. (Figura 22 (A)). No entanto, pode-se avaliar o nível de ordem/desordem na região da cauda do lipídio, analisando a variação na intensidade relativa entre as bandas do CH_2 (simétrica e antissimétrica). Segundo Levin *et al.* (Levin *et al.*, 1985), quanto maior a variação da intensidade relativa (ΔI_R), maior será o grau de alteração. Caso os valores de ΔI_R forem positivos, isso indica um aumento da desordem,

caso os valores de ΔI_R forem negativos, isso indica um aumento da ordem nas caudas dos fosfolípidios na interface ar-água (Goto e Caseli, 2014). Para todas as amostras ocorreu uma variação para valores negativos de ΔI_R , isso indica que a presença dos disruptores está induzindo uma maior ordem na região das caudas. No entanto, vale ressaltar que esse nível de desordem (verticalização das caudas do lipídios) não está ligado a fluidez da monocamada, uma vez que a fluidez é uma grandeza que envolve a organização das moléculas na monocamada enquanto a desordem eles ligada diretamente a cauda do lipídio (aumento ou diminuição dos conformeros *all-trans* e/ou *gauche*). O comportamento de aumento da organização induzido pela presença de um composto externo também foi observado por Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2020), neste estudo monocamadas de DPPC e DPPC:colesterol expostas ao EE2 apresentaram a mesmas variação negativa dos valores da ΔI_R , os autores concluíram que as interação eletrostática observadas entre o EE2 e o DPPC modificaram o rearranjo da cadeia dos lipídios na interface. A MIX apresentou a maior variação de ΔI_R (negativa), ou seja, dentre todo as subfases, foi a que mais induziu um ordenamento na região das caudas do lipídios, o que pode ajudar a explicar o motivo pelo qual a MIX apresentou um comportamento ideal para as análise em água (Figura 7 (B)). A maior ordem no sistema pela MIX teria facilitado tal efeito.

Na Figura 23 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, BPA, EE2 e MIX, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} .

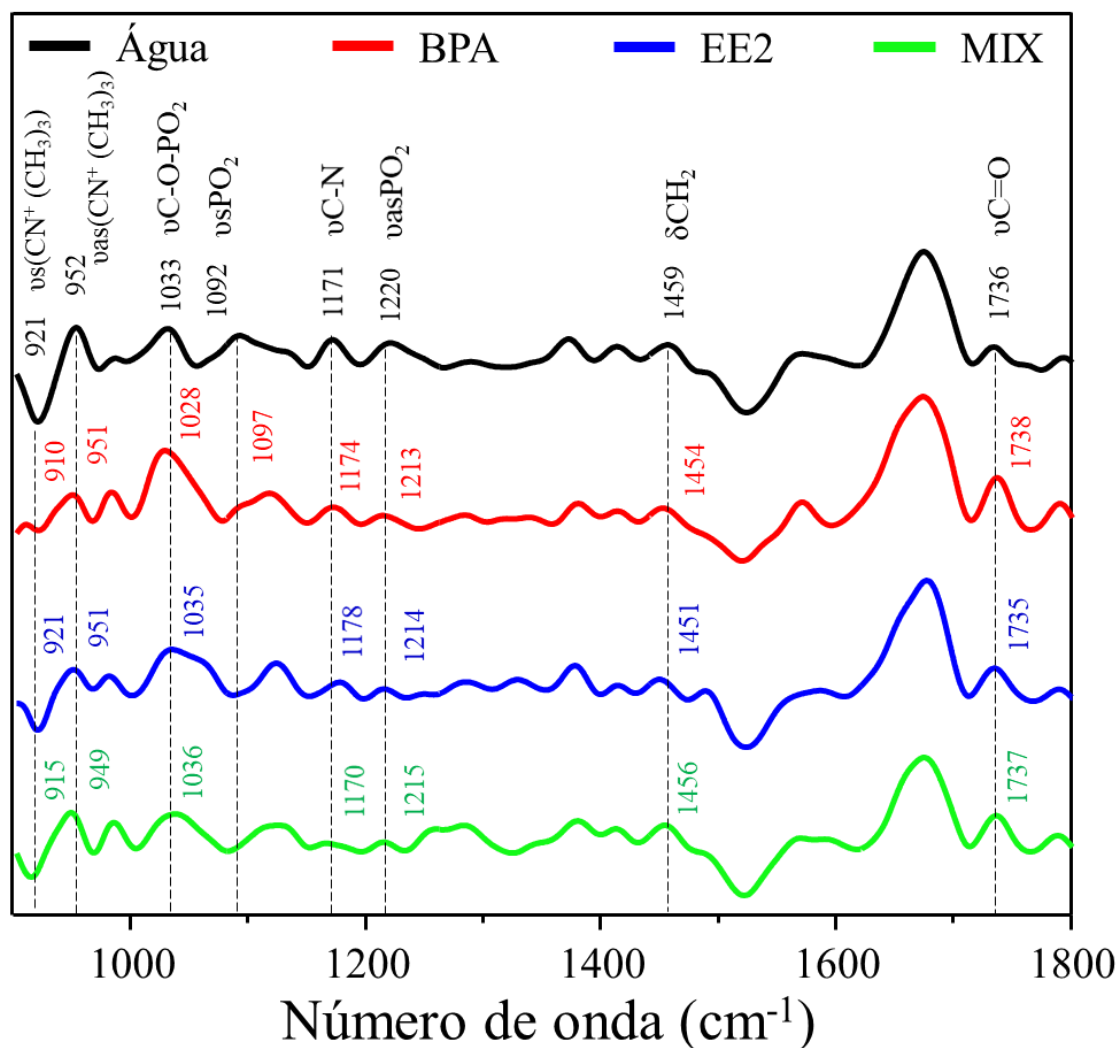


Figura 23: Espectros PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosas e dos poluentes BPA, EE2 e MIX com concentração de 1×10^{-5} mol/L, na região da cabeça do fosfolipídio. Obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.

O espectro de PM-IRRAS para a subfase aquosa (Figura 23) apresenta as bandas características do DOPC tradicionalmente reportadas na literatura [41], [45]. Nota-se a presença do estiramentos do grupo C=O (1736cm^{-1}), a banda do grupo δCH_2 (1459 cm^{-1}), além das bandas simétrica e assimétrica do grupo P=O ($\nu_s = 1092\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1220\text{ cm}^{-1}$) e colina ($\nu_s = 921\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 952\text{ cm}^{-1}$), assim com a banda $\nu\text{C-O-PO}_2$ (1033 cm^{-1}).

As bandas DOPC na presença do BPA foram ligeiramente alteradas, principalmente nos grupos relacionados ao fosfato, devido aos deslocamentos observados em algumas bandas. O

estiramento do C-O-PO₂ mudou de 1033 para 1028 cm⁻¹. Os estiramentos simétrico e antissimétrico do PO₂ também mudaram de 1092 e 1220 cm⁻¹ para 1097 e 1213 cm⁻¹, respectivamente. Essas variações indicam uma interação entre o grupo fosfato do DOPC e alguma partes do BPA. Assim como proposto na discussão para o DPPC, a possibilidade mais provável é uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo fenol do BPA e o oxigênio do grupo fosfato do DOPC.

Analogamente ao BPA, o EE2 também induziu mudanças nos grupos relacionados ao fosfato, especificamente as vibrações simétricas e antissimétricas deslocaram de 1092 e 1220 cm⁻¹ para 1065 e 1214 cm⁻¹, respectivamente. As possíveis interações foram as mesmas discutidas anteriormente. No entanto, apesar de ambos lipídios (DPPC e DOPC) apresentaram o mesmo perfil de interação, as isotermas DOPC foram afetadas em um maior grau de expansão, uma vez que as isotermas de DPPC demonstraram uma aparente expulsão dos analitos da subfase, enquanto o DOPC expandiu a monocamada em maiores e menores pressões. Em outro trabalho de Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2021b) foi estudo os efeitos causados em monocamadas de um lipídio mais fluido, o POPC. Neste trabalho o mesmo perfil de expansão das isotermas foi observado (Figura 13 (A)), com o EE2 permanecendo na interface até o colapso. Os autores atribuem essa mudança as interações observadas na cabeça (as mesmas discutidas aqui), mas também em parte a capacidade que o hormônio teve de penetrar na região das caudas da monocamada de POPC durante a compressão e uma desordem na região das caudas, que serão discutidas em mais detalhes a seguir.

A MIX dos poluentes também apresentou as mesmas mudanças discutidas anteriormente para a exposição do BPA e EE2, o que reforça a hipótese que apesar de ocorrem interações na cabeça do lipídio, aparentemente os que governa a expansão da monocamada parece estar ligada a região da cauda do fosfolipídio.

Na Figura 24 (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, BPA, EE2 e MIX na pressão superficial de 30mN/m. A Figura 24 (B) mostra um gráfico de barras das intensidades relativas para os estiramentos simétrico e antissimétrico do CH_2 para cada uma das subfases estudadas.

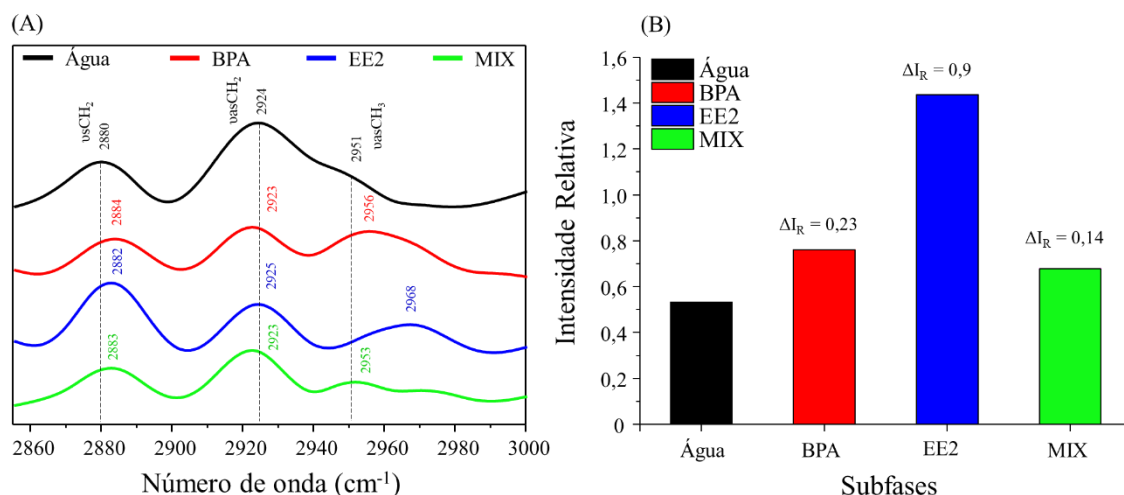


Figura 24: (A) Espectro PM-IRRAS do DOPC nas subfases aquosa, BPA, EE2 e MIX na região da cauda do fosfolipídio, obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m e (B) gráfico de barras da razão entre as intensidades relativas das bandas estiramento simétrico e antissimétrico do CH_2 para cada uma das subfases estudadas.

Os espectros obtidos para a região da cauda do DOPC foram coerentes com o que é reportado na literatura (Aoki *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2015). Assim como para o DPPC foram observadas as bandas referentes ao CH_2 (simétrico e antissimétrico) e CH_3 . Para as amostras em DOPC um comportamento oposto foi observado em comparação com o obtido para o DPPC. Com a inserção dos disruptores endócrinos, de forma geral todas as bandas foram afetadas de alguma forma, com exceção da banda antissimétrica do CH_2 que manteve próximo do valor de 2924 cm^{-1} inicial. No entanto, a banda simétrica do CH_2 deslocou de 2880 cm^{-1} em água para 2884, 2882 e 2883 cm^{-1} (BPA, EE2 e MIX respectivamente). Tal variação é uma primeira evidência de que está ocorrendo um aumento da desordem, uma vez que números de

onda mais baixos são característicos de conformações altamente ordenadas, enquanto conformações mais desordenadas aumentam com a frequência (Chatgililoglu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Outra evidência reside nas alterações observadas na variação das intensidades relativas das bandas simétricas e antissimétricas do CH₂. Diferentemente do observado para o DPPC os valores do ΔI_R foram positivos, o que indica um aumento da desordem das cadeias lipídicas, inclusive o EE2 causou uma inversão das bandas (normalmente a banda antissimétrica do CH₂ é mais intensa do que a da simétrica). Um resultado semelhante foi observado por Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2021b), onde a foi estudada a influência do EE2 em monocamadas de POPC, um lipídio com fluidez próxima ao DOPC. A mesma inversão das bandas simétricas e antissimétrica foi observada, os autores associaram tal mudanças com o aumento da desordem.

Tal aumento na desordem das cadeias dos lipídios pode ser a razão pela qual as isotermas de DOPC expandiram para maiores áreas. Monocamadas mais fluidas, normalmente permitem que os compostos presentes em subfase permanecem na região da cabeça sem que os mesmos sejam expulsos, além disso, sabendo que ambos os poluentes interagem com a cabeça, os mesmos podem estar ocupando o mesmo espaço, o que levou a isoterma deslocar para maiores áreas.

4.5. Estruturação das monocamadas

4.5.1. DPPC

Nas Figuras 25 e 26 são apresentadas as possíveis estruturas que a monocamada de DPPC pode estar assumindo na fase líquido-condensada, devido à presença de diferentes subfases de BPA, EE2 e MIX. Esta é uma montagem ilustrativa baseada nos experimentos discutidos anteriormente.

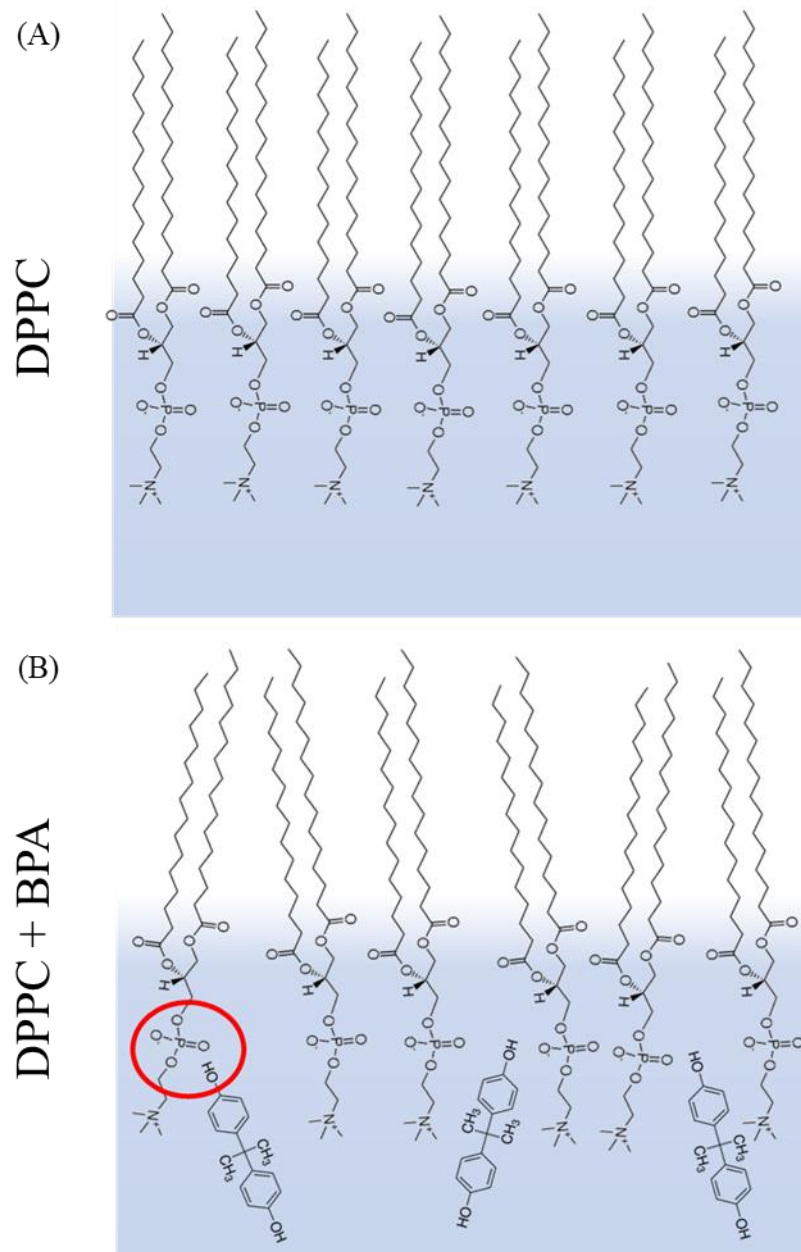


Figura 25: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (A) água ultrapura e (B) BPA. As regiões circuladas em vermelho representam possíveis interações entre o BPA e os lipídios.

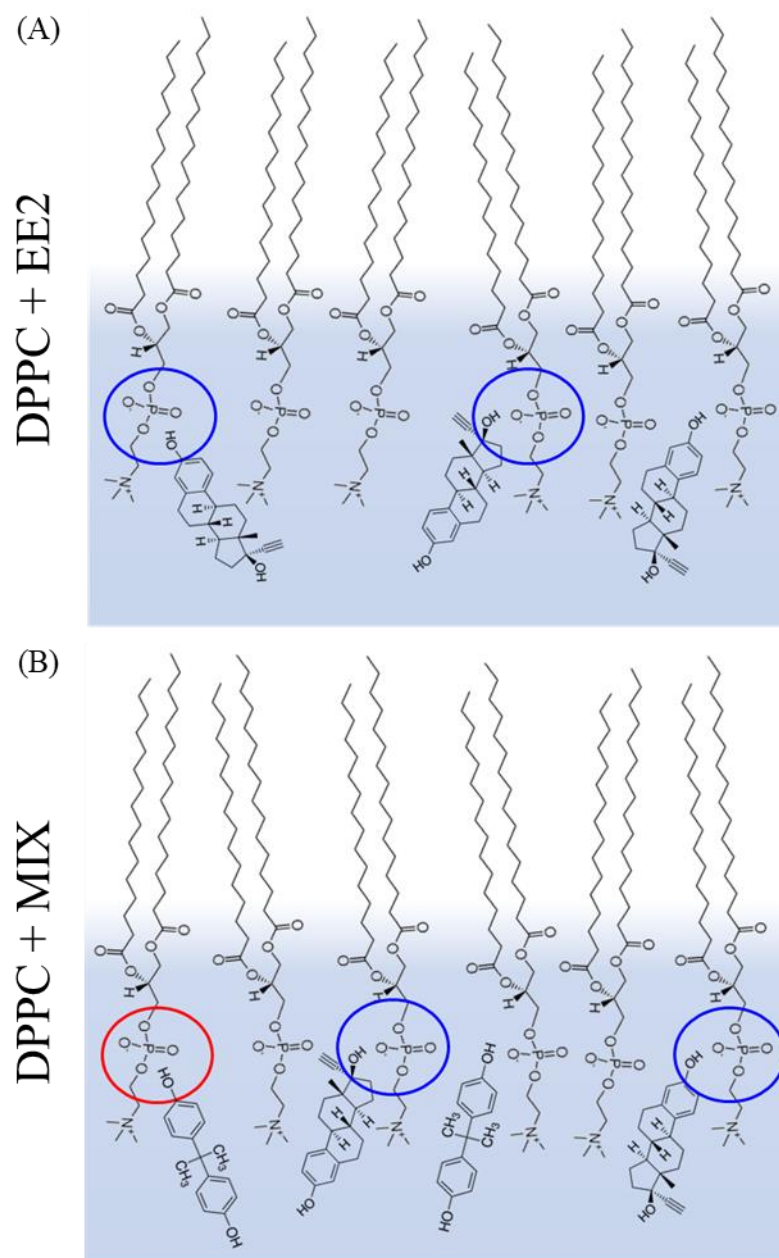


Figura 26: Estruturação das monocamadas de DPPC nas subfases de (A) EE2 e (B) MIX. As regiões circuladas em vermelho (BPA) e azul (EE2) representam possíveis interações entre os poluentes e os lipídios.

A Figura 26 (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, lembrando que essa estruturação é meramente ilustrativa, sem intuito de representar precisamente a posição ou interação dos poluentes com os lipídios.

Para o DPPC todas as subfases tiveram comportamento similares, com a expansão da monocamada durante os valores de pressão menores, e consequente expulsão da interface ar água. Sendo assim, para a ilustração das Figuras 25 (B) e 26 (A) e (B) essas expansões foram representadas por um ligeiro espaçamento entre as moléculas de DPPC, se comparado com o lipídio em água (Figura 25 (A)). Além disso, a inserção dos poluentes também causou um aumento na fluidez da monocamada, sendo representada na imagem pela inclinação do lipídio em relação à superfície da água. As interações observadas via PM-IRRAS (majoritariamente com o grupo fosfato) foram representadas pela aproximação da molécula do poluente com o grupo envolvido. Sendo que para ambos os poluentes os grupos fenóis interagiram com a cabeça dos lipídios. Os grupos químicos envolvidos na interação foram destacados pelos círculos vermelhos (BPA) e azuis (EE2). Devido a MIX ter apresentado um comportamento aditivo a estruturação da monocamada foi similar a dos poluentes separados.

4.5.2. DOPC

Nas Figuras 27 e 28 são apresentadas as possíveis estruturas que a monocamada de DOPC pode estar assumindo na fase líquido-condensada, devido à presença de diferentes subfases de BPA, EE2 e MIX. Esta é uma montagem ilustrativa baseada nos experimentos discutidos anteriormente.

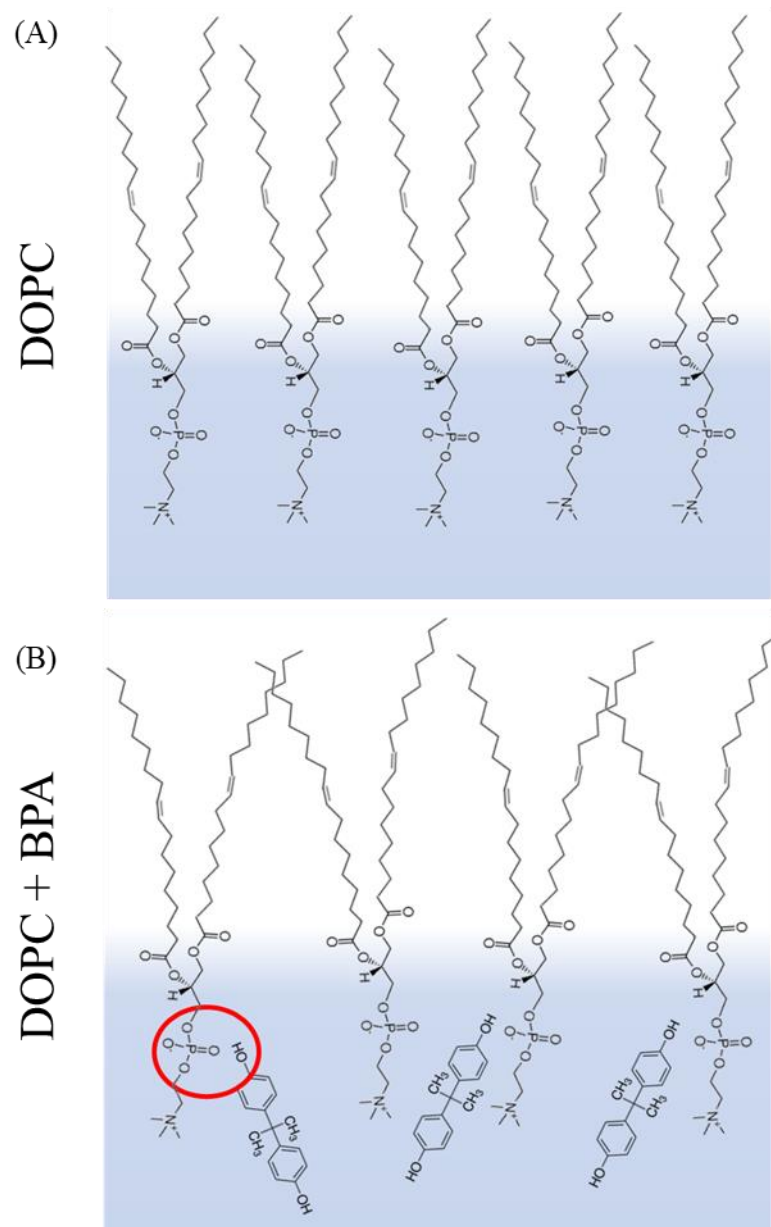


Figura 27: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (A) água ultrapura e (B) BPA. As regiões circuladas em vermelho representam possíveis interações entre o BPA e os lipídios.

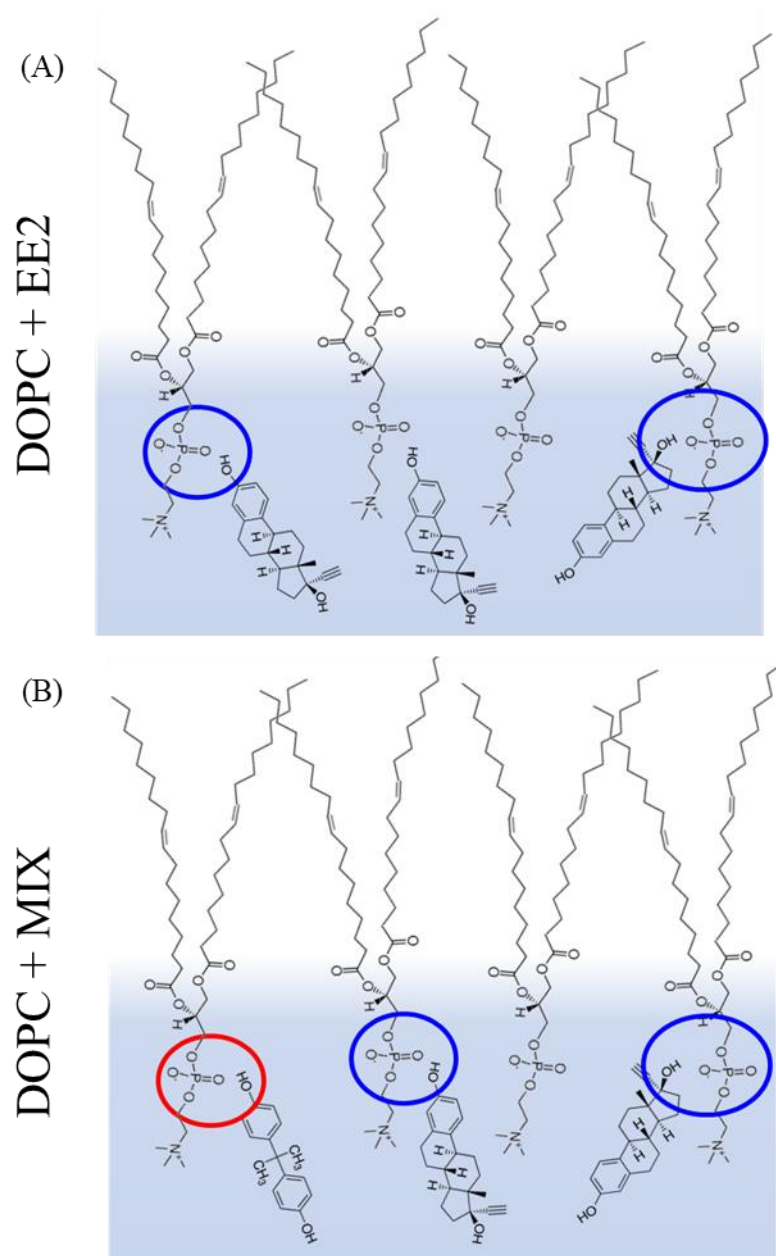


Figura 28: Estruturação das monocamadas de DOPC nas subfases de (A) EE2 e (B) MIX. As regiões circuladas em vermelho (BPA) e azul (EE2) representam possíveis interações entre os poluentes e os lipídios.

A Figura 27 (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 à presença das insaturações do lipídio.

Diferentemente do DPPC, o DOPC apresentou uma expansão da monocamada durante toda a compressão para todas as subfases, sendo assim, essa variação foi representada na ilustração pelo maior espaçamento entre as moléculas de DOPC se comparado com o lipídio em água (Figura 27 (A)). As análises de compressibilidade revelaram pequenas variações nos valores de C_s^{-1} , logo, as ilustrações na presença dos poluentes exibiram uma ligeira inclinação nas moléculas dos lipídios para demonstrar tal evidência. As interações com a cabeça dos lipídios observadas via PM-IRRAS, apontaram as mesmas mudanças do que o DPPC (majoritariamente entre os grupos fenóis do BPA e EE2 com o grupo fosfato do DOPC). Os círculos vermelhos (BPA) e azuis (EE2) destacam essas interações. Na análise da cauda do DOPC observou-se um aumento no nível de desordem na região dos hidrocarbonetos, a vista disso, essa variação foi representada na ilustração pela abertura da cauda dos lipídios, se comparada com a estruturação da água. A MIX apresentou um comportamento parecido com as análises dos poluentes separados, praticamente em todos os experimentos, sendo assim as estruturações foram similares.

4.6. Vesículas unilamelares gigante (GUVs)

4.6.1. DPPC

Na Figuras 29 são apresentadas as imagens obtidas para a microscopia de contraste de fase para as GUVs de DPPC em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$), para o controle e na presença de 1×10^{-5} mol/L de BPA, EE2 e a MIX.

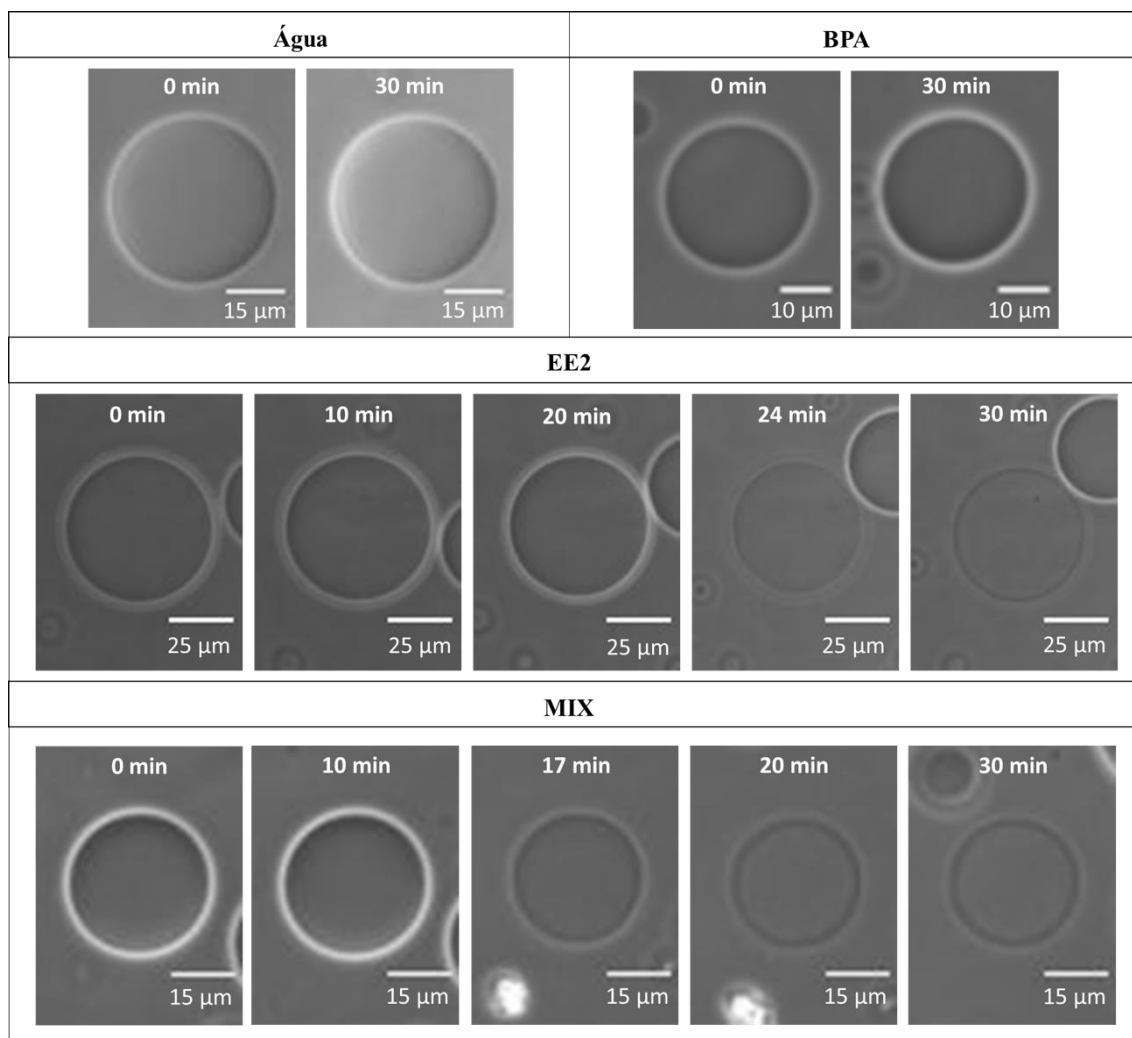


Figura 29: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC para o controle e na presença de BPA, EE2 e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

A maioria das GUVs de DPPC apresentaram o formato tradicional esférico esperado, no entanto, algumas vesículas apresentaram o formato não-esférico devido à temperatura da transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_m) do DPPC ser próxima de 41 °C, o que causa a deformação das vesículas quando em temperaturas abaixo da T_m . Assim, tal formato “enrugado” é típico de GUVs de DPPC, pois o lipídio se encontra na fase gel quando analisadas na temperatura ambiente (Franke *et al.*, 2009). Apesar disso, as GUVs selecionadas para a Figura 29 apresentaram um formato esférico, ainda que as medidas tenham sido realizadas na temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Como esperado, o controle (apenas GUVs em solução de glicose) se manteve estável durante todo tempo de análise (30 min). Na presença do BPA (1×10^{-5} mol/L) as vesículas de DPPC não apresentaram nenhuma variação de formato ou alteração no contraste de fase. Esse mesmo comportamento foi observado nos resultados do meu mestrado (Dassie Maximino, 2018) , onde ao estudar a interação do antibiótico a amoxicilina em GUVs de DPPC, mesmo com em concentrações de 4×10^{-5} para 4×10^{-4} mol/L, não foram observadas mudanças morfológicas e de permeabilidade.

Para o EE2, as GUVs permaneceram estáveis até o tempo de 24 minutos de exposição (em média), e, a partir desse ponto, as vesículas passaram a apresentar a perda no contraste de fase. A presença do EE2 proporcionou a troca entre os conteúdos dos ambientes interno e externos das GUVs, provavelmente devido ao aumento dos poros da bicamada (não observados nas microscopias), levando assim a perda do contraste de fase. As GUVs se mantiveram estáveis com o formato esférico até o fim da análise. No trabalho de Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2020), GUVs de DPPC e DPPC/colesterol foram expostas ao EE2, e os resultados obtidos para o DPPC indicaram que o hormônio induziu uma tensão na curvatura da bicamada, promovendo uma perturbação na conformação e forma das vesículas. Tal variação em relação ao observado aqui, pode estar relacionada à metodologia e/ou concentração do analito aplicada na exposição das GUVs ao EE2, pois, no o trabalho citado, o EE2 foi solubilizado em metanol e posteriormente misturado a água (2% v/v) para que se obtivesse uma concentração final de 1×10^{-4} mol/L, maior do que o obtido para o EE2 solubilizado diretamente em água (o que foi o caso deste trabalho 1×10^{-5} mol/L). A variação da concentração é um parâmetro relevante. Por exemplo, em meu mestrado as GUVs analisadas na presença de azul de metileno não foram afetadas na concentração mais baixa (4×10^{-5} mol/L) do poluente, porém apresentaram perda no contraste de fase a partir de concentração de 1×10^{-4} mol/L. Ainda no trabalho de Ruiz *et al.* (Ruiz *et al.*, 2020), para as GUV de composição binária de DPPC/colesterol o efeito de perda do contraste

de fase foi observado próximo a 10 min de exposição. Os autores atribuíram a perda de contraste de fase a um aumento da permeabilidade dos GUVs, atribuindo esse aumento a um possível enfraquecimento das interações intermoleculares atrativas entre DPPC e o colesterol induzidas pelo EE2, que permitiu a troca de conteúdo entre os ambientes interno e externo das GUVs.

A perda no contraste de fase também foi observada neste trabalho para a MIX, porém no tempo de 17 min de exposição. Provavelmente, tal efeito está sendo induzido pelo EE2, pois, quando analisado separadamente, o BPA não apresentou nenhum efeito nessa concentração. O tempo no qual as vesículas começam a ser afetadas pela perda do contraste oscila bastante. Uma análise quantitativa das vesículas afetadas pela presença do EE2 e MIX após 30 min de exposição está descrita na Tabela 2 relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas.

Tabela 2: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC na presença de 1×10^{-5} mol/L de EE2 e MIX após o intervalo de 30 min

GUVs DPPC em EE2 1×10^{-5} mol/L			
Tamanho	Quantidade	Afetadas	Porcentagem (%)
< 10 μm	394	13	3,3
10 - 30 μm	1145	255	22,3
> 30 μm	117	60	51,3
Total	1656	328	19,8
GUVs DPPC na MIX 1×10^{-5} mol/L			
Tamanho	Quantidade	Afetadas	Porcentagem (%)
< 10 μm	212	9	4,2
10 - 30 μm	1116	125	11,2
> 30 μm	142	39	27,5
Total	1470	173	11,7

Para o EE2, apenas 3,3 % das GUVs menores de 10 μm foram afetadas, enquanto para as vesículas entre 10-30 μm esse valor aumentou para 22,3% e para vesículas acima de 30 μm

pouco mais que 51% foram afetadas pela perda do contraste. Essa análise demonstra que vesículas com maiores diâmetros, ou seja, maior área de superfície disponível, são mais afetadas pela presença do EE2.

A MIX apresentou o mesmo padrão obtido para o EE2, sendo que as vesículas pequenas ($< 10 \mu\text{m}$), médias ($10\text{-}30 \mu\text{m}$) e grandes ($>30 \mu\text{m}$) foram afetadas nas proporções de 4,2, 11,2 e 27,5 %, respectivamente. É interessante notar que as porcentagens foram menores para MIX comparadas aos EE2, provavelmente devido a quantidade de moléculas de EE2 presentes na solução da MIX ser metade ($5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) das presente na de EE2 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$). Nos resultados obtidos no meu mestrado, a MIX apresentou um comportamento diferente, pois a amoxicilina e o azul de metileno interagiam entre si, sendo que tal interação desfavoreceu os efeitos causados na GUVs, pois o aduto formado alterou as propriedades individuais dos poluentes. No entanto, não foi verificada interação entre o BPA e EE2, permitindo que os poluentes afetem as vesículas de DPPC tanto de forma individual como na MIX. Sendo assim, o resultado obtido para a MIX na presença do DPPC apresentou uma característica aditiva, pois o resultado obtido foi uma combinação dos resultados dos poluentes separados.

Nas concentrações descritas anteriormente, o BPA não apresentou nenhum efeito nas GUVs, mesmo após 30 min de exposição. Assim, foram realizados novos experimentos com uma solução mais concentrada ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$). A Figura 30 apresenta os resultados obtidos nesse novo sistema.

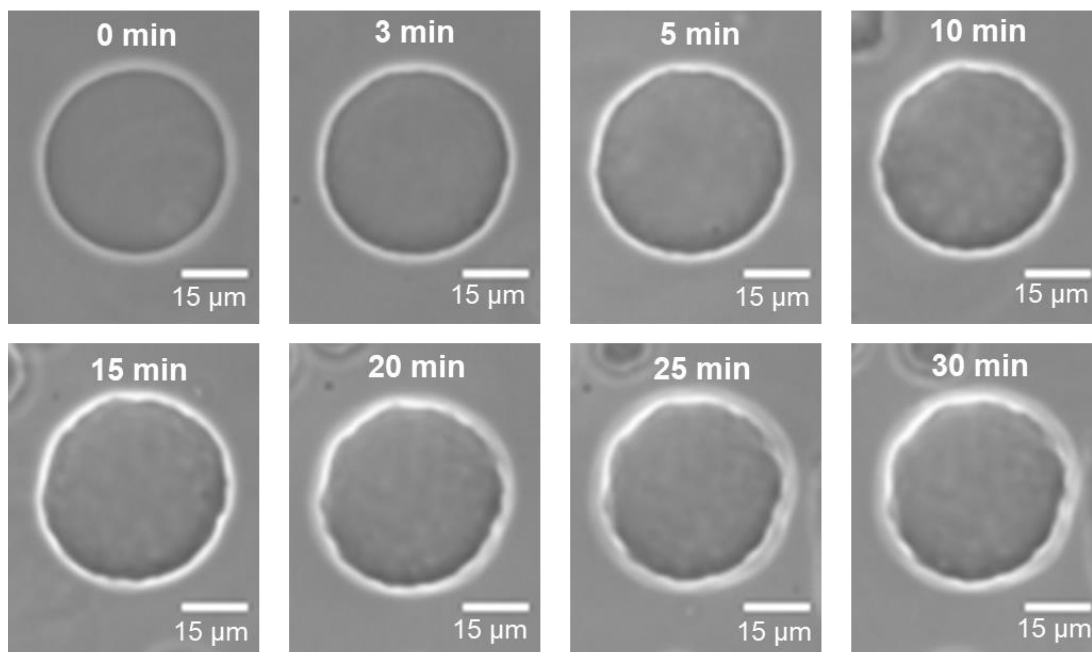


Figura 30: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Para as amostras expostas em 1×10^{-4} mol/L de BPA, as GUVs de DPPC apresentaram uma alteração no formato. Foi observado um enrugamento da superfície a partir de 3 min de exposição, e conforme o tempo passava, o efeito foi se desenvolvendo até o fim da análise (30 min). Isso indica que o BPA afetou a bicamada lipídica. No entanto, o efeito de enrugamento acontece naturalmente para vesículas de DPPC, porém tal efeitos leva mais tempo para ocorrer do que o observado nos experimentos. Para se obter um melhor entendimento de tal resultado foi realizada uma análise quantitativa comparando a quantidade de vesícula que apresentaram o formato enrugado após 30 min entre o controle e a amostra exposta ao BPA. A Tabela 3 apresenta uma análise quantitativa das GUVs de DPPC para o controle e na presença do BPA para a concentração mais alta (1×10^{-4} mol/L) após 30 minutos, relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas (Maximino *et al.*, 2021).

Tabela 3: Análise quantitativa para as GUVs de DPPC para o controle e na presença de 1×10^{-4} mol/L de BPA após o intervalo de 30 min.

GUVs de DPPC em Água			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (enrugamento)	Porcentagem (%)
< 10 μm	327	51	15
10 to 30 μm	220	23	10,4
> 30 μm	20	2	10
Geral	567	76	13,4
GUVs de DPPC em BPA (1×10^{-4} mol/L)			
Tamanho	Quantidade	Afetadas (enrugamento)	Porcentagem (%)
< 10 μm	960	399	41
10 to 30 μm	289	192	66,4
> 30 μm	77	62	80,5
Geral	1326	653	49,2

O enrugamento da amostra controle em geral foi de 13,4%, e mesmo em relação às GUVs de diferentes tamanhos a variação foi pequena. Porém, nas amostras expostas ao BPA quase 50% das vesículas apresentaram um enrugamento após 30 min de exposição. Além disso, as GUVs com tamanhos maiores (> 30 nm) foram mais afetadas que as pequenas, indicando uma dependência com o tamanho e/ou área de superfície. Considerando tal evidência, pode se dizer que a presença do BPA facilita esse efeito do enrugamento que acontece naturalmente em vesículas de DPPC.

Um ponto interessante de se destacar foi que, durante o estudo das vesículas, notou-se que o BPA apresentou uma dependência do tempo de preparo da solução. Em soluções preparadas poucas horas após a solubilização do BPA (que a partir daqui chamaremos de amostras “frescas”) as GUVs foram afetadas conforme a Figura 30. Porém, para amostras de BPA preparadas há pelo menos 24 horas (que passaremos a chamar de amostras “envelhecidas”) as vesículas não apresentaram nenhum efeito após os mesmos 30 min de exposição (Figura 31). Essa diferença entre as amostras frescas e envelhecidas indica que possivelmente ocorreu a agregação do poluente. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2016b) observou via simulações dinâmicas que o BPA tem uma tendência a se agregar e formar *clusters*. Logo,

presume-se que a agregação levou à um aumento do tamanho do agregado de BPA, dificultando assim a permeabilidade do mesmo na membrana.

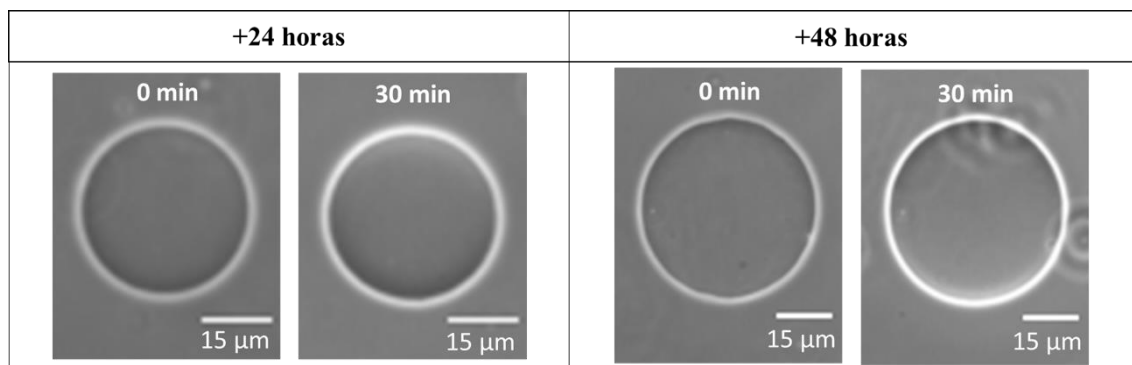


Figura 31: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min (A) após 24 e (B) 48 horas do preparo da solução.

Uma vez que o BPA demonstrou a característica de alterar o resultado obtido de acordo com o tempo de estocagem, foi realizado então um experimento adicional envolvendo a MIX, pois a mesma contém BPA. A Figura 32 mostra os resultados obtidos para a microscopia de contraste de fase da MIX após 24 horas de estocagem da solução.

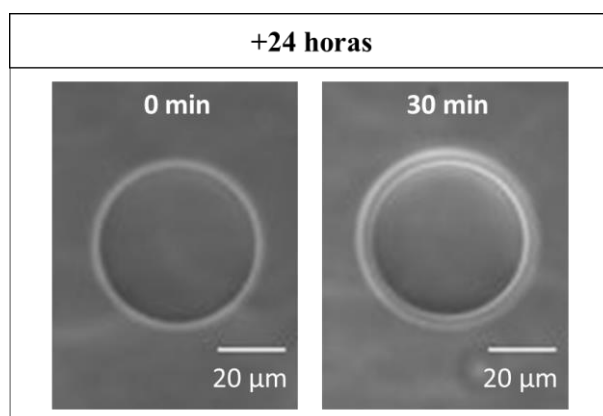


Figura 32: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na presença de MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 horas de envelhecimento.

Foi verificado que a solução da MIX também não apresentou nenhum efeito no tempo de 30 min-de análise. O que indica que o BPA está, de certa forma, inibindo os efeitos da MIX, em especial os efeitos causados pelo EE2, uma vez que o mesmo foi responsável pela perda de contraste nas GUVs de DPPC (Figura 29). Para os resultados obtidos durante o mestrado, a MIX também não afetou as GUVs, porém apesar de ambos os estudos apresentarem o mesmo padrão, o motivo pelo qual o efeito não foi observado foi diferente. No caso da AMX e AM, ambos interagiam entre si, formando um aduto, que por consequência possuía um tamanho maior, o que inibiu a permeabilidade e os efeitos causada na bicamada. Para este estudo, a agregação do BPA produziu *clusters* com um tamanho maior, que de mesma forma inibiram os efeitos do EE2 na bicamada da vesícula.

4.6.2. DOPC

Na Figuras 33 são apresentadas as imagens obtidas de microscopia de contraste de fase para as GUVs de DOPC em temperatura ambiente (23 °C), para o controle e na presença de 1×10^{-5} mol/L de BPA, EE2 e a MIX.

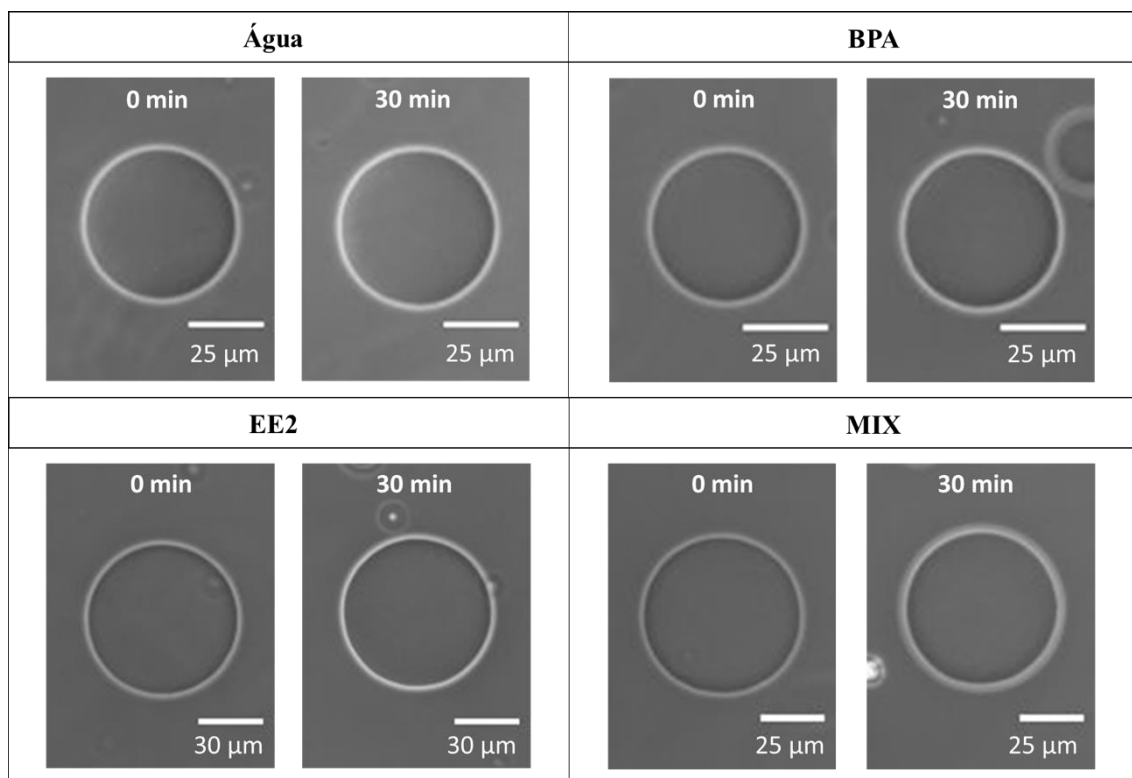


Figura 33: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC para o controle e na presença de BPA, EE2 e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Nota-se que as GUVs de DOPC apresentaram o formato esférico característico, como normalmente é reportado na literatura (Kerdous, Heuvingh e Bonneau, 2011). Contudo, a inserção dos disruptores não causou nenhum efeito na morfologia das vesículas, mesmo após 30 minutos de exposição. Sendo assim, da mesma forma como foi realizado nas GUVs de DPPC, foram propostos novos experimentos expondo as vesículas em soluções mais concentradas de EE2, BPA e a MIX. Porém, apenas o BPA foi refeito, devido ao fato de o limite de solubilidade do EE2 ser bem próximo a 1×10^{-5} mol/L, impossibilitando a análise do EE2 e MIX. Existem outras metodologias que possibilitariam o aumento da concentração do EE2 (como a solubilização em solvente orgânico), porém, para fins de comparações, tais metodologias foram descartadas. A Figura 34 apresenta os novos experimentos com a solução mais concentrada 1×10^{-4} mol/L de BPA.

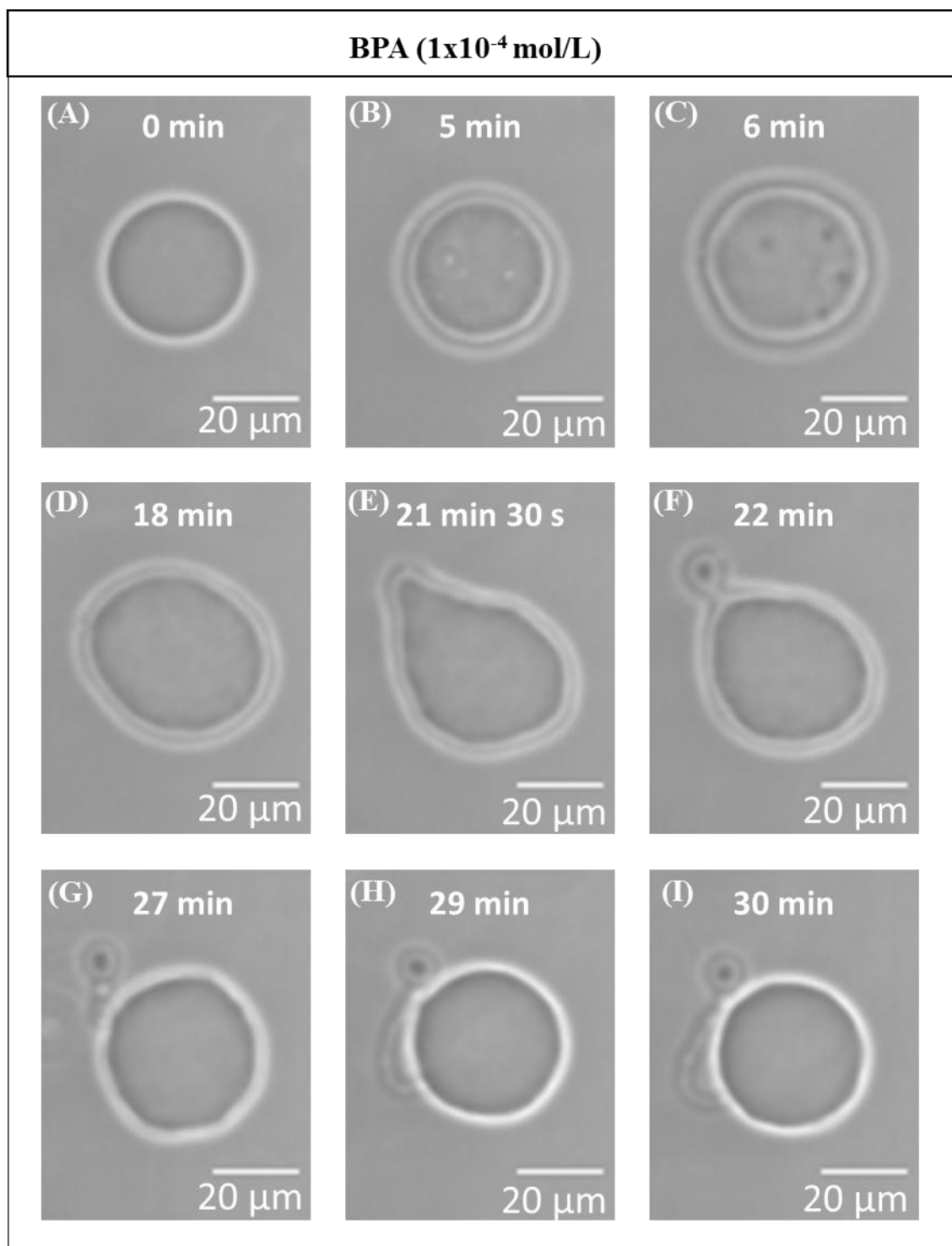


Figura 34: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Diferentemente do observado para a análise na concentração de 1×10^{-5} mol/L, os novos experimentos mostraram que o BPA afetou as vesículas de forma significativa, apresentado múltiplos efeitos tais quais flutuações no formato, um processo parecido com a endocitose

(Tahara *et al.*, 2012), cisões/divisão e a formação de “*budds*” ou “*buddings*” (traduzido do inglês como “broto” ou “botão”) (Ruiz *et al.*, 2021b). Na Figura 34 a GUV de DOPC selecionada apresentou um formato esférico, permanecendo estável até aproximadamente 5 min após a adição do BPA. A partir deste ponto, a vesícula analisada passou a apresentar uma instabilidade na sua superfície. Após 6 minutos começou a se formar na parte interna das GUVs pequenas vesículas, um processo que aparenta ter as mesmas características do fenômeno da endocitose (efeito que ocorre em membranas de células), e consiste na captura de um objeto / ambiente externo à superfície da bicamada, pela “encapsulação” e transferência para o ambiente interno da vesícula (Lipowsky, 2014). Porém tal efeito também pode ser comparado com termo chamado “inward budding”, ou também efeitos de “curvatura negativa” (Dimova, 2019; Lipowsky, 2014), que consiste na formação de pequena estrutura internas a vesícula de forma que obtém uma série de vesículas conectadas umas às outras. A partir desse momento a vesícula permaneceu instável de 18 a 21 minutos, onde as flutuações da superfície aumentaram, o que consequentemente levou a uma cisão da vesícula na marca de 22 minutos. A partir desse ponto a vesícula se tornou mais estável, porém a pequena GUV gerada na separação ficou conectada a GUV original, pela formação de “buds” que foram se desenvolvendo até o final da análise (30 min). O efeito de “budding” consiste na formação de pequenas vesículas que ficam conectadas umas às outras na forma de cordão. Além de todos esses efeitos observou-se também que o tamanho da vesícula aumentou se comparada ao tamanho inicial. Vale ressaltar que nem todas as vesículas apresentaram estes mesmos efeitos, algumas delas tiveram apenas um desses efeitos. Estes dados foram avaliados com mais detalhe na análise quantitativa.

Uma vez que vários efeitos foram observados, foram realizadas outras análises utilizando a microscopia de fluorescência confocal, com o intuito de investigar separadamente cada efeito. Para isso foram utilizadas as sondas fluorescentes DiIC18 (para marcação de

bicamada) e AlexaFluor (para a marcação do ambiente externo). A Figura 35 mostra os resultados obtidos para a microscopia de fluorescência confocal das GUVs expostas a 1×10^{-4} mol/L de BPA focadas na análise das flutuações, da endocitose e cisão.

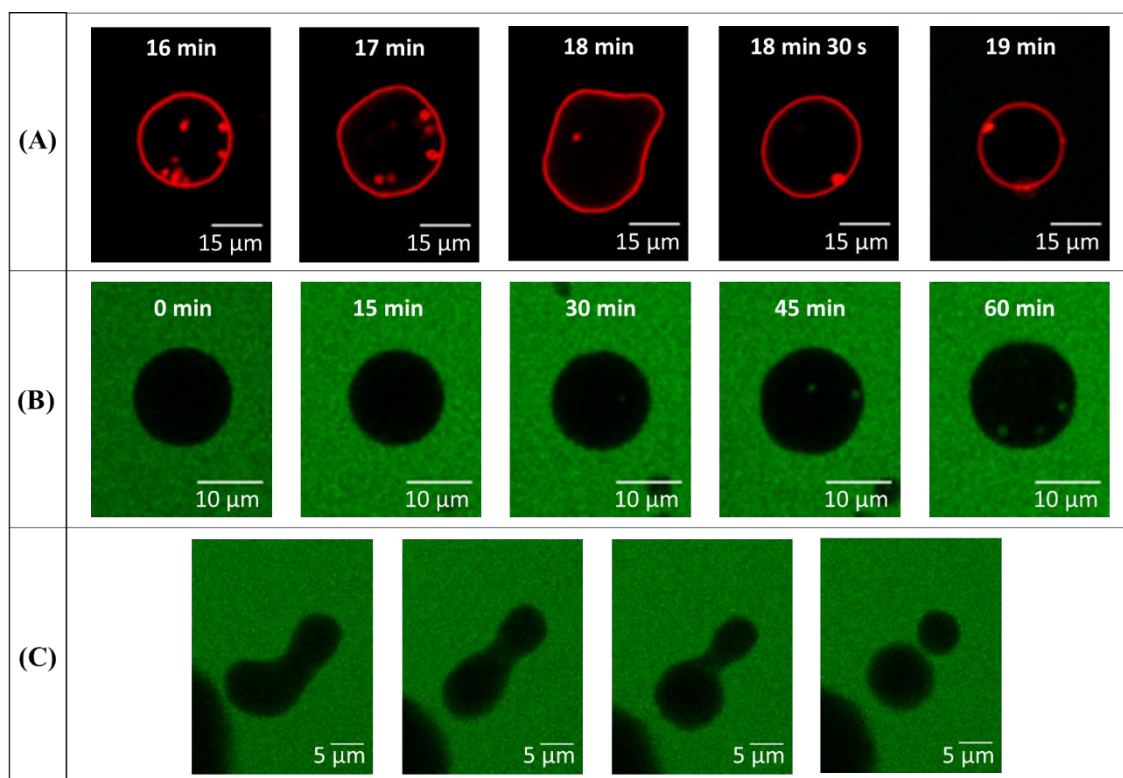


Figura 35: Imagens de fluorescência confocal das GUVs de DOPC na presença de 1×10^{-4} mol/L de BPA. Imagens obtidas utilizando as sondas (A) DiIC18 na bicamada lipídica e (B)(C) AlexaFluor marcando o meio exterior.

A Figura 35 (A) mostra os efeitos da flutuação de superfície das GUVs, de forma similar a flutuação iniciou-se próximo a 16 minutos de exposição, consequentemente causando um aumento do volume devido à instabilidade, e posteriormente estabilizando-se após 19 minutos. Este comportamento de flutuação seguida de estabilização foi relatado por Solon *et al.* (Solon *et al.*, 2006). Naquele estudo foi avaliada a fusão (ou uptake) de SUVs carregadas positivamente compostas de DOPC:DOTAP (90:10), sobre GUVs carregadas negativamente compostas de DOPC:DOPS (90:10). O autor atribuiu a adesão a uma interação eletrostática entre os lipídios

carregados. Além disso, a GUV apresentou um aumento de perímetro, assim como nossos resultados.

O processo de endocitose foi avaliado na Figura 35 (B), no qual o ambiente externo foi marcado com o intuito de observar se a solução externa foi capturada durante o processo de formação da vesícula interna. No caso, pode-se notar que as vesículas internas contêm a emissão da sonda AlexaFluor, tal efeito é conhecido como “*tubular invagination*” (Research; T, 2011), o que indica o BPA não só causou a endocitose, mas como também foi transportado para o interior da GUV. Tal fenômeno pode ajudar a explicar como o BPA penetra e/ou difunde em sistemas biológicos. Além de como a lipofilicidade do BPA influencia os efeitos observados nas GUVs. É reportado que o BPA afeta algumas estruturas celulares, como as mitocôndrias (Wang *et al.*, 2021). Em um de nossos estudos publicados proveniente deste doutorado (Maximino *et al.*, 2021), observamos em ensaios de MTT que a viabilidade celular de células de ovário de hamster diminuiu na presença de BPA. Huc *et al.* (Huc *et al.*, 2012) estudaram a influência do BPA no acúmulo de lipídios na linhagem celular Hep-G2; os autores mostraram que baixas concentrações de BPA promovem o acúmulo de lipídios nas células hepáticas desencadeado por distúrbios na função mitocondrial. Todavia, antes de qualquer conclusão, é necessário investigar melhor esse comportamento para entender os mecanismos de ação do BPA no interior das células.

O efeito do aumento do tamanho das GUVs foi analisado em maiores detalhes. Para a aquisição de tais dados foi necessário a obtenção do tamanho inicial das GUVs (0 min) até o fim da análise (30 min). Para isso, as GUVs acompanhadas durante todo intervalo. A Figura 36 mostra o resultado obtido para GUV selecionada exposta a 1×10^{-4} mol/L de BPA durante 30 minutos.

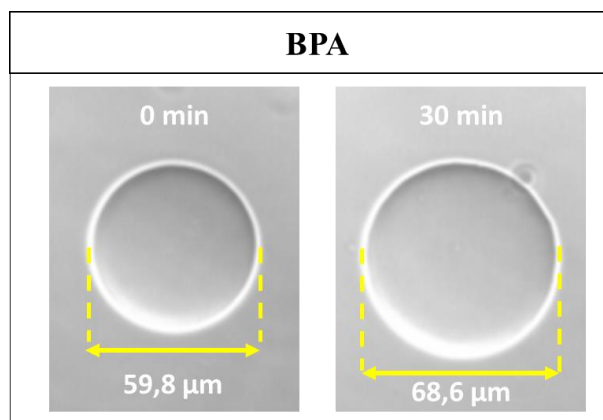


Figura 36: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30 min.

Inicialmente a vesícula apresentou um diâmetro de 59,8 μm , e após a análise a vesícula expandiu para um diâmetro de 68,6 μm (um aumento de 14,5 %). Sendo que ao fim a análise a vesícula permaneceu esférica e sem flutuações. Deshpande *et al.* (Deshpande *et al.*, 2019) estudou a expansão (ou *swelling*) de GUVs de DOPC:DOPE utilizando um sistema contendo LUVs de mesma composição em uma solução hipotônica. O objetivo era incitar a adesão das pequenas vesículas na membrana, induzindo assim o crescimento sem causar ruptura. As GUVs aumentaram quase 20% do seu raio, indicando a fusão entre as vesículas gigantes e pequenas. Apesar disso, nossos resultados não estão ligados a um meio hipotônico. De acordo com a metodologia utilizada, nosso sistema é essencialmente isotônico ou levemente hipertônico devido ao BPA estar solubilizado na solução de glicose. No entanto, o aumento das GUVs de DOPC foi uma contribuição do BPA, provavelmente causada pelo efeito da endocitose que capturou o ambiente externo, aumentando assim o diâmetro das vesículas.

Para um melhor entendimento de como as GUVs respondem a exposição ao BPA de forma geral, foi então realizada uma análise quantitativa dos dados obtidos após 30 min de exposição. Foi quantificada a porcentagem de GUVs que não foram afetadas por nenhuma dos efeitos observados, assim como as quantidades de GUVs que foram afetadas pela efeitos da endocitose, budding e flutuações. Além disso foram analisadas a porcentagem de GUVs que

apresentaram múltiplos efeitos. Tudo levando em consideração o tamanho das vesículas observadas, separando em três grupos: pequenas ($< 10 \mu\text{m}$), médias ($10\text{-}30 \mu\text{m}$) e grandes ($> 30 \mu\text{m}$). Foi também estudada a porcentagem a qual as vesículas aumentaram seu tamanho após 30 minutos de exposição. Neste caso, a análise se limitou à apenas duas grupos menores e maiores que $30 \mu\text{m}$, devido a quantidade reduzida de vesículas.

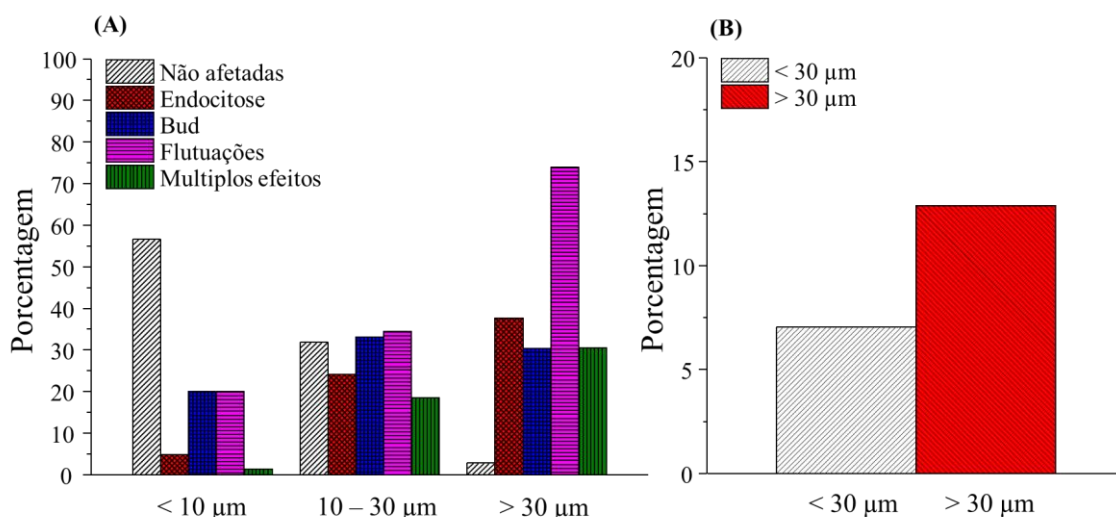


Figura 37: (A) Porcentagem de GUVs afetadas pela presença de $1 \times 10^{-4} \text{ mol / L}$ de BPA. O gráfico exibe os diferentes efeitos observados, incluindo as vesículas não afetadas, as GUVs que apresentaram processo de endocitose, budding, flutuações e vesículas com múltiplos efeitos (observação de mais de um efeito nas mesmas vesículas). Os efeitos observados também foram agrupados em tamanhos de vesículas: < 10 , entre 10 e 30 e $> 30 \mu\text{m}$. (B) Porcentagem de GUVs que apresentaram aumento de tamanho durante a análise. Análise agrupada em dois grupos de tamanho: < 30 e $> 30 \mu\text{m}$.

O número de GUVs não afetadas foi mais proeminente nas vesículas de tamanho menor. Quase 57% do grupo $< 10 \mu\text{m}$ não foram afetados pela presença de BPA, enquanto os seguintes grupos exibiram uma porcentagem de 32 e 3%, respectivamente. Este foi o caso para os efeitos da endocitose e flutuações de superfície, ambos apresentavam um incremento percentual à medida que o tamanho do grupo aumentava. A porcentagem de endocitose mostrou que apenas 5% do grupo menor foi afetado, enquanto 24% para o grupo do meio e 38% para o grupo maior. O mesmo padrão foi observado para as flutuações passando de 20 (grupo menor) para 34 (grupo intermediário) até 74% (grupo maior), corroborando o resultado esperado. A formação de

budding não apresentou relação clara com o aumento do tamanho da GUV. Os resultados variaram de 20% para o grupo menor, 33% para o grupo de tamanho médio e 30% para o grupo maior. Esse resultado pode indicar que a formação de budding não tem uma relação forte com o tamanho da GUV. No entanto, o número de GUVs contados para o grupo maior foi consideravelmente menor do que o grupo de tamanho intermediário, sendo tal variação podendo estar ligada a uma insuficiência de GUVs acima de 30 μm . A avaliação do aumento do diâmetro das GUVs também indicou uma dependência com o tamanho das vesículas. Observou-se que para GUVs maiores que 30 μm o aumento percentual foi de aproximadamente 13%, enquanto para GUVs menores que 30 μm esse aumento foi de apenas 7%.

De mesma forma que foi estudado para o DPPC os efeitos do envelhecimento do BPA também foram realizados para o DOPC. A Figura 38 apresenta os resultados obtidos para as análises realizadas após 24 horas de estocagem da solução de BPA (1×10^{-4} mol/L).

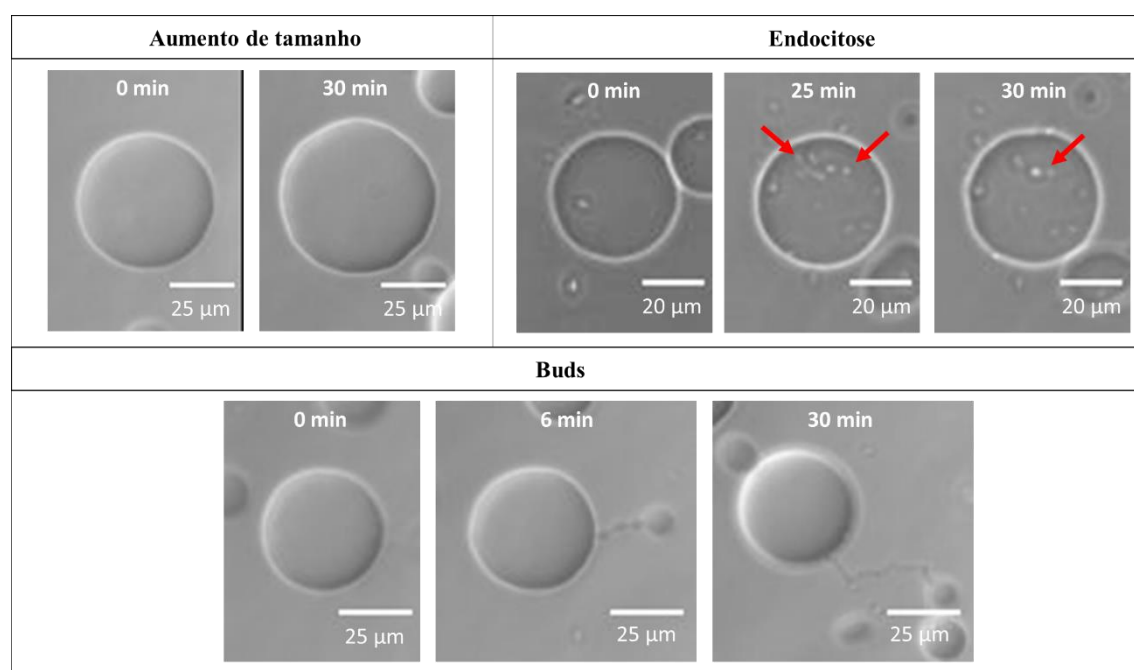


Figura 38: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença de BPA na concentração de 1×10^{-4} mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 de envelhecimento.

Diferentemente do DPPC, o envelhecimento da solução continuou afetando as GUVs de DOPC, os mesmos efeitos foram observados como pode-se observar na Figura 38, incluindo o aumento de tamanho, as flutuações, endocitose e *budding*. Tal fato, pode estar relacionado a maior fluidez de bicamada de DOPC se comparada a maior rigidez do DPPC, o que permitiria uma maior interação entre o analito e a vesícula, pois lipídios em fases mais fluidas possuem maior desordem na região da cauda, maior mobilidade e menor densidade das caudas (Leonenko *et al.*, 2004).

De forma a se obter uma comparação entre as vesículas expostas a soluções frescas e envelhecidas foi realizada uma análise quantitativa das porcentagens de GUVs afetadas em cada amostra de forma similar ao obtido na Figura 37. A este estudo foi adicionada uma terceira amostra com solução com 48 horas de envelhecimento. A Tabela 4 mostra os dados obtido para esta análise.

Tabela 4: Análise quantitativa para as GUVs de DOPC para as amostras de 1×10^{-4} mol/L de BPA fresca e envelhecidas durante 24 e 48 horas:

Solução fresca					
Tamanho (μm)	Não-afetadas	Endocitose	Bud	Flutuações	Multiplos efeitos
< 10	56,65	4,82	20,00	20,00	1,38
10 – 30	31,89	24,13	33,18	34,48	18,53
> 30	2,90	37,68	30,43	73,91	30,43
Total	35,42	19,9	28,47	35,87	14,80
+24 horas					
Tamanho (μm)	Não-afetadas	Endocitose	Bud	Flutuações	Multiplos Efeitos
< 10	67,3	0	4,1	28,5	0
10 - 30	38,5	14,7	28,4	35,8	17,4
> 30	3,3	53,3	50	70	63,3
Total	40,4	17	25,5	39,4	20,2
+48 horas					
Tamanho (μm)	Não-afetadas	Endocitose	Bud	Flutuações	Multiplos Efeitos
< 10	85,1	0	2,1	12,8	0
10 - 30	56,5	17,1	5	23,2	9,1
> 30	40	23,5	8,8	23,5	5,9
Total	63,3	13,9	5	20,5	6,1

De forma geral, os dados obtidos para as amostras frescas e envelhecidas por apenas 24 horas são relativamente parecidos, com pequenas oscilações. Se analisarmos com cuidado pode-se observar que as maiores oscilações estão presentes nos grupos de GUVs maiores que 30 μm , e isso ocorre devido a este grupo conter a menor quantidade de GUVs contadas. Porém, se analisarmos as porcentagens totais podemos notar que as diferenças entre cada amostras não são muito grandes. Por exemplo, as não-afetadas foram 35,4 para 40,4 % (~ 5 % de variação), a endocitose foi de 19,9 para 17 % (~ 3 % de variação), os budding foram de 28,5 até 25,5 (~ 3 % de variação), as flutuações foram de 35,9 para 39,4 % ($\sim 3,5$ % de variação) e os efeitos múltiplos foram de 14,8 para 20,2 % ($\sim 5,4$ % de variação). Isso indica que grau de agregação do BPA após 24 horas não é suficiente para alterar os efeitos observados na amostra fresca.

Contudo, a amostra com 48 horas de estocagem apresentou uma diminuição maior se comparada as amostras anteriores. A quantidade de vesículas não afetadas subiu para 63,3 %, enquanto todos os efeitos apresentaram uma diminuição na porcentagem de GUVs afetadas. Isso indica que o nível de agregação do BPA após 48 horas de estocagem passou a ser menos efetivo na interação, provavelmente devido ao tamanho do agregado, o que está inibindo a interação entre o analito e a bicamada.

Apesar de os resultados na concentração de 1×10^{-5} mol/L não terem apresentado nenhum efeito visual, foi realizada a análise das amostras envelhecidas (24 horas) para o BPA e MIX. A Figura 39 mostra os resultados das GUVs de DOPC expostas ao BPA envelhecido por 24 horas (1×10^{-5} mol/L) durante um período de 30 minutos. De forma similar, ao obtido para as soluções frescas, as GUVs não foram afetadas pela exposição ao BPA e MIX.

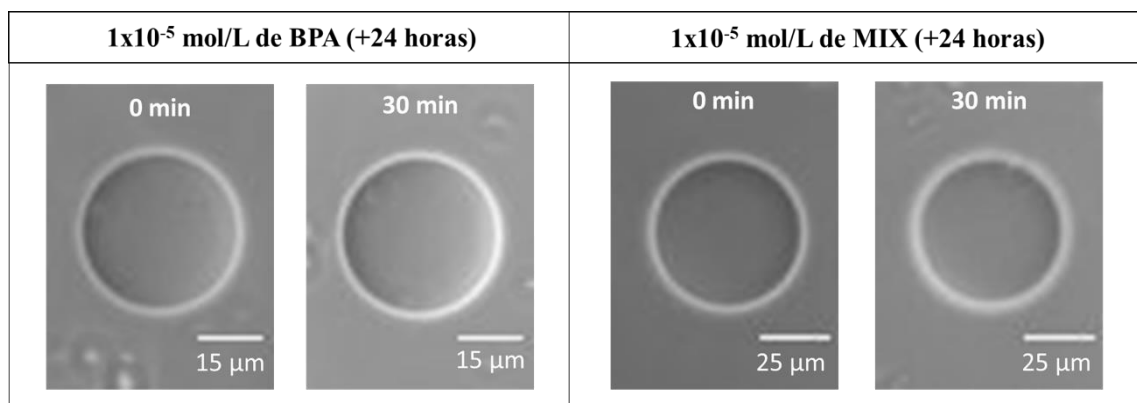
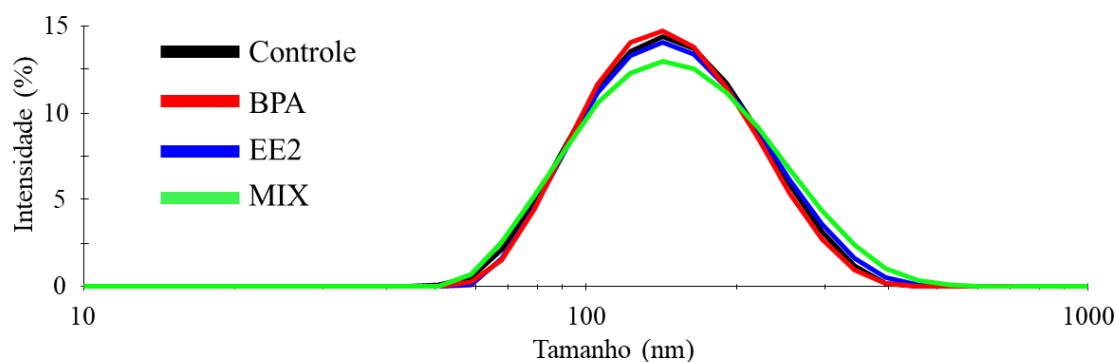


Figura 39: Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DOPC na presença do BPA e MIX na concentração de 1x10⁻⁵ mol/L, no intervalo de tempo de 30min após 24 horas de envelhecimento.

4.7. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)

4.7.1. DPPC

A Figura 40 mostra os resultados obtidos para a distribuição de tamanho das vesículas de DPPC expostas aos poluentes BPA, EE2 e MIX na concentração de 1x10⁻⁵ mol/L coletados em temperatura ambiente (~23 °C) no intervalo de 60 min.



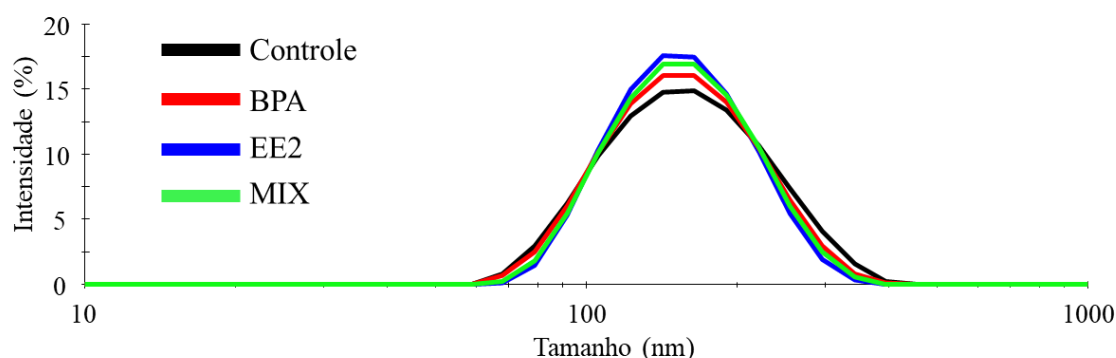
Tamanho das LUVs de DPPC após 60 min				
	Controle	BPA	EE2	MIX
0 min (d - nm)	137,2 ± 1,03	140,6 ± 1,67	141,3 ± 0,64	139,2 ± 0,61
PdI - 0 min	0,133	0,187	0,148	0,154
60 min (d - nm)	134,3 ± 1,48	143,3 ± 0,53	145,1 ± 3,01	141,5 ± 1,55
PdI - 60 min	0,136	0,181	0,175	0,164

Figura 40: (A) Distribuição de tamanho das vesículas de DPPC medidas durante um período de exposição de 60 min nas amostras aquosa, BPA, EE2 e MIX. A concentração dos poluentes foi de 1×10^{-5} mol/L e as análises foram realizadas em temperatura ambiente (~ 23 °C). (B) Tabela com os valores médios de diâmetro das LUVs e do PdI nos intervalos de 0 e 60 min.

A análise de tamanho das LUVs teve por objetivo avaliar se a presença dos poluentes induziria variações no diâmetro/volume das vesículas, principalmente depois que foi observado que o BPA afetava o tamanho das vesículas (no caso as GUVs de DOPC). O resultado obtido para a amostra controle é coerente com dados encontrados na literatura (Morato *et al.*, 2021), sendo que todas as amostras apresentaram valores baixos de índice de polidispersividade (PdI). A princípio as LUVs em solução aquosa apresentaram um tamanho médio de 137,2 nm (um valor próximo ao tamanho dos poros da membrana utilizada na extrusão), após os 60 min as amostras apresentaram um tamanho de 134,3 nm, tal variação está dentro dos valores esperados para esse tipo de amostras, indicando que a amostra é estável. De forma geral, a exposição aos poluentes causou pequenas variações nos valores de tamanho médio das LUVs, pois observou-se um pequeno aumento no diâmetro das vesículas que variam de 2 a 4 nm. Contudo, tal variação é negligenciável, pois os valores são muito menores que o desvio padrão. Isso indica que os poluentes não afetaram de forma significativa o tamanho das LUVs, como foi observado para as GUVs expostas ao BPA. No entanto, o efeito de aumento do tamanho foi observado apenas em vesículas maiores que $10 \mu\text{m}$. E ainda vale ressaltar que nessa concentração (1×10^{-5} mol/l) as GUVs de DPPC não foram afetadas significativamente, principalmente se analisarmos as GUVs menores que $10 \mu\text{m}$ (Tabela 2). No trabalho de Farkuh *et al.* (Farkuh *et al.*, 2019) foi estudada a influência do ácido láurico na distribuição de tamanho de vesícula de DPPC em diferentes concentrações. Assim como nesse trabalho, não foram observadas variações significativas no diâmetro das LUVs. Os autores atribuíram essas mudanças ao tipo de interações observadas no estudo (ligações de hidrogênio com a cabeça do lipídio), além do alto empacotamento das bicamadas de DPPC.

4.7.2. DOPC

A Figura 41 mostra os resultados obtidos para a distribuição de tamanho das vesículas de DOPC expostas aos poluentes BPA, EE2 e MIX na concentração de 1×10^{-5} mol/L coletados em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) no intervalo de 60 min.



Tamanho das LUVs de DOPC após 60 min				
	Controle	BPA	EE2	MIX
0 min (d - nm)	145,9 ± 0,16	146,9 ± 1,04	143,7 ± 0,63	146,1 ± 0,53
PdI - 0 min	0,120	0,097	0,091	0,106
60 min (d - nm)	144,8 ± 0,91	145,4 ± 1,23	145,5 ± 0,15	146,0 ± 2,11
PdI - 60 min	0,104	0,099	0,085	0,092

Figura 41: (A) Distribuição de tamanho das vesículas de DOPC medidas durante um período de exposição de 60 min nas amostras aquosa, BPA, EE2 e MIX. A concentração dos poluentes foi de 1×10^{-5} mol/L e as análises foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$). (B) Tabela com os valores médios de diâmetro das LUVs e do PdI nos intervalos de 0 e 60 min.

Os valores de distribuição de tamanho das LUVs de DOPC em solução aquosa são correntes com os resultados obtidos na literatura (Muraoka *et al.*, 2012), sendo que todas amostras apresentaram baixos valores de PdI. Assim como para o DPPC, a amostra de DOPC em solução aquosa apresentou um valor de tamanho médio inicial de 145,9 nm (0 min), e após 60 min de exposição o valor foi de 144,8 nm, o que indica que amostra é estável dentro destes intervalos de tempo. Para todo os poluentes não se observou uma variação significativa de tamanho das vesículas, com variações menores que ± 2 nm. Isso indica que os poluentes não

afetam o tamanho das vesículas nesse intervalo de tempo (60 min) e nessa concentração (1×10^{-5} mol/L). Tal fato, pode estar ligado simplesmente ao tamanho das vesículas, pois assim como observado nas análises quantitativas das GUVs, vesículas com maior tamanho são mais afetadas do que vesículas menores, possivelmente devido a área de superfície ou raio de curvatura. Um resultado semelhante ao observado nesse trabalho foi reportado Luna *et al.* (Luna *et al.*, 2019), onde foi estudada a influência do alcaloide lipofílico noscapina sobre LUVs de DOPC. Os valores de diâmetro reportados não variaram de forma significativa, oscilando de 200 para 210 nm. O intuito dos autores era exatamente que esse efeito fosse observado, pois a noscapina apresentava um comportamento protetivo contra o estresse oxidativo.

4.7.3. Análises BPA concentrado

Nas análises das GUVs, o BPA apresentou efeitos apenas em concentrações superiores à de 1×10^{-4} mol/L. Sendo assim, foram medidas amostras com essa concentração para avaliar se o mesmo comportamento era observado para as LUVs. A Tabela 5 sumariza os resultados obtidos para esse estudo.

Tabela 5: Valores médios de diâmetro das LUVs e do PdI para LUVs DPPC e DOPC expostas a 1×10^{-4} mol/L de BPA nos intervalos de 0 e 60 min.

LUVs de DPPC em BPA (1×10^{-4} mol/L)		
	Controle	BPA
0 min (d - nm)	$134,0 \pm 47,62$	$141,0 \pm 53,01$
PdI - 0 min	0,126	0,167
60 min (d - nm)	$135,1 \pm 60,92$	$142,6 \pm 65,54$
PdI - 60 min	0,130	0,168
LUVs de DOPC em BPA (1×10^{-4} mol/L)		
	Controle	BPA
0 min (d - nm)	$132,5 \pm 48,26$	$137,6 \pm 59,46$
PdI - 0 min	0,095	0,126
60 min (d - nm)	$131,9 \pm 47,47$	$134,5 \pm 52,49$
PdI - 60 min	0,093	0,108

Apesar do aumento da concentração as variações de tamanho das LUVs para ambos os lipídios foram negligenciáveis, uma vez que o diâmetro das vesículas oscilou ± 3 nm, o que está dentro da margem de erro da medida. Tal diferença de resultados entre GUVs e LUVs pode estar relacionada ao tamanho das vesículas, uma vez que as GUVs têm maior área de superfície. Inclusive, as análises quantitativas demonstraram tal dependência, sendo que GUVs de maior tamanho ($> 30 \mu\text{m}$), foram mais afetadas do que as de tamanho médio (entre 10 e $30 \mu\text{m}$), que foram mais afetadas do que as de tamanho pequeno ($< 10 \mu\text{m}$), logo a projeção para vesícula da ordem de 100 nm seria ainda menor.

4.8. Potencial Zeta

A Tabela 5 sumariza os valores de potencial zeta obtidos para ambos os lipídios DPPC e DOPC expostos a solução aquosa, BPA, EE2 e MIX (na concentração de 1×10^{-5} mol/L) nos intervalos de tempo 0, 30 e 60 min.

Tabela 6: Valores de potencial zeta para as LUVs de DPPC e DOPC.

Potencial Zeta das LUVs de DPPC (mV)				
Tempo (min)	Controle	BPA	EE2	MIX
0	$7,09 \pm 0,13$	$5,02 \pm 0,31$	$3,69 \pm 0,22$	$2,84 \pm 0,10$
30	$7,29 \pm 0,24$	$4,51 \pm 0,21$	$2,48 \pm 0,16$	$1,42 \pm 0,19$
60	$6,25 \pm 0,25$	$4,73 \pm 0,09$	$3,02 \pm 0,15$	$3,15 \pm 0,12$
Potencial Zeta das LUVs de DOPC (mV)				
Tempo (min)	Controle	BPA	EE2	MIX
0	$-13,9 \pm 0,56$	$-14,0 \pm 0,95$	$-13,7 \pm 0,35$	$-14,3 \pm 0,50$
30	$-14,9 \pm 0,87$	$-14,0 \pm 0,26$	$-14,9 \pm 1,40$	$-15,7 \pm 0,96$
60	$-12,7 \pm 1,25$	$-16,5 \pm 0,57$	$-14,0 \pm 0,78$	$-15,0 \pm 0,42$

Os valores de potencial zeta obtidos para ambos os lipídios são coerentes com os valores comumente reportados na literatura (Maity *et al.*, 2016; Morato *et al.*, 2021). Para a amostra controle de DPPC os valores de potencial zeta apresentaram carga positiva de 7,09 mV (0 min),

e conforme o tempo de exposição aumentou os valores oscilaram para 7,29 e 6,25 mV (30 e 60 min, respectivamente). Para as amostras expostas aos poluentes não se observou um padrão coerentes entre as amostras, sendo que as medidas oscilaram entre valores maiores e menores do que o valor inicial (0 min). Além disso, tais oscilações estão bem próximas ao valor de desvio padrão. Desse modo, tornou-se dificultoso tirar alguma conclusão definitiva dessas análises. No trabalho de Morato *et al.* (Morato *et al.*, 2021) foi estudada a influência do inseticida acefato em diferente LUVs de lipídios neutros (DPPC) e carregados. As análises de potencial zeta mostraram que apenas os lipídios carregados foram afetados pela presença do acefato, enquanto o DPPC permaneceu com uma oscilação de potencial zeta menor (assim como o deste estudo). Os autores atribuíram essa diferença as interações entre o acefato e as bicamadas dos lipídios carregados, o que coerente com os nossos resultados, pois ambos os lipídios estudados neste trabalho são zwitteriônicos.

As LUVs de DOPC também apresentaram valores coerentes com os encontrados na literatura (Maity *et al.*, 2016), exibindo potencial zeta negativo. Para as amostras controle, EE2 e MIX os valores de potencial zeta oscilaram próximos aos valores iniciais (0 min), oscilando dentro da margem de ± 1 mV (que é bem próximo dos valores de desvio padrão), o que torna uma conclusão a respeito das mudanças induzidas pelos poluentes bastante difícil, devido a essa similaridade de comportamento das amostras. O BPA apresentou a maior variação de -2,5 mV (de -14 para -16,5 mV). O que pode indicar uma alteração nas cargas das vesículas, devido a uma possível interação. Contudo vale ressaltar que o BPA causou vários efeitos nas LUVs de DOPC, assim como mudanças nos espectros PM-IRRAS, principalmente nos grupos da cabeça do lipídio em que se observam as cargas (colina e fosfato). Ainda assim, essa variação pode ser muito pequena para ser considerar relevante, pois a variação das medidas está próxima ao desvio padrão. No trabalho de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2020) foi estudo a influência de *nanodots* de carbono sobre LUVs de DOPC e de misturas de DOPC com lipídios carregados.

Assim como nesse trabalho os valores de potencial zeta da amostra de DOPC apresentaram valores negativos, e conforme a concentração dos *nanodots* aumentava, os valores decresciam gradualmente. No entanto, para as amostras com lipídios carregados essa oscilação foi maior. Os autores atribuíram essas diferenças a interações eletroestáticas entre o *nanodots* (negativamente carregados) e os lipídios carregados (positivamente), evidenciando a dependência da carga na adsorção de compostos na bicamada. Analisando o sistema desse trabalho, temos que tanto os lipídios quanto os poluentes (BPA e EE2) possuem neutralidade de carga, sendo assim grandes oscilações de potencial zeta podem ser difíceis de serem observadas. Contudo, as análises de PM-IRRAS sugerem que os poluentes interagem com a cabeça dos lipídios (via ligações de hidrogênio), todavia podendo permanecer ao redor da bicamada sem afetar significativamente os valores de potencial zeta de amostra.

4.9. Anisotropia do estado estacionário

A Tabela 6 mostra os dados obtidos para a análise de anisotropia estática para o DPPC e DOPC utilizando a sonda NBD-PE como marcador. O intuito desta técnica foi obter informações a respeito do comportamento da estrutura e dinâmica das bicamadas lipídicas. Fornecendo assim, informações das restrições orientacionais da sonda fluorescente imposta pela ordem/desordem das cadeias alifáticas, podendo assim inferir a respeito da fluidez da bicamada devido a inserção dos poluentes.

Tabela 7: Valores de anisotropia estática obtidos para os lipídios DPPC e DOPC para as amostras controle, BPA, EE2 e MIX (1×10^{-5} mol/L), expostas no intervalo de 60 min, utilizando a sonda NBD-PE.

LUVs de DPPC			
Controle	BPA	EE2	MIX
0,134	0,143	0,219	0,135
	+ 6,7 %	+ 63,4 %	+ 0,75 %
LUVs de DOPC			
Controle	BPA	EE2	MIX
0,097	0,091	0,075	0,089
	- 6,18 %	- 22,68 %	- 8,24 %

Os valores de anisotropia (R) calculados para a amostra controle das LUVs de DPPC contendo a sonda NBD-PE são coerentes com os dados encontrados na literatura (Loura, Fedorov e Prieto, 2000). Após os 60 min de exposição o valor de anisotropia em água foi de 0,134. Com a inserção do BPA ocorreu um ligeiro aumento nos valores de R para 0,143. Nas análises de anisotropia, se o valor de R decresce, isso indica uma maior liberdade/fluidez na bicamada lipídica. Contudo, foi observado um aumento no valor de R (ligeiro enrijecimento na bicamada), o que foi desconsiderado devido a pequena oscilação dos valores de R. Além disso, o BPA estaria tornando a bicamada de DPPC, que já é rígida, ainda menos fluida. A amostra exposta ao EE2 apresentou um aumento maior no valor de R para 0,219 (acréscimo de 63,4%). De mesma forma, tal mudança indica um aumento na rigidez na bicamada, assim como o observado para o BPA, no entanto com o valor de R mais significativo. Contudo, se compararmos esses dados com as GUVs e com o PM-IRRAS nos quais foram observadas mudanças consideráveis, tal modificação pode ser um pouco incompatível. Entretanto, essa variação pode estar simplesmente relacionada ao tamanho das vesículas ou mesmo aos diferentes sistemas utilizados. Apesar das variações observadas para o BPA e EE2, a MIX apresentou um valor de R praticamente idêntico ao da amostra controle, provavelmente devido a concentração dos poluentes, conforme observado em outros experimentos previamente discutidos. No trabalho de Tang *et al.* (Tang *et al.*, 1998) foi estudada a influência do anticorpo antifosfolípide humano em diversos tipos de lipídios, dentre eles o DPPC. A inserção do

anticorpo induziu nas vesículas um aumento no valor de anisotropia para todos os lipídios, no entanto o DPPC foi o que apresentou a menor variação entre as amostras. Os autores atribuíram esse fato ao DPPC possui a região da cauda mais ordenada do que os demais lipídios analisados, correlacionando de forma direta a interação do anticorpo com o nível de ordenamento das caudas.

As vesículas de DOPC apresentaram um comportamento similar ao comumente reportado na literatura (Loura, Fedorov e Prieto, 2000), exibindo valores de anisotropia para a amostra controle de 0,097. De forma geral, com a inserção dos poluentes ocorreu uma diminuição dos valores de R. Tanto o BPA quanto a MIX apresentaram variações muito pequenas (0,091 e 0,089, respectivamente). A amostra exposta ao EE2 causou uma variação maior do que a dos outros poluentes, diminuindo o valor de R para 0,075 (decréscimo de 22,7%). Ressaltando que uma diminuição nos valores de R indica um aumento na fluidez, a exposição das LUVs aos poluentes estaria tornando o ambiente ainda mais fluido.

Capítulo 5

Conclusão

Capítulo 5 - Conclusão

A inserção dos disruptores endócrinos nas monocamadas de DPPC causaram de forma geral expansões para maiores valores de áreas, porém os mesmos foram aparentemente expulsos da interface ar-água conforme as pressões de superfície mais altas foram atingidas, devido a rigidez da monocamada de DPPC, superando as interações observadas na seção do PM-IRRAS, onde possivelmente formaram-se ligações de hidrogênio entre os analitos e o grupo fosfato do DPPC. As análises em diferentes pHs (3 e 7,4) mostraram que os poluentes não foram afetados de forma significativa. No entanto, a aplicação da temperatura tornou monocamada de DPPC mais desorganizada, permitindo assim, uma maior interação entre o lipídio e os disruptores, comprovadas pelas expansões observadas nas isotermas.

Os resultados obtidos para o DOPC foram diferentes dos obtidos para o DPPC, uma vez que em todas as subfases ocorreram expansões para maiores valores de área. Mesmo que as mesmas interações tenham sido observadas no PM-IRRAS (ligações de hidrogênio entre os analitos e o fosfato do DOPC). A mudança reside na fluidez da monocamada, uma vez que para lipídios mais fluidos existe uma maior liberdade para a interação, o que permite que os analitos permaneçam mais próximos a região da cabeça do lipídio.

A MIX dos poluentes demonstrou um comportamento interessante no estudo das monocamadas. Para o DPPC todas as MIX tiveram o comportamento de uma mistura ideal. No entanto, para as amostras de DOPC o comportamento foi sinérgico. O que reforça a hipótese de dependência da fluidez na interação do BPA e EE2 com a monocamada.

Para as bicamadas de DPPC tanto o EE2 quanto a MIX apresentaram a perda no contraste de fase, o que indica que o EE2 é o responsável por tal efeito. Contudo, nas bicamadas de DOPC nenhum efeito foi observado.

Apesar de BPA não apresentar efeitos nas concentrações mais baixas (1×10^{-5} mol/L), o mesmo foi muito efetivo para as concentrações mais altas causando efeitos para ambos os

lipídios. Para DPPC o BPA induziu um enrugamento da superfície (perturbação da curvatura), que normalmente ocorre para o lipídio, porém numa taxa e tempo muito menores do que o observado.

O DOPC exposto ao BPA apresentou a maior quantidade de efeitos observados, incluindo flutuações de superfície, formação de “buddings”, formação de um processo similar a endocitose e aumento do tamanho da GUVs. Isso indica que a presença do BPA afetou significativamente as vesículas do lipídio, inclusive demonstrando uma dependência do tamanho das vesículas, o que demonstra a já difundida afinidade do BPA por estrutura biológicas, em especial lipídios e de a sua lipofilicidade.

Outro fato interessante relacionado ao BPA reside em sua variação nos resultados conforme o envelhecimento da solução ocorre. Notou-se que para o DPPC (bicamada mais rígida) 24 horas já são suficientes para que as GUVs não sejam afetadas. Porém para bicamadas mais fluidas (DOPC) mesmo após 48 horas alguns efeitos ainda são observados.

De forma geral os dados obtidos para as vesículas unilamelares grandes foram pouco conclusivos, sem a observação de grandes oscilações, principalmente por parte da MIX que apresentou as menores variações. Possivelmente, essa diferença reside no tamanho das LUVs, que parece ser um fator importante como observado nas análises quantitativas das GUVs.

Os dados obtidos a respeito da MIX não foram sinérgicos, mas sim aditivos, ou seja, os resultados observados foram uma combinação dos efeitos separados de cada poluente. Além disso, os menores efeitos observado para a MIX, podem estar relacionados com a quantidade de moléculas no sistema, pois nas soluções das misturas metade das moléculas são do BPA e a outra metade do EE2, o que essencialmente diminui a concentração individual se comparado com os poluentes separados, o que ajuda explicar o porquê dos efeitos terem sido menos efetivos para a MIX.

6. Referências

- AHMED, M. B. *et al.* Sorptive removal of phenolic endocrine disruptors by functionalized biochar: Competitive interaction mechanism, removal efficacy and application in wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 801–811, 1 mar. 2018.
- AKINGBEMI, B. T. *et al.* Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol a Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 592–603, 2004.
- AOKI, P. H. B. *et al.* Molecularly Designed Layer-by-Layer (LbL) Films to Detect Catechol Using Information Visualization Methods. **Langmuir**, v.28, p. 7542-7550, 2013.
- AOKI, P. H. B. *et al.* Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. **Langmuir**, v. 32, n. 15, p. 3766–3773, 2016.
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. **Environment International**, v.69, p. 104-119, 2014.
- AROTI, A. *et al.* Effects of hofmeister anions on DPPC langmuir monolayers at the air-water interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 39, p. 15238–15245, 30 set. 2004.
- BARNETT, S. M. *et al.* Pressure-tuning infrared and solution Raman spectroscopic studies of 17 β -estradiol and several A-ring and 17 α -ethynyl estradiol derivatives. **Vibrational Spectroscopy**, v. 8, p. 263-277, 1995.
- BEASLEY, D. E. *et al.* The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 29 jul. 2015.
- BERGMAN, A. *et al.* State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors. **World Health Organization**, 2012.
- BHANDARI, R. K. *et al.* Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethynyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 214, p. 195–219, 2015.
- 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 - Biomembranes**, v. 1848, n. 12, p. 3175–3180, 2015.
- BILTONEN, R. L.; LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 129-142, 1993.
- BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: The epidemiological evidence. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 608, p. 157–162, 2006.
- BRONIATOWSKI, M. *et al.* Studies on the interactions of bisphenols with anionic phospholipids of decomposer membranes in model systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 4, p. 756–766, 2016.
- CASILLAS-ITUARTE, N. N. *et al.* Na⁺ and Ca²⁺ effect on the hydration and orientation of the phosphate group of DPPC at air - Water and air - Hydrated silica interfaces. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 29, p. 9485–9495, 29 jul. 2010.

CHATGILIALOGLU, C. *et al.* cis-trans Isomerization of monounsaturated fatty acid residues in phospholipids by thiyl radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 19, p. 4593–4601, 17 maio 2000.

CHEN, L. *et al.* Molecular Dynamics Simulations of the Permeation of Bisphenol A and Pore Formation in a Lipid Membrane. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–7, 2016a.

CLINICAL DRUGSTATS DATABASE. The Top 300 Drugs of 2019. Disponível em: <<https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>>. Acesso em: 1 maio. 2022.

COLLINS, P. Risk factors for cardiovascular disease and hormone therapy in women. **Heart**, v. 92, p. 24-28, 2006.

CORRALES, J.; KRISTOFKO, L. A.; BAYLOR STEELE, W.; *et al.* Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. **Dose-Response**, v. 13, n. 3, 1 jul. 2015.

CORRALES, J.; KRISTOFKO, L. A.; STEELE, W. B.; *et al.* Global Assessment of Bisphenol A in the Environment. **Dose-Response**, v. 13, n. 3, p. 15593258-1559830, 29 jul. 2015.

COSTA, E. M. F. *et al.* Efeitos dos desreguladores endócrinos no desenvolvimento do trato reprodutivo feminino. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 153–161, 2014.

CUTRÓ, A. C. *et al.* Phenylalanine interaction with lipid monolayers at different pHs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 504–509, 2015.

DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**. New York: Academic Press, 1963.

DESHPANDE, S. *et al.* Membrane Tension–Mediated Growth of Liposomes. **Small**, v. 15, n. 38, p. 1–10, 2019.

DIMOVA, R. Giant Vesicles and Their Use in Assays for Assessing Membrane Phase State, Curvature, Mechanics, and Electrical Properties. **Annual Review of Biophysics**, v. 48, p. 93-119, 2019.

DU, B. *et al.* Occurrence and risk assessment of steroid estrogens in environmental water samples: A five-year worldwide perspective. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115405, 2020.

FARKUH, L. *et al.* Characterization of phospholipid vesicles containing lauric acid: physicochemical basis for process and product development. **Heliyon**, v. 5, n. 10, 1 out. 2019.

FLINT, S. *et al.* Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p.19-34, 2012.

FRANKE, T. *et al.* Phase Transition Induced Adhesion of Giant Unilamellar Vesicles. **ChemPhysChem**, v. 10, p. 2858–2861, 2009.

FREDJ, S. BEN *et al.* Removal of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid-liquid extraction. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 417–426, 2015.

GONG, Y.; WINNIK, F. M. Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 4, n. 2, p. 360–368, 2012.

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**, v. 431, p. 24–30, 2014.

GREGORASZCZUK, E. L. *et al.* Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to three different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs). **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 58–66, jan. 2008.

HAC-WYDRO, K. *et al.* The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 150, n. 1, p. 22–34, 2007.

HĄC-WYDRO, K.; POŁEĆ, K.; BRONIATOWSKI, M. The comparative analysis of the effect of environmental toxicants: Bisphenol A, S and F on model plant, fungi and bacteria membranes. The studies on multicomponent systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 289, 2019.

HIDALGO, A. A. *et al.* Interaction of two phenothiazine derivatives with phospholipid monolayers. **Biophysical Chemistry**, v. 109, p. 85–104, 2004.

HUC, L. *et al.* Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 5, p. 709–717, 2012.

JERRY, D. J. *et al.* Genetic variation in sensitivity to estrogens and breast cancer risk. **Mammalian Genome**, v. 29, n. 1, p. 24–37, 2018.

JORI, G. Tumour photosensitizers : approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, p. 87–93, 1996.

MIÑONES JR, J. M. *et al.* Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes — A Langmuir monolayer study. **Biophysical Chemistry**, v. 140, p. 69–77, 2009.

JURAK, M. *et al.* Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 222, p. 385–397, 2015.

KAMILYA, T.; TALAPATRA, G. B. Reorganization and nanoscale domain formation in phospholipid Langmuir-monolayer. **Asin J. Phys**, v. 18, p. 105–111, 2008.

KELLUM, J. A. **Determinants of blood pH in health and disease**. Disponível em: <<http://ccforum.com/content/4/1/006>>. Acesso em: 1 maio. 2022.

KERDOUS, R.; HEUVINGH, J.; BONNEAU, S. Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 12, p. 2965–2972, 2011.

KHATTARI, Z.; MAGHRABI, M.; AL-ABDULLAH, T. Temperature effect on thin lipid film elasticity and phase separation: Insights from Langmuir monolayer and fluorescence microscopy techniques. **Phase Transitions**, v. 88, n. 7, p. 668–681, 2015.

KIDD, K. A. *et al.* **Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen**. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0609568104>. Acesso em: 1 maio. 2022.

KRAJEWSKA, B. Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on Chitosan Interactions with Membrane Lipids in Langmuir Films. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 4144–4152, 2011.

- KRAJEWSKA, B.; KYZIOŁ, A.; WYDRO, P. Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: II. DPPC and cholesterol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 434, p. 359–364, 2013.
- KRAWCZYK, K. *et al.* A mixture of persistent organic pollutants detected in human follicular fluid increases progesterone secretion and mitochondrial activity in human granulosa HGrC1 cells. **Reproductive Toxicology**, v. 104, p. 114–124, 1 set. 2021.
- LAURENSEN, J. P. *et al.* Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: A review of recent risk assessment data. **The AAPS Journal**, v. 16, p. 299–310, 2014.
- LEONENKO, Z. V. *et al.* Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 6, p. 3783–3793, 2004.
- LEVIN, I. W. *et al.* Two Types of Hydrocarbon Chain Interdigitation in Sphingomyelin Bilayers. **Biochemistry**, v. 24, n. 22, p. 6282–6286, 1985.
- LI, A. *et al.* The Dependence of the Miscibility, Stability and Compressibility of Dioleoylphosphatidylcholine/Rutin Laurate Monolayer at the Air/Water on Temperature. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 13, n. 07, p. 131–139, 2020.
- LIPOWSKY, R. Coupling of bending and stretching deformations in vesicle membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 208, p. 14–24, 2014.
- LOPES, D. *et al.* Proof of pore formation and biophysical perturbations through a 2D amoxicillin-lipid membrane interaction approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 5, p. 803–812, 2017.
- LOPEZ-RODRIGUEZ, D. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals and their effects on puberty. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 35, n. 5, p. 101579, set. 2021.
- LOURA, L. M. S.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Membrane probe distribution heterogeneity: A resonance energy transfer study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 29, p. 6920–6931, 27 jul. 2000.
- LÚCIO, M. *et al.* Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to DPPC: Structure and thermodynamic aspects. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4132–4139, 2008.
- LUNA, M. A. *et al.* Vehiculization of nescapine in large unilamellar vesicles. Study of its protective role against lipid peroxidation by electrochemical techniques. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 26–32, 15 jan. 2019.
- MACON, M. B.; FENTON, S. E. Endocrine disruptors and the breast: Early life effects and later life disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, p. 43–61, 2013.
- MAITY, P. *et al.* Effect of counterions on the binding affinity of Na⁺ ions with phospholipid membranes. **RSC Advances**, v. 6, n. 87, p. 83916–83925, 2016.
- MARIANI, M. E.; SÁNCHEZ-BORZONE, M. E.; GARCÍA, D. A. Effects of bioactive monoterpene ketones on membrane organization. A langmuir film study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 198, p. 39–45, 2016.
- MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1286, p. 183–223, 1996.
- MARSH, D. **Handbook of Lipid Bilayers**. 2nd Edition, CRC Press, 2013.

MARTYNIUK, C. J. *et al.* Twenty years of transcriptomics, 17 α -ethinylestradiol, and fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 286, p. 113325, 2020.

MAXIMINO, M. D. **Interação entre modelos de membrana biológica e poluentes emergentes**. 2016, Dissertação de Mestrado – Ciência dos Materiais, UNESP.

MAXIMINO, M. D. *et al.* Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. **Applied Surface Science**, v. 476, 2019.

MAXIMINO, M. D. *et al.* Consequences of the exposure to bisphenol A in cell membrane models at the molecular level and hamster ovary cells viability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, n. April, 2021.

MEER, G. VAN *et al.* Lipid map of the mammalian cell Lipid Map of the Mammalian Cell. **Journal of Cell Science**, v. 2011, p. 5–8, 2011.

MIÑONES, J. *et al.* Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes - A Langmuir monolayer study. **Biophysical Chemistry**, v. 140, n. 1–3, p. 69–77, mar. 2009.

MORATO, L. F. C. *et al.* Effects of insecticide acephate on membrane mimetic systems: The role played by electrostatic interactions with lipid polar headgroups. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, 15 jun. 2021.

MOURITSEN, O. G.; BAGATOLLI, L. A. **Life - As A Matter of Fat**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

MURAOKA, T. *et al.* Ion permeation by a folded multiblock amphiphilic oligomer achieved by hierarchical construction of self-assembled nanopores. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 48, p. 19788–19794, 5 dez. 2012.

NAGARAJAN, S. *et al.* Dynamics of the gel to fluid phase transformation in unilamellar DPPC vesicles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 46, p. 13749–13756, 2012.

NURAJE, N.; BAI, H.; SU, K. Bolaamphiphilic molecules: Assembly and applications. **Progress in Polymer Science**, 2012.

PAN, B.; XING, B. Competitive and complementary adsorption of bisphenol a and 17 α -ethinyl estradiol on carbon nanomaterials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8338–8343, 28 jul. 2010.

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**, v. 145, p. 201–207, 2016.

PAZIN, W. M. *et al.* Interaction of Artepillin C with model membranes: Effects of pH and ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 410–417, 2019.

PAZIN, W. M. *et al.* The protective effect of Artepillin C against lipid oxidation on model membranes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 324, 2021.

PRAPER, T. *et al.* Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation. **PNAS**, v. 108, p. 21016–21021, 2011.

QIU, W. *et al.* The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 192–202, 30 maio 2019.

RAMU, A.; RAMU, N. Reversal of multidrug resistance by phenothiazines and structurally related compounds. p. 165–173, 1992.

RESEARCH AND MARKETS. **Bisphenol - A Market Report - A Global Market Overview 2016-2022**. Disponível em: <<https://globenewswire.com/news-release/2016/07/26/858874/0/en/Bisphenol-A-Market-Report-A-Global-Market-Overview-2016-2022.html>>. Acesso em 1 de maio de 2022.

ROELL, K. R.; REIF, D. M.; MOTSINGER-REIF, A. A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

ROSE, E.; PACZOLT, K. A.; JONES, A. G. The effects of synthetic estrogen exposure on premating and postmating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1160–1170, dez. 2013.

RUIZ, G. C. M. *et al.* Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 102–110, 2017.

RUIZ, G. C. M. *et al.* Correlating mono- and bilayers of lipids to investigate the pronounced effects of steroid hormone 17 α -ethynylestradiol on membrane models of DPPC/cholesterol. **Journal of Molecular Liquids**, v. 311, p. 113324, 2020.

RUIZ, G. C. M. *et al.* Chemical and morphological effects of the contraceptive hormone 17 α -ethynylestradiol on fluid lipid membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, n. March, 2021a.

SAMBE, H. *et al.* Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1–2, p. 16–23, 2006.

SANVER, D. *et al.* Experimental Modeling of Flavonoid – Biomembrane Interactions. **Langmuir**, v. 32, p. 13234-13243, 2016.

SCHEIDT, H. A.; BADEAU, R. M.; HUSTER, D. Investigating the membrane orientation and transversal distribution of 17 β -estradiol in lipid membranes by solid-state NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 4–5, p. 356–361, maio 2010.

SCHMIDT, T. F. *et al.* Binding of methylene blue onto langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 31, n. 14, p. 4205–4212, 2015.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369–392, 2004.

SIDDIQUE, S.; KUBWABO, C.; HARRIS, S. A. A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. **Emerging Contaminants**, v. 2, n. 4, p. 204–219, 2016.

SOLON, J. *et al.* Negative tension induced by lipid uptake. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 9, p. 3–6, 2006.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNIG, C. Environmental causes of cancer: Endocrine disruptors as carcinogens. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, p. 363-370, 2010.

- SOVAGO, M. *et al.* Calcium-induced phospholipid ordering depends on surface pressure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 36, p. 11079–11084, 12 set. 2007.
- STANCZYK, F. Z.; ARCHER, D. F.; BHAVNANI, B. R. Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives : pharmacokinetics , pharmacodynamics and risk assessment ☆. **Contraception**, v. 87, n. 6, p. 706–727, 2013.
- STUNGES, G. M. *et al.* Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: The role of charged headgroups. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 627–633, 2017.
- SUN, K. *et al.* Trametes versicolor laccase-assisted oxidative coupling of estrogens: Conversion kinetics, linking mechanisms, and practical applications in water purification. **Science of the Total Environment**, v. 782, 15 ago. 2021.
- SUN, P. *et al.* Sorption and leaching behaviors between aged MPs and BPA in water: The role of BPA binding modes within plastic matrix. **Water Research**, v. 195, 1 maio 2021.
- TAHARA, K. *et al.* Endocytosis-like uptake of surface-modified drug nanocarriers into giant unilamellar vesicles. **Langmuir**, v. 28, n. 18, p. 7114–7118, 8 maio 2012.
- TANG, D. *et al.* Lipid interactions with human antiphospholipid antibody, b 2-glycoprotein 1, and normal human IgG using the fluorescent probes NBD-PE and DPH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1372, p. 45-54, 1998.
- TANG, Y. *et al.* Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. **Water Environment Research**, v. 91, p. 984-991, 2019.
- TCHAIKOVSKI, S. N.; ROSING, J. Mechanisms of Estrogen-Induced Venous Thromboembolism. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 5-11, 2010.
- TEODOSIU, C. *et al.* Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 197, p. 1210-1221, 2018.
- ULLAH, R.; AHMAD, I.; ZHENG, Y. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of “Bisphenol A”. **Journal of Spectroscopy**, v. 2016, p. 1–5, 2016.
- ULLAH, R.; WANG, X. Molecular vibrations of bisphenol “S” revealed by FTIR spectroscopy and their correlation with bisphenol “A” disclosed by principal component analysis. **Applied Optics**, v. 57, n. 18, p. D20, 20 jun. 2018.
- ULRICH, A.S. *et al.* Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1191, p. 225-230, 1994.
- VANCE, J. E. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. **Traffic**, v. 16, n. 1, p. 1–18, jan. 2015.
- VASILACHI, I. C. *et al.* Occurrence and fate of emerging pollutants in water environment and options for their removal. **Water**, v. 13, p. 181, 2021.
- VEEN, J. N. VAN DER *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1859, p. 1558-1572, 2017.

WANG, C. *et al.* Bisphenol A(BPA), BPS and BPB-induced oxidative stress and apoptosis mediated by mitochondria in human neuroblastoma cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, n. April 2020, 2021.

WANG, Y. *et al.* Chain orientation and headgroup structure in Langmuir monolayers of stearic acid and metal stearate (Ag, Co, Zn, and Pb) studied by infrared reflection-absorption spectroscopy. **Journal of Chemical Physics**, v. 124, n. 13, 7 abr. 2006.

WANG, Z.; YANG, S. Effects of fullerenes on phospholipid membranes: A langmuir monolayer study. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 13, p. 2284–2289, 2009.

WARNER, K. E.; JENKINS, J. J. Effects of 17alpha-ethinylestradiol and bisphenol A on vertebral development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 26, n. 4, p. 732–7, 2007.

WETHERILL, Y. B. *et al.* The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 7, p. 515–524, 2002.

WILSON, J. *et al.* Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 294, p. 21–31, 1 mar. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Information sheet: Pharmaceuticals in drinking-water**. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/m/item/information-sheet-pharmaceuticals-in-drinking-water>>. Acessado em: 10 de junho de 2023.

WU, H. *et al.* Retentions of bisphenol A and norfloxacin by three different ultrafiltration membranes in regard to drinking water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 294, p. 410–416, 2016.

ZAWISZA, I. *et al.* PM IRRAS investigation of thin silica films deposited on gold. part 1. Theory and proof of concept. **Langmuir**, v. 23, n. 18, p. 9303–9309, 28 ago. 2007.

ZAWISZA, I.; BIN, X.; LIPKOWSKI, J. Potential-driven structural changes in Langmuir-Blodgett DMPC bilayers determined by in situ spectroelectrochemical PM IRRAS. **Langmuir**, v. 23, n. 9, p. 5180–5194, 24 abr. 2007.

ZHANG, S. *et al.* The adsorption behaviour of carbon nanodots modulated by cellular membrane potential. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 3, p. 880–890, 1 mar. 2020.

ZHAO, H. *et al.* A combination of electro-enzymatic catalysis and electrocoagulation for the removal of endocrine disrupting chemicals from water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 297, p. 269–277, 2015.

ZOELLER, R. T. Environmental Chemicals Impacting the Thyroid: Targets and Consequences. **Thyroid**, v. 17, n. 9, p. 811–817, 2007.