

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências e
Tecnologia – FCT/UNESP Campus de Presidente Prudente

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT)

Luis Fernando do Carmo Morato

**DETECÇÃO DE PESTICIDAS E EFEITOS DE SUAS MISTURAS SOBRE
SISTEMAS MIMÉTICOS DA MEMBRANA CELULAR**

Presidente Prudente/SP

2026

Luis Fernando do Carmo Morato

**DETECÇÃO DE PESTICIDAS E EFEITOS DE SUAS MISTURAS SOBRE
SISTEMAS MIMÉTICOS DA MEMBRANA CELULAR**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor junto à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), área de Ciência dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Coorientador: Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin

Presidente Prudente/SP

2026

Morato, Luis Fernando do Carmo.

Detecção de pesticidas e efeitos de suas misturas sobre sistemas miméticos da membrana celular / Luis Fernando do Carmo Morato. - Presidente Prudente, 2026

190 f. : il.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

1. Biomembranas. 2. Filmes de Langmuir. 3. Vesículas de fosfolípidos. 4. Pesticidas. 5. Sensor Colorimétrico. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: DETECÇÃO DE PESTICIDAS E EFEITOS DE SUAS MISTURAS SOBRE
SISTEMAS MIMÉTICOS DA MEMBRANA CELULAR

AUTOR: LUÍS FERNANDO DO CARMO MORATO

ORIENTADOR: CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

COORIENTADOR: WALLANCE MOREIRA PAZIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais, área: Ciência de Materiais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Participação Virtual)
Departamento de Física / UNESP / Câmpus de Presidente Prudente - FCT



Documento assinado digitalmente
CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO
Data: 29/04/2026 08:58:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. KARIN DO AMARAL RISKE (Participação Virtual)
Departamento de Biofísica / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP

Prof. Dr. LUCIANO CASELI (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / UNESP / Câmpus de Tupã - FCE

Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Assis - FCLAs

Presidente Prudente, 27 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente ao meu pai, Fernando, ao meu irmão João Pedro, aos meus tios Edna e Valdir, aos meus primos Marcel, Gustavo e Fábio, que sempre estiveram comigo, pessoalmente ou em pensamento, me dando apoio nesse período (mesmo eu sendo negligente com as mensagens que esquecia de responder).

Agradeço ao Fernando (Batman), Talyta, Dimitri, Lofrano, Juliana e Gabriele, pelas conversas, cervejas, partidas de boardgames, pela companhia e por me aturar nas horas boas e ruins. Quero agradecer também ao Marcelo, Henry, Diego, Matheusinho, Luiz Guilherme (LG), Isabela, Andressa (Aressa), Maiza e Guilherme pelos dias no laboratório (e fora dele), companhia, viagens, cervejas e cafés. Em especial, gostaria de agradecer ao Luis Felipe, a Gilia e o Mateusão, por me aturarem mais que todos, por me ouvirem quando precisei (e quando não precisei também), por sempre estarem presente em todas as horas, pelas cervejas (mesmo quando só eu bebia), por me acompanharem nas caminhadas (da vida ou físicas), filmes, rodízios. Obrigado por tudo.

Quero agradecer também aos demais membros e ex-membros dos grupos Noix, em especial ao Pedro e ao Rafa, por me acompanharem na iniciação científica. Sem isso, eu não tomaria o rumo que estou nesse momento. Obrigado por terem a paciência comigo nos primeiros passos no laboratório, perguntando hora sim hora também sobre as medidas e as dúvidas que tinha, e pela companhia nos churrascos do grupo.

Agradeço a Priscila, que, além de me orientar no TCC da graduação, me deu conselhos valiosos no mestrado, que levo comigo desde então. Além disso, me deu a oportunidade de conhecer técnicas novas no LARA, me fazendo perder o medo de usar equipamentos que nunca tinha visto antes.

Também agradeço o professor Ludovico, a Simona, Gabriele, Rosanna, Michela, Gabriele 2 (Manca), Martina, Frederica, Mariafrancesca pela companhia e suporte no meu período em Lecce. Grazie a tutti.

Agradeço ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., ao Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki, ao André Ferreira Satoshi, à Profa. Dra. Karin do Amaral Riske, ao Dr. Danilo da Silva Olivier, ao Prof. Dr. Augusto Batagin-Neto, Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral e ao Dr. Orisson Ponce Gomes, pela disponibilidade do tempo de vocês, dos equipamentos e pelos cálculos teóricos, sem os quais não finalizaria esse trabalho.

Agradeço ao meu coorientador, ex-membro do Noix e professor, Wallance. Mesmo não estando na mesma cidade, não nos vendo sempre, foi (e é) muito bom ter você ao meu lado nos trabalhos e na vida. É sempre bom te rever, botar a conversa em dia e tomar uma (ou algumas).

Agradeço em especial ao meu professor e orientador Casé. Fico muito feliz em ter sido aceito pelo senhor como orientando, lá na graduação, quando eu nem sabia o que era fazer pesquisa. Sem isso, eu não teria conhecido as pessoas que citei antes, não teria conhecido lugares maravilhosos, não saberia que a vida podia ser mais do que eu imaginava. Agradeço por me ouvir quando precisei, pelos conselhos, pela confiança que depositou em mim (mesmo que eu ainda tivesse dúvida de mim mesmo). Suas palavras sempre me inspiram e me fazem refletir, procurando fazer o melhor possível.

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 apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processos nº 2018/22214-6, 2020/15185-0, 2023/17209-1 e 2025/27044-5.

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

Agradeço também à CNPq (Processos 306501/2022-8, 311368/2022-0, 408449/2024-1 e 403359/2023-6) e ao INEO (Processos 14/50869-6; 2025/27044-5).

Agradeço por último a minha mãe, Ednéia. Sempre vou agradecê-la por tudo de bom que acontece na minha vida, pois sem você eu não sei o que seria de mim. Você faz falta, e sempre vai fazer, mas todas as minhas conquistas são pra você. Eu não teria nada disso sem seu esforço pra me criar, junto do pai, sempre tentando fazer eu e o João tomar rumo na vida. Espero estar fazendo jus a isso. Você sempre vai estar no meu coração. Te amo.

“E ninguém nos mostrou o caminho para a terra

E ninguém sabe os ondes ou porquês

Mas algo se agita e algo tenta

E começa a subir em direção à luz”

(Echoes – Pink Floyd, traduzido)

Resumo

A exposição simultânea a dois ou mais poluentes pode gerar o chamado “efeito coquetel”, ou seja, ação combinada de mais de um poluente que pode provocar efeitos diversos daqueles observados isoladamente. Nesse contexto, foram investigados os pesticidas acefato e diuron, associados a efeitos neurológicos e carcinogênicos, respectivamente, isolados ou em mistura (ou coquetel). A ação dos pesticidas foi estudada em sistemas miméticos da membrana celular baseados em mono- e bicamadas lipídicas compostas pela mistura POPC/colesterol/esfingomieline (70/20/10 mol %). Os resultados de monocamadas lipídicas envolvendo isothermas π -A, espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho por modulação da polarização (PM-IRRAS) e microscopia por ângulo de Brewster (BAM) mostraram que os pesticidas interagem predominantemente com a região polar das cabeças dos lipídios, corroborado por cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e por dinâmica molecular. Os dados de PM-IRRAS sugerem um maior impacto da mistura de pesticidas na monocamada ternária em nível molecular, evidenciado pela alteração na conformação e orientação da estrutura O-C-C-N na região da cabeça polar. Embora o coquetel não tenha induzido mudanças morfológicas significativas nas bicamadas lipídicas (GUVs), o número de vesículas contadas após a exposição ao coquetel foi significativamente reduzido, tanto para as vesículas expostas após a formação quanto para aquelas expostas durante a formação das GUVs. Experimentos de ITC indicaram baixa afinidade entre os pesticidas e as vesículas. Além disso, ensaio de citotoxicidade aponta para uma maior toxicidade do coquetel, uma vez que a viabilidade celular na presença da mistura se mostrou menor se comparada aos resultados com os pesticidas isolados. Esses resultados evidenciam o impacto do ‘efeito coquetel’ em membranas lipídicas, destacando os potenciais riscos à saúde associados a misturas de pesticidas. Por fim, para detectar o pesticida acefato, foi realizado um estudo para desenvolver um sensor colorimétrico utilizando nanopartículas de ouro com L-cisteína. O sistema apresentou sensibilidade para concentrações da ordem de 10^{-7} mol/L, demonstrando potencial aplicação como ferramenta para monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Biomembranas, filmes de Langmuir, vesículas de fosfolípidos, pesticidas, sensor colorimétrico.

Abstract

Simultaneous exposure to two or more pollutants may lead to the so-called “cocktail effect”, i.e., the combined action of multiple pollutants that can produce different effects from those observed for the individual compounds. In this context, the pesticides acephate and diuron, associated with neurological and carcinogenic effects, respectively, were investigated individually and in mixture (or cocktail). The action of the pesticides was studied in mimetic systems of the cell membrane based on lipid mono- and bilayers composed of a POPC/cholesterol/sphingomyelin mixture (70/20/10 mol%). Results obtained from lipid monolayers, including π -A isotherms, polarization modulation infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS), and Brewster angle microscopy (BAM), showed that the pesticides interact predominantly with the polar head region of the lipids, which was further supported by Density Functional Theory (DFT) calculations and molecular dynamics simulations. PM-IRRAS data suggest a stronger impact of the pesticide mixture on the ternary monolayer at the molecular level, evidenced by changes in the conformation and orientation of the O–C–N structure in the polar head region. Although the cocktail did not induce significant morphological changes in lipid bilayers (GUVs), the number of total vesicles counted after exposure to the cocktail was significantly reduced, both for vesicles exposed after formation and for those exposed during the formation. Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments indicated low affinity between the pesticides and the lipid bilayers. In addition, cytotoxicity assays indicated higher toxicity for the cocktail, as cell viability in the presence of the pesticide mixture was lower than that expected from the proportional effects of the individual pesticides. These results highlight the impact of the cocktail effect on lipid membranes, emphasizing the potential health risks associated with pesticide mixtures. Finally, in order to detect the pesticide acephate, a colorimetric sensor based on gold nanoparticles with L-cysteine was developed. The system showed sensitivity to concentrations of the order of 10^{-7} mol L⁻¹, demonstrating its potential application as a tool for environmental monitoring.

Keywords: biomembranes, Langmuir films, phospholipid vesicles, pesticides, colorimetric sensor.

Lista de Figuras

Figura 1 - estruturas moleculares dos pesticidas (A) acefato e (B) diuron.....	10
Figura 2 - esquema ilustrativo do mosaico fluido das membranas celulares proposto em 1972. Adaptado de ⁴²	11
Figura 3 - ilustração da membrana celular considerando as características descritas mais recentes.....	14
Figura 4 - estruturas moleculares de (A) POPC; (B) colesterol; e (C) esfingomiélin.....	16
Figura 5 - estrutura molecular da L-cisteína e da D-cisteína.....	19
Figura 6 - (A) representação de uma cuba de Langmuir com representação da compressão das barreiras; (B) representação de uma molécula anfifílica.....	22
Figura 7 - (A) representação de uma isoterma π -A com suas respectivas fases (B) representação da diferença em termos de deslocamento entre uma isoterma π -A na ausência (linha preta) e na presença (linhas tracejadas vermelha e azul) de analitos de interesse; (C) representação de uma isoterma π -A de DPPC; e (D) representação de uma isoterma π -A de POPC.....	23
Figura 8 - esquema da incidência do raio polarizado na subfase. Adaptado de ⁸⁰	25
Figura 9 - exemplo de espectros PM-IRRAS nas regiões (A) da cabeça; e (B) da cadeia de hidrocarbonetos.....	26
Figura 10 - representação do (A) ângulo de Brewster; (B) da microscopia por ângulo de Brewster; e (C) exemplo de imagem gerada através da técnica.....	27
Figura 11 - diferentes estruturas de bicamadas e seus respectivos CPPs. Adaptado de ⁹¹	28
Figura 12 - fases das bicamadas lipídicas e suas respectivas conformações de cadeias de hidrocarbonetos (L_β – representação da conformação <i>trans</i> ; L_α – representação da conformação <i>gauche</i>). Adaptada de ⁹⁶	31
Figura 13 - representação esquemática do interior (zoom) de um equipamento de ITC...32	
Figura 14 - termograma da medida de ITC (gráfico superior) e valores das integrais de cada pico em relação à razão molar entre o injetante (lipídio) e o analito (pesticida).....	33
Figura 15 - estruturas moleculares do sal MTT e do produto de sua redução pelas células, formazan.....	36
Figura 16 - esquema do processo experimental da citotoxicidade por meio de ensaio de MTT.....	37

Figura 17 - exemplo de projeção IDMAP mostrando *clusters* referentes às isotermas π -A em diferentes subfases. Cada ponto em um *cluster* representa uma isoterma.....39

Figura 18 - esquema da formação em gel das vesículas unilamelares gigantes (GUVs).....52

Figura 19 - processo de síntese das nanopartículas de ouro.....57

Figura 20 - isotermas π -A da mistura lipídica ternária POPC/Col/SM (7/2/1 em mol %) na ausência (em preto) e presença dos pesticidas acefato (tracejado – verde); diuron (tracejado – magenta); e coquetel Ace/Diu (tracejado - vermelho). As linhas tracejadas em cada curva representam a área extrapolada (A_{ext}) referente à região condensada da isoterma (moléculas lipídicas mais empacotadas). Atividade superficial da subfase com acefato ou diuron à $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L (*inset* abaixo). B: Curvas do módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) das isotermas π -A, destacando o ponto referente à 30 mN/m....60

Figura 21 - projeção IDMAP referente às isotermas π -A da monocamada ternária composta por POPC/Col/SM (7/2/1) em subfase de água ultrapura (*cluster* azul escuro); acefato (*cluster* azul claro); diuron (*cluster* verde); e coquetel Ace/Diu (*cluster* vermelho). As distâncias são representadas pelas linhas pontilhadas com os valores em pixel, calculados por meio do software ImageJ. *Inset*: triplicatas das isotermas π -A obtidas para a monocamada ternária nas distintas subfases.....63

Figura 22 - mudanças na área molecular média devido à presença de acefato (curva verde); diuron (curva magenta); coquetel (curva vermelha). Em azul: média calculada para os valores de área obtidos para as monocamadas na presença de acefato ou diuron na subfase.....65

Figura 23 - isotermas π -A de (A) POPC; (B) Col; (C) SM na ausência (em preto) e presença do coquetel Ace/Diu (tracejado - vermelho). Os *insets* representam os módulos de compressibilidade (Cs^{-1}) das isotermas π -A, destacando o ponto referente à 30 mN/m.....66

Figura 24 - espectros PM-IRRAS da monocamada ternária composta por POPC/Col/SM (70/20/10 mol%) representando a região das cabeças polares ($900-1800\text{ cm}^{-1}$) e da região das cadeias de hidrocarboneto ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$) em subfases de água ultrapura (linha preta), acefato (linha verde), diuron (linha magenta) e coquetel Ace/Diu (linha vermelha).....69

Figura 25 - espectros PM-IRRAS de monocamadas de (A) POPC; (B) colesterol; e (C) esfingomielina em subfase de água ultrapura (curvas pretas) e em subfase do coquetel Ace/Diu (curva vermelha), representando a região das cabeças polares ($900-1800\text{ cm}^{-1}$) e da região das cadeias de hidrocarboneto ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$).....74

Figura 26 - mapas da reatividade local e MEP dos componentes acefato, diuron e POPC, SM e Col. Os mapas evidenciam os sítios reativos em relação a agentes externos nucleófilos (f^+) e eletrófilos (f^-). Para auxiliar a visualização, as estruturas exibindo potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) foram rotacionadas (vista 1 e vista 2). Abaixo encontram-se as estruturas de cada molécula com os respectivos átomos nas cores

correspondentes ao MEP: *cinza: carbono; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; laranja: fósforo; azul: nitrogênio; e verde: cloro. O hidrogênio, representado em preto nas estruturas moleculares, corresponde ao átomo branco nas imagens de MEP.....77*

Figura 27 - mapas da reatividade local e MEP dos sistemas alinhados acefato + diuron; POPC + pesticidas, Col + pesticidas e SM + pesticidas. Os mapas evidenciam os sítios reativos em relação a agentes externos nucleófilos (f^+) e eletrófilos (f^-). Para auxiliar a visualização, as estruturas exibindo potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) foram rotacionadas (vista 1 e vista 2).....79

Figura 28 - (A) estruturas moleculares dos lipídios e dos pesticidas; representação esquemática da monocamada de POPC/Col/SM na presença de (B) acefato; (C) diuron; e (D) coquetel Ace/Diu. Nas imagens 3D dos átomos de acefato e diuron, cada átomo é representado de cor diferente: *azul claro: carbono; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; roxo: fósforo; azul escuro: nitrogênio; e verde: cloro.....83*

Figura 29 - imagens de BAM da monocamada de POPC/Col/SM em subfases de água ultrapura (linha superior) e subfase de coquetel Ace/Diu (linha inferior). Barra de escala: 50 μ m.....84

Figura 30 - imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (controle, linha A); com acefato (linha B); com diuron (linha C); e com a mistura ace/diu (linha D). Todos os pesticidas estão à concentração de 4×10^{-4} mol/L. Barras de escala: 10 μ m. Imagens gravadas em 0, 15 e 30 minutos.....87

Figura 31 - perda do contraste de fase em função do tempo para as vesículas ternárias na presença de (A) acefato e (B) mistura ace/diu. Barras de escala: 10 μ m. Abaixo de cada linha de imagens se encontra o respectivo perfil de valor de cinza. As bordas nas imagens coincidem com as cores de cada curva nos gráficos. (C) variação do valor de cinza em função do tempo.....90

Figura 32 - imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (A); com acefato (B); com diuron (C); e com a mistura ace/diu (D). Todos os pesticidas estão à concentração de 4×10^{-4} mol/L. Barras de escala: 50 μ m. Imagens gravadas após 30 minutos de observação. *As setas azuis indicam vesículas sem contraste de fase; as vermelhas indicam GUVs com formato prolato; e as setas verdes indicam presença de buds.....93*

Figura 33 - análise quantitativa da contagem das vesículas na ausência (barras pretas) e presença de acefato (barras verdes), diuron (barras magentas) e mistura (barras vermelhas) com seus respectivos desvios padrão e número de GUVs contadas. Contagem realizada após 30 minutos de observação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA a um fator, seguida de testes post hoc de Tukey).....94

Figura 34 - análise (A) da contagem total e (B) da média das vesículas na ausência (barras pretas) e presença de acefato (barras verdes), diuron (barras magentas) e mistura (barras vermelhas) após 30 minutos de visualização. * $p < 0,05$ (ANOVA a um fator, seguida de testes post hoc de Tukey).....96

Figura 35 - imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (A); e formadas na presença da mistura ace/diu à concentração de 4×10^{-4} mol/L (B). Barras de escala: 50 μ m. Imagens gravadas após 30 minutos de observação. As setas azuis indicam vesículas sem contraste de fase; as vermelhas indicam GUVs com formato prolatado; e as setas verdes indicam presença de buds.....98

Figura 36 - A – análise quantitativa dos efeitos morfológicos das GUVs de POPC/Col/SM 70/20/10 mol% na ausência (controle) e expostas ao coquetel Ace/Diu durante a formação; e B – número total de vesículas contadas após 30 minutos. Os valores acima das barras se referem aos números de vesículas contadas para cada mudança morfológica ou número de experimento.....99

Figura 37 - termogramas referentes à titulação de LUVs de (A) POPC, (B) SM e (C) mistura ternária em solução de diuron em concentrações iguais a 0,2 e 0,4 mM. As concentrações lipídicas para todas as suspensões são iguais a 20 mM.....101

Figura 38 - termogramas referentes à titulação de LUVs de POPC (em preto), SM (em verde) e mistura ternária (em vermelho) em solução de acefato em concentração igual a 0,4 mM. As concentrações lipídicas para todas as suspensões são iguais a 20 mM.....103

Figura 39 - comparação entre os valores experimentais (pontos) e ajustes teóricos (linha contínua) para as titulações dos lipídios (A) POPC e (B) SM, ambos a 20 mM, em diuron a 0,4 (preto) e 0,2 mM.....104

Figura 40 - simulações de dinâmica molecular de bicamadas do lipídio POPC na presença de diuron. A – área ocupada pela cabeça do lipídio durante 200 ns de simulação; B – perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica, água e moléculas de pesticidas nas concentrações (número de moléculas) 1 e 5. C – parâmetro de ordenamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídios sn-1 e sn-2.....107

Figura 41 - imagens da dinâmica da inserção do diuron nas bicamadas de POPC em (A) 0, (B) 100 e (C) 200 ns. D – imagem aumentada da simulação em 200 ns. As esferas pretas representam o centro do grupo fosfato da cabeça do POPC; as linhas cinzas representam as cadeias alquílicas; a água é representada pelas linhas azuis, enquanto o diuron está representado em laranja.....108

Figura 42 - simulações de dinâmica molecular de bicamadas do lipídio POPC na presença de acefato. A – área ocupada pela cabeça do lipídio durante 200 ns de simulação; B – perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica, água e moléculas de pesticidas nas concentrações (número de moléculas) 1 e 5. C – parâmetro de ordenamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídios sn-1 e sn-2.....109

Figura 43 - imagens da dinâmica da inserção do acefato nas bicamadas de POPC em (A) 0, (B) 100 e (C) 200 ns. D – imagem aumentada da simulação em 200 ns. As esferas pretas representam o centro do grupo fosfato da cabeça do POPC; as linhas cinzas representam as cadeias alquílicas; a água é representada pelas linhas azuis, enquanto o acefato está representado em roxo.....110

Figura 44 - gráficos de RDF ilustrando as interações entre (A) moléculas de água e diuron, bem como átomos específicos de POPC ao redor do herbicida; e (B) moléculas de água e acefato e átomos específicos de POPC ao redor do inseticida. (C) Representação esquemática do grupo de cabeça de POPC e moléculas de diuron e (D) moléculas de POPC e acefato. As abreviações se referem a cada molécula estudada e seus respectivos átomos: WAT – água; ACP – acefato; DRN – diuron; POPC – lipídio POPC; H – hidrogênio; O – oxigênio; N – nitrogênio; P – fósforo.....111

Figura 45 - viabilidade celular das células Hep-2 expostas aos pesticidas acefato (Ace), diuron (Diu) e à mistura acefato+diuron (Mix), nas concentrações de $3,86 \times 10^{-7}$ M, 4×10^{-4} M e $2,5 \times 10^{-6}$ M, por 1 hora (barras pretas), 24 horas (barras vermelhas), 48 horas (barras azuis) e 96 horas (barras magentas). As linhas horizontais no gráfico correspondem às porcentagens de 50 % e 100 %. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA a um fator, seguida de testes post hoc de Tukey -1, 24 e 48 h - ou Games-Howell - 96 h).....114

Figura 46 - (A) espectros de extinção no UV-vis de AuNPs na presença de L-cisteína nos tempos de 0h (linhas contínuas) e 24 h (linhas tracejadas). (B) Valores da intensidade da banda em 640 nm nos tempos de 0 (linha preta) e 24 horas (linha vermelha). *Inset* em B – coloração das amostras contendo L-cisteína em diversas concentrações.....121

Figura 47 - espectros de FT-IR, módulo ATR, de AuNP (em vermelho); AuNP + L-cisteína (em roxo); citrato (em azul); e L-cisteína (em preto). Os destacados são referentes às vibrações de cada molécula ou sistema.....123

Figura 48 - esquema da ligação entre os grupos funcionais COO^- e NH_3^+ livres dos aminoácidos, responsáveis pela agregação das nanopartículas. Adaptado de²³⁰.....125

Figura 49 - espectros de extinção no UV-vis das AuNPs na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de L-cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C.....126

Figura 50 - A-C: espectros de extinção no UV-vis das AuNPs na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de acefato (1×10^{-6} mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C; D-F: espectros de extinção no UV-vis das AuNPs + L-cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de acefato (1×10^{-6} mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C.....128

Figura 51 - espectros de FT-IR do acefato (preto), da L-cisteína (vermelho) e da mistura acefato + L-cisteína (azul), registrados na faixa de $3800\text{--}650 \text{ cm}^{-1}$129

Figura 52 - (A) diâmetros e (B) imagens de TEM das nanopartículas puras (em preto), na presença de L-cisteína (vermelho) e na presença de L-cisteína e acefato (azul). Barras de escala – 200 nm.....132

Figura 53 - espectros de extinção no UV-vis das AuNPs ligadas à cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) na presença de acefato em diferentes concentrações. As setas indicam a diminuição e o aumento das bandas plasmônicas.....135

Figura 54 - (A) valores da razão $A_{\sim 520}/A_{\sim 640}$ em função da concentração de acefato e (B) aproximação dos valores obtidos no regime linear de $0,01$ à $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L, juntamente com a equação da reta obtida após o *fitting* dos pontos.....137

Lista de Tabelas

Tabela 1: modos vibracionais observados nos espectros PM-IRRAS da monocamada ternária em subfases de água ultrapura, acefato, diuron e coquetel Ace/Diu.....	70
Tabela 2: energias de adsorção dos sistemas (considerando como meio a água).....	81
Tabela 3: contagem total de GUVs após 30 minutos de exposição.....	97
Tabela 4: constante de afinidade (K) e entalpia da interação ΔH do diuron com LUVs de POPC e SM.....	105
Tabela 5: valores de viabilidade celular das células Hep-2 referentes ao ensaio de MTT.....	116
Tabela 6: modos vibracionais dos espectros FT-IR referentes ao acefato, L-cisteína e mistura Ace+Cis.....	130
Tabela 7: valores de diâmetro, PDI e potencial zeta das AuNPs puras, na presença de cisteína e na presença de cisteína+acefato.....	133
Tabela 8: valores de LOD para diferentes sensores colorimétricos na detecção de acefato.....	139

SUMÁRIO

1	Capítulo 1 – Introdução.....	6
1.1	Pesticidas.....	7
1.2	Acefato e diuron.....	8
1.3	Membrana celular.....	11
1.4	Estudos com modelos artificiais de membrana celular.....	15
1.5	Deteção via sensor colorimétrico.....	17
2	Capítulo 2 – Técnicas e abordagens experimentais e computacionais.....	20
2.1	Monocamadas lipídicas.....	21
2.1.1	Filmes de Langmuir.....	21
2.1.2	Espectroscopia PM-IRRAS.....	24
2.1.3	Microscopia por ângulo de Brewster (BAM).....	26
2.2	Bicamadas lipídicas.....	27
2.2.1	Vesículas unilamelares gigantes (GUVs), grandes (LUVs) e pequenas (SUVs).....	27
2.2.2	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	31
2.3	Modelos in vitro – ensaios de viabilidade celular.....	35
2.4	Métodos computacionais.....	37
2.4.1	Projeção IDMAP.....	38
2.4.2	Modelagem molecular.....	40
2.4.3	Dinâmica molecular.....	41
3	Capítulo 3 – Objetivos.....	43
3.1	Objetivos.....	44
4	Capítulo 4 – Materiais e métodos.....	46
4.1	Materiais	47
4.2	Monocamadas de Langmuir.....	47
4.2.1	Isotermas π -A.....	47
4.2.2	Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}).....	48
4.2.3	Espectros PM-IRRAS.....	49
4.2.4	Cálculos teóricos e modelagem molecular.....	49
4.2.5	Microscopia por ângulo de Brewster (BAM).....	51
4.3	Bicamadas lipídicas e sistema <i>in vitro</i>	51

4.3.1	Formação e observação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs).....	51
4.3.2	Formação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) e medidas de ITC.....	53
4.3.3	Dinâmica molecular.....	54
4.3.4	Ensaio de MTT para avaliação de viabilidade celular.....	55
4.3.5	Análise estatística.....	56
4.4	Deteção do acefato via colorimetria.....	57
5	Capítulo 5 – Resultados e discussão das monocamadas de Langmuir.....	59
5.1	Resultados de isothermas π -A e módulo de compressibilidade.....	60
5.2	PM-IRRAS das monocamadas de POPC/Col/SM e suas componentes.....	68
5.3	Cálculos teóricos e modelagem molecular.....	76
5.4	Microscopia por ângulo de Brewster (BAM).....	83
6	Capítulo 6 – Resultados e discussão das bicamadas lipídicas e sistema <i>in vitro</i>.....	86
6.1	Microscopia por contraste de fase de GUVs ternárias (POPC/Col/SM).....	87
6.2	Medidas de ITC das LUVs de POPC, SM e da mistura ternária.....	100
6.3	Dinâmica molecular de bicamadas de POPC.....	106
6.4	Ensaio de MTT para avaliação da toxicidade dos pesticidas.....	113
7	Capítulo 7 – Deteção do pesticida acefato via efeito plasmônico no UV-vis.....	120
7.1	Resultados e discussão – Deteção do pesticida acefato via efeito plasmônico no UV-Vis.....	121
8	Capítulo 8 – Conclusão.....	141
	Referências.....	145
	Apêndice A.....	177

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

1.1 Pesticidas

Os pesticidas são compostos químicos comumente usados em plantações a fim de prevenir danos oriundos de insetos, fungos ou ervas-daninhas, sendo aplicado majoritariamente via *spray* por aplicação manual ou mecânica, através de tratores e aviões¹⁻³. Além disso, o crescimento da população mundial (8,1 bilhões de habitantes, sendo considerado um aumento para 9,7 bilhões até 2050) gera o aumento da produção agrícola, impulsionando o uso dessas substâncias, que em 2020 alcançou 7,2 milhões de toneladas⁴. Uma vez que o Brasil possui clima tropical, sem um período regular de inverno que interromperia o ciclo de vida de pragas, a utilização em larga escala se faz necessária⁵. Porém, o uso e aplicação indiscriminados podem resultar na persistência desses compostos no solo, podendo ser levados a longas distâncias pelo vento, chuva ou por aquíferos subterrâneos^{6,7}.

No Brasil, por exemplo, no ano de 2019, mais de 27 pesticidas foram detectados em água potável em cerca de 25% dos municípios do país⁸. Os pesticidas podem então contaminar o solo, afetando não somente o meio ambiente, mas também a saúde humana, uma vez que muitas dessas substâncias geram efeitos adversos como problemas respiratórios, de pele, neurológicos ou até mesmo são potencialmente cancerígenos⁹. Segundo Faria *et al.* em um trabalho publicado ainda em 2007¹⁰, 70 mil intoxicações seguidas de morte e 7 milhões de doenças agudas ou crônicas ocorriam anualmente. Entretanto, o número de intoxicações anuais atingiu 385 milhões de pessoas no ano de 2022, como mencionado em um trabalho publicado pela Fundação Heinrich Boll Stiftung¹¹, indicando que o aumento do uso dessas substâncias pode estar ligado com o aumento do número de pessoas afetadas.

Dentre os tipos de classificação, pode-se citar as pragas combatidas e o nível de toxicidade. Em relação às pragas alvo, os pesticidas são classificados como fungicidas (combatendo fungos); herbicidas (combatendo ervas-daninhas); e inseticidas (cujo alvo são insetos)¹². Já a toxicidade dos mesmos possui 5 classificações referentes a periculosidade à saúde humana. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)¹³, os agrotóxicos são classificados como “Improvável de Causar Dano Agudo” (5); “Pouco Tóxico” (4); “Moderadamente Tóxico” (3); “Altamente Tóxico” (2); e “Extremamente Tóxico” (1). Nesse contexto, dois pesticidas se destacam pelo uso no Brasil: o inseticida acefato e o herbicida diuron, que serão comentados na seção seguinte.

1.2 Acefato e diuron

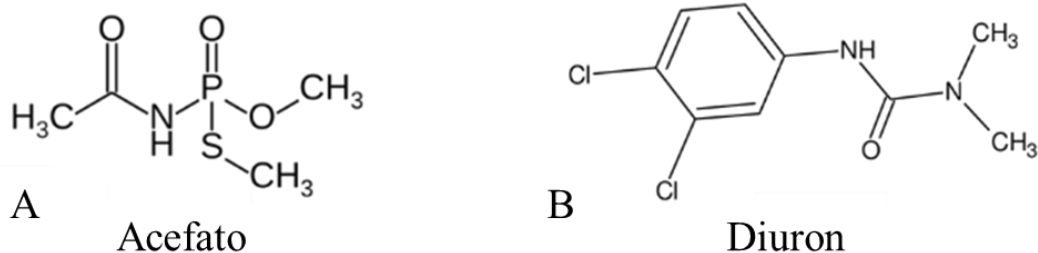
O acefato (O,S-dimetil acetilfosforamidotioato), é um inseticida da família dos organofosforados, que está banido na União Europeia, mas foi o pesticida com maior índice de uso irregular (ou seja, acima do limite máximo permitido) no Brasil entre 2017 e 2018 e em 2022^{14,15}. Em relação à sua toxicidade, a ficha técnica do acefato publicada pela Anvisa sugere que sua classificação é específica para cada produto comercial¹⁶. Entre os produtos comerciais, se destacam o ACEFATO CCAB 750 SP¹⁷ e o Acefato Fersol 750 SP¹⁸, ambos contendo 75 % do pesticida em massa em sua formulação. Apesar de possuírem a mesma proporção do princípio ativo, as classificações toxicológicas dos produtos são diferentes: o primeiro pertence à Categoria 2 – Altamente Tóxico, enquanto o segundo pertence à Categoria 4 – Pouco Tóxico. Essa diferença indica que os produtos contendo o acefato podem apresentar classificações toxicológicas distintas, dificultando a interpretação da toxicidade associada especificamente ao pesticida.

Este inseticida atua nos insetos por meio da ligação covalente entre o átomo de fósforo do acefato e o átomo de oxigênio do aminoácido serina da enzima

acetilcolinesterase, ou por interações eletrostáticas entre o pesticida e a enzima. Essa interação impede a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, causando sintomas como vômito, náusea, tontura e depressão¹⁹⁻²¹. Com relação a outros potenciais efeitos do pesticida, Mufti *et al.*²² demonstraram em um estudo *in vivo* que o acefato pode causar lesões celulares em ratos, incluindo inflamações no lúmen tubular e nos ductos coletores, o aumento do estresse oxidativo, a autofagia, a apoptose e alterações histopatológicas na região dos rins nesses animais.

O diuron também é amplamente utilizado no Brasil, já que sua principal aplicação se dá em plantações de cana-de-açúcar, uma das monoculturas economicamente mais importantes para o país²³. Além disso, entre 2018 e 2019, resíduos de diuron foram encontrados em couve, cultura na qual este pesticida não é permitido¹⁵. Assim como o acefato, a classificação toxicológica do diuron também depende de seu princípio ativo²⁴: os produtos Diuron Nortox 500 SC²⁵ e Diuron 500 SC Rainbow²⁶ (ambos possuindo 50 % do pesticida em m/V na sua composição) se nas Categorias 4 e 5, respectivamente. Este herbicida age inibindo a fotossíntese e bloqueando a produção de energia (ATP), levando à morte da planta^{27,28}. Estudos *in vitro* sobre efeitos do diuron²⁸ revelam que, na concentração de 200 μ M, este pesticida causa necrose na mucosa da bexiga de ratos e reduz a viabilidade de células que representam o ambiente placentário, crucial para a reprodução. Em humanos, o diuron é potencialmente carcinogênico, principalmente na região da bexiga²⁹. As estruturas moleculares dos pesticidas acefato e diuron estão dispostas na Figura 1.

Figura 1 - estruturas moleculares dos pesticidas (A) acefato e (B) diuron.



Com relação à afinidade dos pesticidas pela membrana celular, Singh *et al.*³⁰ e Spassova *et al.*³¹ sugerem que o acefato é hidrofílico, ou seja, possui maior afinidade pela água do que com membranas lipídicas, indicada pelo baixo valor do coeficiente de partição n-octanol/água ($\log P = -1,5$). Nesse sentido, essa constante mostra a preferência de moléculas de permanecerem em fase aquosa (hidrofílico – baixos valores) ou orgânica (hidrofóbico/lipofílico – altos valores)³². Em contraste, Librando *et al.*³³ mostraram que o diuron ($\log P = 2,68$) apresenta menor afinidade com a água e maior afinidade por lipídios. Tais dados sugerem que, dentre os pesticidas aqui estudados, o diuron possui maior afinidade pela membrana celular.

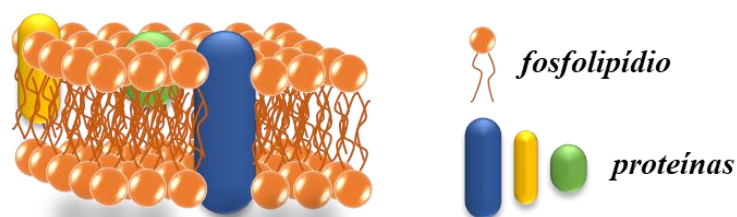
Além disso, o efeito da combinação desses dois poluentes também se mostra importante, uma vez que na natureza há a presença de mais de um composto em conjunto. Essa combinação resulta no chamado "efeito coquetel" e pode ser categorizado em três termos farmacológicos: aditivo, antagonico e sinérgico^{34–36}. O efeito aditivo envolve a combinação dos efeitos dos compostos, resultando em uma resposta semelhante à soma das moléculas individuais, o que é esperado. Por outro lado, os efeitos antagonicos e sinérgicos divergem, apresentando respostas reduzidas ou ampliadas, respectivamente. Como exemplo de efeitos gerados por misturas de pesticidas, Dourdin *et al.*³⁷ revelam que o diuron, em conjunto com outros 17 pesticidas, afeta a expressão genética de ostras

do Pacífico, bem como seu comportamento de mobilidade e taxa de sobrevivência. Diepen *et al.*³⁸ revelam efeitos em plantas marinhas pela mistura de atrazina, diuron, irgarol e S-metolacoloro, que tiveram como principal efeito a inibição da transformação de energia luminosa em energia química produzida durante a fotossíntese. Efeito de outros pesticidas também são encontrados na literatura, como descrito por Zee *et al.*³⁹ por exemplo, que revelam que a mistura de clotianidina e imidacloprida, dois neonicotinoides que agem em receptores de acetilcolina, resulta em um efeito sinérgico em embriões de peixes-zebra, causando danos celulares e defeitos no desenvolvimento.

1.3 Membrana celular

A membrana celular possui como característica ser uma barreira seletivamente permeável constituída por moléculas dispostas em bicamadas, permitindo ou não a passagem de agentes do meio externo para o meio interno, e vice-versa, servindo como barreira natural⁴⁰. Singer e Nicolson⁴¹ publicaram pela primeira vez em 1972 o modelo do mosaico fluido (Figura 2), no qual descrevem a dinâmica e organização da membrana plasmática e também sua composição, que é baseada principalmente em lipídios, que constituem a matriz da estrutura, colesterol e proteínas.

Figura 2 - esquema ilustrativo do mosaico fluido das membranas celulares proposto em 1972. Adaptado de⁴².



Apesar de funcional, este modelo passou por modificações ao longo do tempo, nas quais novas características da membrana foram adicionadas. Anos mais tarde, em 2023, Nicolson e Mattos⁴² propõem 13 princípios ligados aos aspectos da membrana celular, que são listados a seguir:

1. As membranas celulares são mantidas por forças não covalentes, principalmente por interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, e em menor grau por outras interações, como iônicas;
2. A matriz básica e continuidade das membranas são regidas por bicamadas lipídicas, juntamente com proteínas interligadas à essa estrutura;
3. As componentes da membrana maximizam as interações moleculares para alcançar o estado de menor energia livre;
4. As membranas são organizadas em vários domínios com diferentes composições, mobilidade e funções;
5. As interações entre lipídios e proteínas de membrana (regidas por interações hidrofóbicas) podem originar diversos domínios dinâmicos de membrana com composições distintas, mobilidades dos componentes e interações lipídio-proteína.
6. As mobilidades laterais de algumas proteínas da membrana celular podem ser controladas por elementos do citoesqueleto, matriz extracelular ou estroma;
7. As membranas celulares são assimétricas na distribuição de proteínas, glicoproteínas, proteínas periféricas e fosfolipídios entre as monocamadas interna e externa da estrutura;
8. A organização mais compacta e complexa do que a inicialmente proposta em 1972 limita os movimentos laterais de proteínas, glicoproteínas e de alguns domínios;

9. As membranas possuem domínios específicos de lipídios e lipídios-proteínas;

10. As membranas celulares possuem domínios especializados importantes em várias propriedades celulares, como sinalização celular, comunicação, endocitose, exocitose, entre outras;

11. As suas componentes exibem diferentes mobilidades laterais e distribuições que são funcionalmente importantes e relacionadas a interações móveis com várias estruturas, domínios e barreiras da membrana;

12. As membranas celulares possuem uma organização estrutural em vários níveis. No nível mais básico, encontram-se a bicamada lipídica e proteínas anfipáticas intercaladas. Nos domínios específicos, há combinações particulares de lipídios e proteínas periféricas. Já no nível dos domínios mais complexos, além desses componentes, estão presentes diversos complexos moleculares e associações com elementos do citoesqueleto e/ou componentes da matriz extracelular

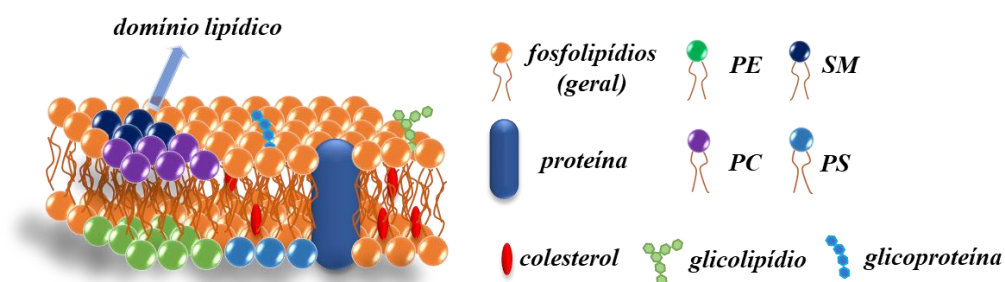
13. As membranas celulares são caracterizadas por mudanças dinâmicas na mobilidade, área e estrutura dos domínios, assim como na montagem e desmontagem de vários domínios, permitindo que elas reajam de forma eficiente a sinais externos e transmitam os sinais recebidos para alvos internos.

Esses princípios apontam principalmente para a existência de domínios mais densos e estruturados da membrana, fazendo com que o modelo de mosaico fluido, originalmente tratando a membrana com uma maior extensão de lipídios fluidos, apresentasse mais domínios rígidos. Um grupo desses domínios são os chamados *lipid rafts* (jangadas lipídicas), idealizado pela primeira vez em 1988 por Simons e Van Meer⁴³. Essas porções da membrana plasmática são formadas majoritariamente pela mistura de colesterol e esfingomielina, localizadas na parte externa da bicamada da membrana,

sendo um domínio mais rígido rodeada por uma matriz mais fluida⁴⁴. Como funções, os *lipid rafts* são responsáveis por influenciar a fisiologia, além do transporte e sinalização celular⁴⁵.

Outro aspecto importante da membrana celular é a assimetria, considerando as camadas externa e interna da bicamada que a compõe, conceito introduzido no modelo mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson⁴¹. Lorent *et al.*⁴⁶ e Ingólfsson *et al.*⁴⁷ mostram que a camada externa é mais rica em esfingolipídios, como a esfingomieline (SM), e fosfatidilcolinas (PC), enquanto a camada interna é dominada por fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS). Outra característica dessa assimetria leva em conta o número de dupla ligações presentes na estrutura, no qual a camada interna possui o dobro de número dessas insaturações em comparação com a camada externa. Portanto, nota-se que a membrana celular possui diversas complexidades que podem dificultar a investigação de interações entre essas estruturas e moléculas de interesse, como os pesticidas aqui propostos, demandando alternativas de estudo. Esses aspectos mais recentes estão dispostos na ilustração presente na Figura 3, que contempla a membrana celular com a disposição das moléculas propostas nos estudos discutidos.

Figura 3 - ilustração da membrana celular considerando as características descritas mais recentes.

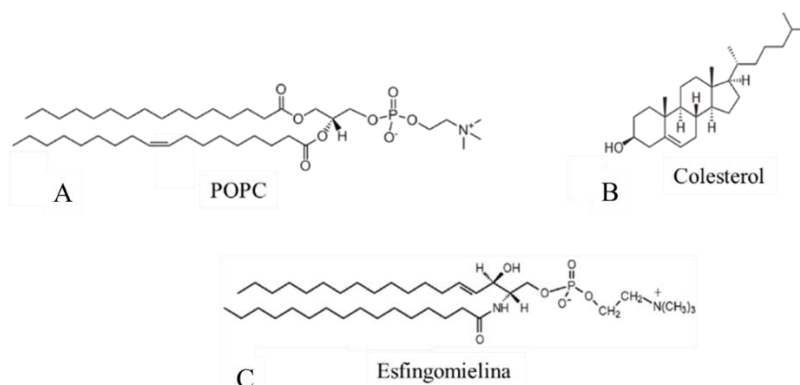


1.4 Estudos com modelos de membrana celular

Uma abordagem eficaz para elucidar os efeitos prejudiciais dos pesticidas é examinar sua interação com sistemas miméticos de membranas biológicas, com ênfase especial na membrana plasmática. Essa estrutura desempenha papel fundamental na manutenção da integridade celular e no transporte seletivo de moléculas^{40,48,49}. Portanto, alterações em sua organização molecular ou em suas propriedades mecânicas podem comprometer diretamente o funcionamento da célula. Sua composição se dá majoritariamente por proteínas e lipídios, e dentre os lipídios mais abundantes encontram-se os fosfolipídios, os esteróis e os esfingolipídios na proporção aproximada de 70/20/10 mol%, respectivamente^{50,51}. Exemplos dessas moléculas são o fosfolipídio POPC, o esfingolipídio esfingomielina (SM) e o esterol colesterol (Col), apresentados na Figura 4, e utilizados nesse trabalho. Esses lipídios possuem características distintas e possuem papéis específicos nas membranas celulares. O POPC, devido à presença de insaturação em suas cadeias de hidrocarboneto, favorece a formação de fases mais fluidas na temperatura fisiológica⁵², enquanto a SM e o colesterol contribuem para a formação de domínios mais organizados e rígidos, associados aos *lipid rafts*⁵³. Tais moléculas podem ser utilizadas em modelos simples (utilizando apenas um tipo de molécula) ou complexos (utilizando mais de um tipo de molécula) da membrana celular. Nesse contexto, a mistura de POPC, SM e Col na proporção de 70/20/10 mol%, respectivamente, é capaz de reproduzir com maior proximidade as características das membranas naturais. Essas moléculas podem ser estruturadas em forma de monocamadas e bicamadas lipídicas. Uma forma de organizar as monocamadas é utilizando a técnica de filmes de Langmuir, que permite o controle do empacotamento molecular na interface ar-água e fornecem informações como elasticidade e organização lateral^{54,55}. Já as bicamadas podem ser

estruturadas como vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que representam modelos mais próximos de membranas celulares reais, possibilitando a investigação por meio da observação direta via microscopia óptica de propriedades relacionadas à morfologia e estabilidade⁵⁶. Ambas serão discutidas mais detalhadamente nas seções seguintes. Assim, a combinação de monocamadas e bicamadas permite correlacionar alterações moleculares interfaciais com mudanças estruturais, podendo inferir possíveis efeitos em células reais.

Figura 4 - estruturas moleculares de (A) POPC; (B) colesterol; e (C) esfingomielina.



Com relação a exemplos de estudos de interações entre pesticidas e sistemas miméticos da membrana celular, Broniatowski *et al.*⁵⁷ mostram que pesticidas ciclodienos policlorados afetam monocamadas e bicamadas lipídicas que mimetizam células de fungos. Nesse sentido, os pesticidas não afetam significativamente estruturas rígidas em monocamadas lipídicas, mas fluidificam as bicamadas. Połec *et al.*⁵⁸ revelam que os terpenos mirceno e homuleno afetam monocamadas de composição bacteriana diminuindo a condensação e ordenamento molecular do filme, além de alterar a

morfologia do mesmo. Correlacionando estudos de bicamada e monocamada lipídica, Lemma *et al.*^{59,60} mostram que o pesticida picloram altera as propriedades mecânicas da monocamada de DOPC/SM/Col (1/1/1) e a permeabilidade de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) da mesma mistura foi alterada por picloram e glifosato, com maior efeito deste último. Rubira *et al.*⁶¹ investigaram os efeitos do imazapique e metil paration em monocamadas e bicamadas de DOPC, consistentes com as alterações morfológicas induzidas pelos pesticidas nas brânquias de tilápias, mostrando que estudos em sistemas miméticos podem ser adequados para prever efeitos em sistemas *in vivo*.

1.5 Detecção via sensor colorimétrico

Durante o período do Doutorado, foi realizado um estágio de pesquisa no exterior, desenvolvido na Università del Salento (UniSalento), em Lecce, Itália, no laboratório do Prof. Ludovico Valli, sob supervisão da Profa. Simona Bettini. Nesse período foi investigado um sistema de sensor colorimétrico baseado em nanopartículas de ouro (AuNPs) com o aminoácido L-cisteína como agente agregador para a detecção do pesticida acefato em meio aquoso.

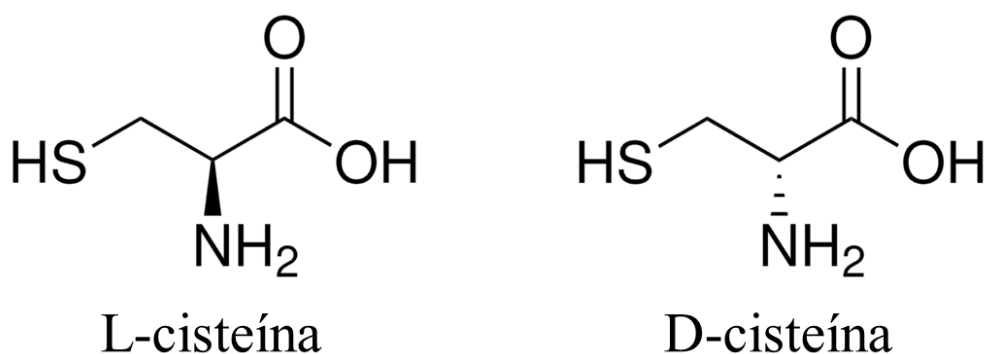
Sensores colorimétricos se destacam como ferramentas de detecção devido à simplicidade operacional em relação aos métodos convencionais, baixo custo, e possibilidade de detecção visual direta, características importantes para o monitoramento de contaminantes emergentes, como pesticidas⁶²⁻⁶⁴. O funcionamento desses sensores está relacionado a mudanças na banda de absorção do sistema (geralmente incluindo nanopartículas metálicas) em função da concentração do analito desejado. Nesse contexto, encontram-se trabalhos na literatura que utilizam AuNPs na detecção de pesticidas por meio de colorimetria: Zhu *et al.*⁶⁵, por exemplo, desenvolveram um sensor

colorimétrico à base de AuNPs modificadas com DNA na detecção visual de acetamiprida, carbendazim, pimetrozina e tiabendazol. Liu *et al.*⁶⁴ propõem um sensor baseado na agregação das AuNPs pela presença do pesticida clorpirifós imobilizado por aptâmeros. Zhao *et al.*⁶⁶, por sua vez, utilizam AuNPs modificadas com ácido ascórbico ou borohidreto de sódio na detecção de glifosato, imidacloprido e metil tribenuron com auxílio de aplicativos de *smartphones*. Nesse sentido, as AuNPs se destacam para o uso de sensores colorimétricos por possuírem bandas de extinção bem definidas, que se deslocam em função da agregação das mesmas, juntamente com a mudança da cor da dispersão. Além disso, esses trabalhos mostram a eficiência de tais sensores, bem como a possibilidade de se utilizar diferentes estratégias de modificação.

Nesse contexto, o uso da cisteína como agente agregador se mostra útil no mecanismo de detecção via colorimetria. Esse aminoácido, que desempenha papel importante no organismo em síntese de proteínas, desintoxicação e metabolismo⁶⁷, apresenta o grupo tiol (R-SH), que possui alta afinidade por superfícies de ouro, permitindo a sua ligação com as AuNPs⁶⁸. Além disso, a cisteína possui os grupos amônia (NH_3^+) e carboxila (COO^-) que ficam livres após a ligação com o ouro, permitindo assim a possibilidade de se ligarem com outras moléculas livres⁶⁹. Outra característica da cisteína é a sua quiralidade. Moléculas quirais possuem assimetria inerente, não permitindo o alinhamento perfeito com sua imagem espelhada. Assim, tais moléculas se apresentam em pares, chamados de enantiômeros, com iguais estruturas químicas e níveis de energia semelhantes, mas que possuem arranjos espaciais de átomos diferentes e podem apresentar propriedades distintas⁷⁰. Além disso, a natureza quiral das moléculas possibilita interações seletivas, de modo que apenas uma determinada configuração enantiomérica é capaz de interagir de forma favorável com um ambiente ou com outra

espécie molecular quiral⁷¹. No caso da cisteína, seus enantiômeros são a L-cisteína e a D-cisteína, dispostas na Figura 5.

Figura 5 - estrutura molecular da L-cisteína e da D-cisteína.



Portanto, o sistema aqui desenvolvido se baseia no estado de agregação das AuNPs na presença da L-cisteína e na interação entre o acefato e os grupos funcionais do aminoácido ligado às nanopartículas, resultando em mudanças na agregação do sistema, e, por consequência, na resposta de absorbâncias associadas às bandas plasmônicas. Tal abordagem permite a construção de uma curva analítica e a determinação de parâmetros importantes do sensor, como faixa linear e limite de detecção.

Capítulo 2
Técnicas e abordagens experimentais e
computacionais

2.1 Monocamadas lipídicas

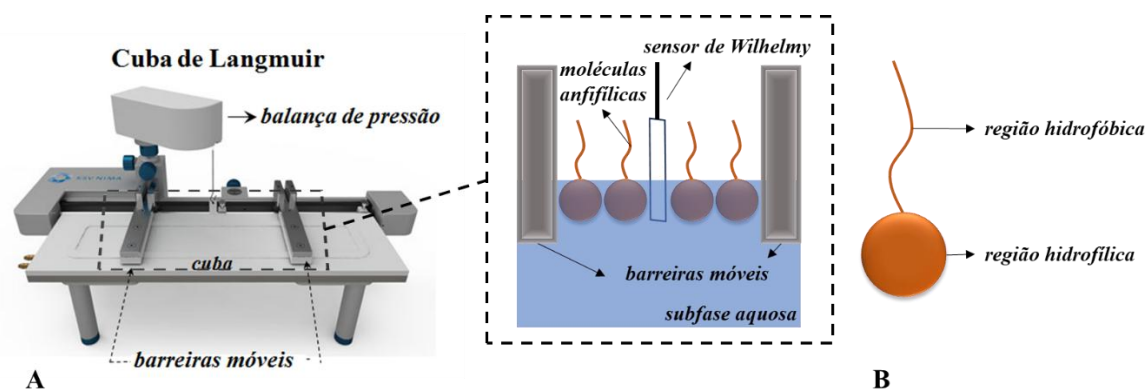
2.1.1 Filmes de Langmuir

As monocamadas de Langmuir (ou filmes de Langmuir), introduzidas por Agnes Pockels⁷² e, posteriormente, publicadas por Irving Langmuir em 1916 e 1917^{73,74}, consistem no espalhamento de um volume pré-definido de uma solução de solvente volátil contendo moléculas anfifílicas e insolúveis em água em uma superfície aquosa disposta em uma cuba de material inerte, como o teflon por exemplo. Após a evaporação do solvente, as moléculas anfifílicas permanecem na interface ar/água, uma vez que a porção hidrofílica a permite flotar, enquanto a porção hidrofóbica a dispersa na interface. As moléculas são comprimidas de forma simétrica por duas barreiras, ou assimétrica por uma barreira, enquanto um sensor, como por exemplo o sensor de Wilhelmy, acoplado a uma balança monitora a pressão de superfície (representada por “ π ”) durante a compressão. O *software* do equipamento é responsável por calcular π pela diferença entre a tensão superficial da subfase (água ultrapura - $\gamma_0 \sim 72\text{mN/m}$ a 20 °C) e a tensão superficial da subfase na presença das moléculas espalhadas (γ) (Equação 1). A Figura 6-A mostra uma cuba de Langmuir e uma ilustração da interface com as moléculas espalhadas sendo comprimidas pelas barreiras, enquanto o sensor acusa a mudança de tensão superficial. A Figura 6-B mostra um exemplo simplificado de uma molécula anfifílica, com a região hidrofílica (“cabeça”) voltada para baixo e a região hidrofóbica (“cauda”) voltada para cima.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Equação 1

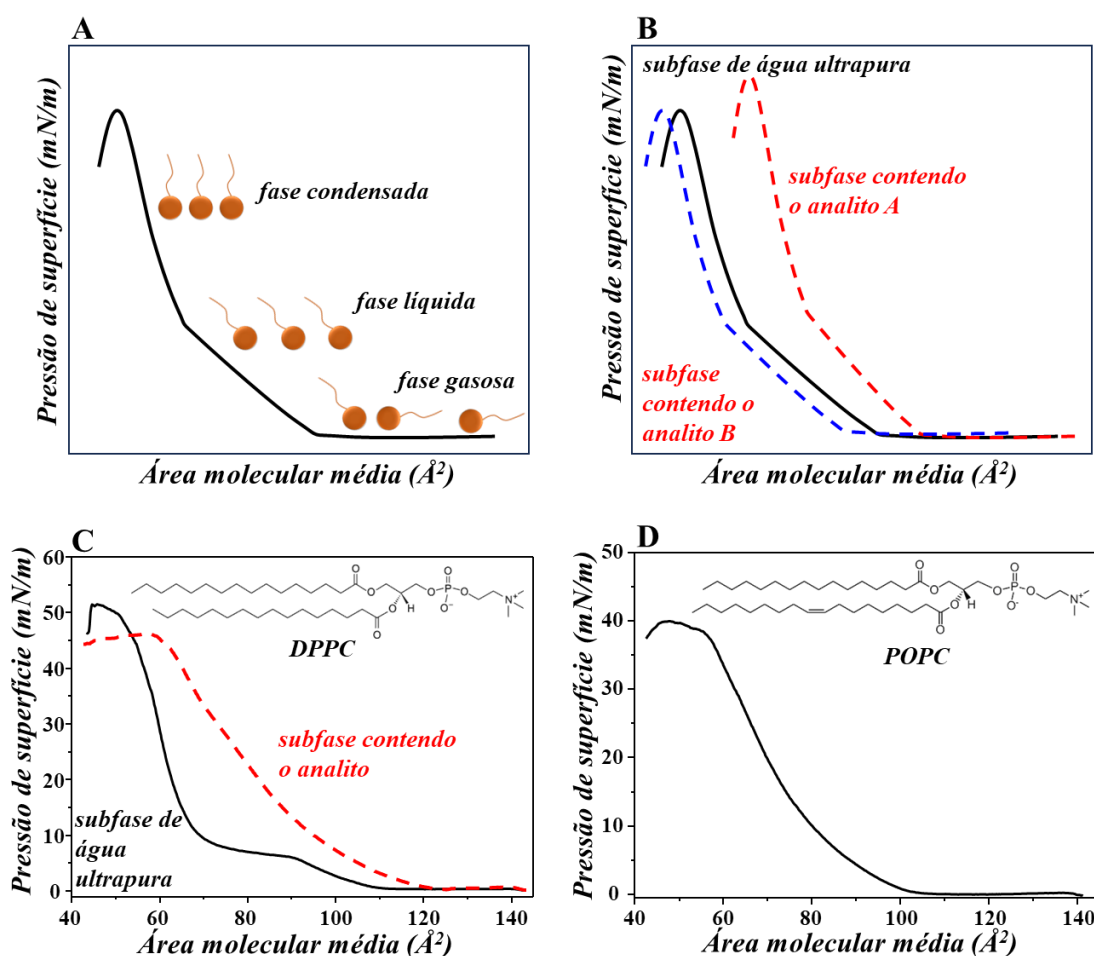
Figura 6 - (A) representação de uma cuba de Langmuir com representação da compressão das barreiras; (B) representação de uma molécula anfifílica.



Com o valor de “ π ” calculado pelo *software* durante a compressão e sabendo da área média ocupada por molécula (representada por “A”), é possível construir um gráfico relacionando esses dois valores, chamado de isoterma π -A. Este gráfico explicita três fases distintas da monocamada relacionadas à distância entre as moléculas presentes na interface ar/água. Quando as moléculas estão distantes umas das outras, não alterando o valor da pressão de superfície, temos a fase gasosa. Com a aproximação das moléculas e o aumento da pressão de superfície, há a fase líquida, enquanto as moléculas totalmente empacotadas e orientadas representam a fase condensada⁷⁵ (Figura 7-A). Nesse contexto, é possível inferir mudanças na monocamada geradas pela adição de um analito na subfase pelo deslocamento da isoterma π -A (Figura 7-B), ou até mesmo a mudança de seu perfil (Figura 7-C). Em relação ao deslocamento das isotermas π -A para maiores áreas (analito A em 7-B), uma possível causa pode ser a presença do analito embebido em meio à monocamada. Já no caso do deslocamento da isoterma π -A para menores áreas (analito B em 7-B), a diminuição da repulsão eletrostática entre as cabeças polares das moléculas que formam o filme de Langmuir, ou até mesmo a saída de parte destas moléculas da interface ar/água para a subfase, podem estar na origem deste deslocamento. Em relação ao perfil das isotermas π -A, um exemplo são as curvas de DPPC da Figura 7-C. Enquanto

a curva preta representa uma monocamada do lipídio em água ultrapura, com um platô bem definido (referente à coexistência de fases da monocamada), a curva vermelha representa o filme lipídico na presença do analito, na qual o platô já não é mais visível. Além disso, tais perfis mudam de lipídio para lipídio, como se observa para os exemplos da Figura 7-C (DPPC em água ultrapura) e da Figura 7-D (POPC em água ultrapura). Enquanto o DPPC, que possui cadeias saturadas, (Figura 7-C) apresenta o platô, o POPC, que possui uma insaturação em suas cadeias de hidrocarbonetos (Figura 7-D), exibe um aumento suavizado de pressão em relação à área molecular média

Figura 7 - (A) representação de uma isoterma π -A com suas respectivas fases (B) representação da diferença em termos de deslocamento entre uma isoterma π -A na ausência (linha preta) e na presença (linhas tracejadas vermelha e azul) de analitos de interesse; (C) representação de uma isoterma π -A de DPPC; e (D) representação de uma isoterma π -A de POPC.



Com os valores obtidos na construção do gráfico de isothermas π -A é possível calcular o módulo de compressibilidade (C_s^{-1}), que indica a rigidez (ou empacotamento) da monocamada formada^{76,77}. Para isso, deriva-se os valores de pressão de superfície (π) pelos valores de área molecular média (A), multiplicando este valor com os valores negativos de área, à temperatura constante. O cálculo é representado na Equação 2.

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad \text{Equação 2}$$

Conforme descrito por Davies e Rideal⁷⁶ e Gew e Misran⁷⁷, diferentes faixas de valores de C_s^{-1} correspondem a diferentes fases de monocamadas, indo da menos empacotada à mais empacotada: líquido-expandido (LE), líquido (L), líquido-condensado (LC), e sólido (S). Segundo Davies e Rideal, a fase LE ocorre na faixa de 12,5 a 50 mN/m, a fase LC entre 100 e 250 mN/m, e sólida entre 1000 e 2000 mN/m. Já para Gew e Misran, a fase LE se encontra entre 10 e 50 mN/m, a fase L de 50 a 100 mN/m, a LC entre 100 e 250 mN/m, e a fase S acima de 250 mN/m.

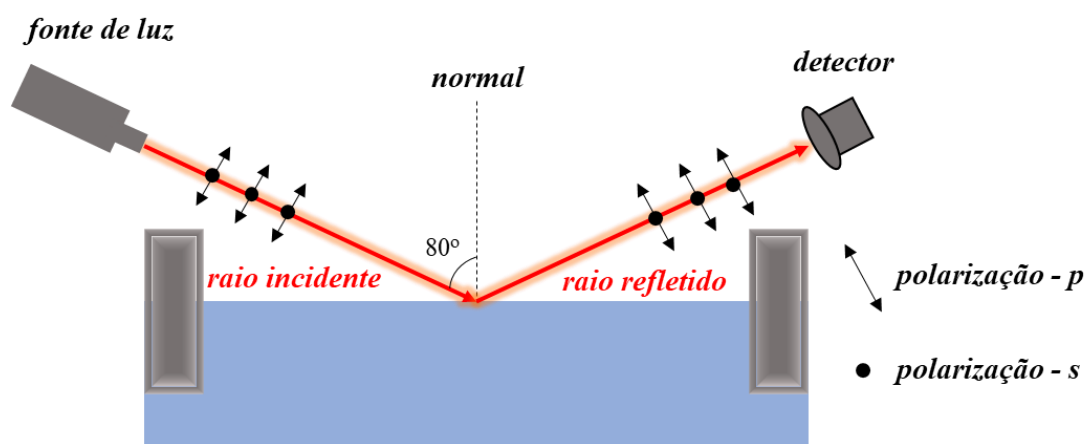
2.1.2 Espectroscopia PM-IRRAS

A espectroscopia PM-IRRAS é uma técnica adequada para o estudo de monocamadas na interface ar/água, pois é sensível à conformação e orientação das cadeias hidrofóbicas, enquanto é insensível ao vapor de água, que poderia interferir negativamente na aquisição dos espectros⁷⁸, além de permitir inferir diferenças entre modos vibracionais entre o filme na ausência e presença do analito alvo. Para isso, um feixe de luz no intervalo de comprimento de onda do infravermelho é incidido na interface ar/água (comumente formando 80° com a normal à subfase), sendo medida a sua diferença

em relação ao feixe refletido. Este feixe é polarizado nos planos “p” (paralelo ao plano de incidência) e “s” (perpendicular ao plano de incidência), que são sobrepostos pela modulação em alta frequência (Figura 8)⁷⁹. O equipamento então calcula a divisão da diferença entre a subtração da refletância da polarização “p” (R_p) pela refletância da polarização “s” (R_s) pela soma dessas refletâncias (Equação 3).

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad \text{Equação 3}$$

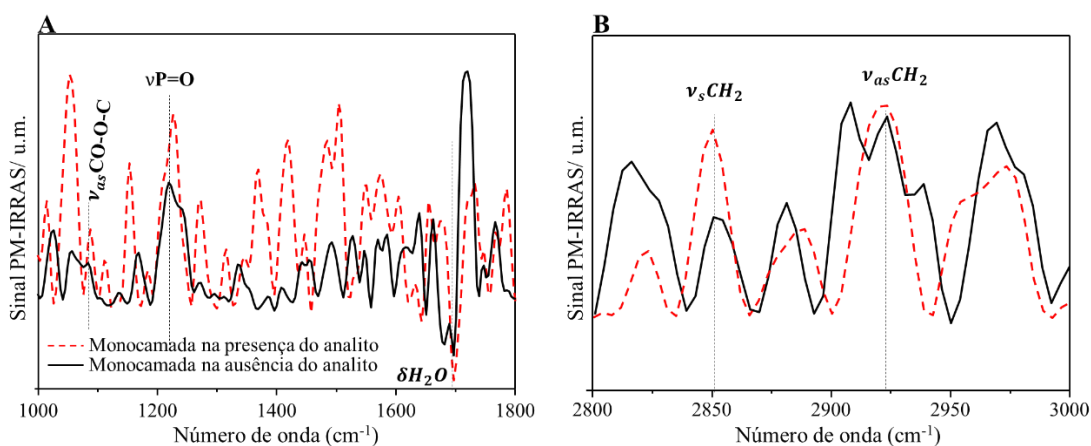
Figura 8 - esquema da incidência do raio polarizado na subfase. Adaptado de⁸⁰.



Para monocamadas lipídicas, o espectro é comumente dividido em duas partes, cada uma representando regiões específicas das moléculas: de 900 a 1800 cm^{-1} , referente à cabeça polar (porção hidrofílica); e de 2800 a 3000 cm^{-1} , referente à cauda apolar (porção hidrofóbica) (Figura 9)^{81,82}. Esta última região também permite analisar o ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos através da intensidade relativa (IR) entre as bandas referentes aos estiramentos simétrico e antissimétrico da ligação CH_2 . Assim, é

possível determinar se há o aumento ou diminuição do ordenamento dessas cadeias pela variação da IR entre o espectro referente ao filme na ausência e na presença do analito: o aumento do valor de IR indica a diminuição do ordenamento das cadeias, enquanto a diminuição de IR se refere ao aumento desse ordenamento^{83,84}.

Figura 9 - exemplo de espectros PM-IRRAS nas regiões (A) da cabeça; e (B) da cadeia de hidrocarbonetos.

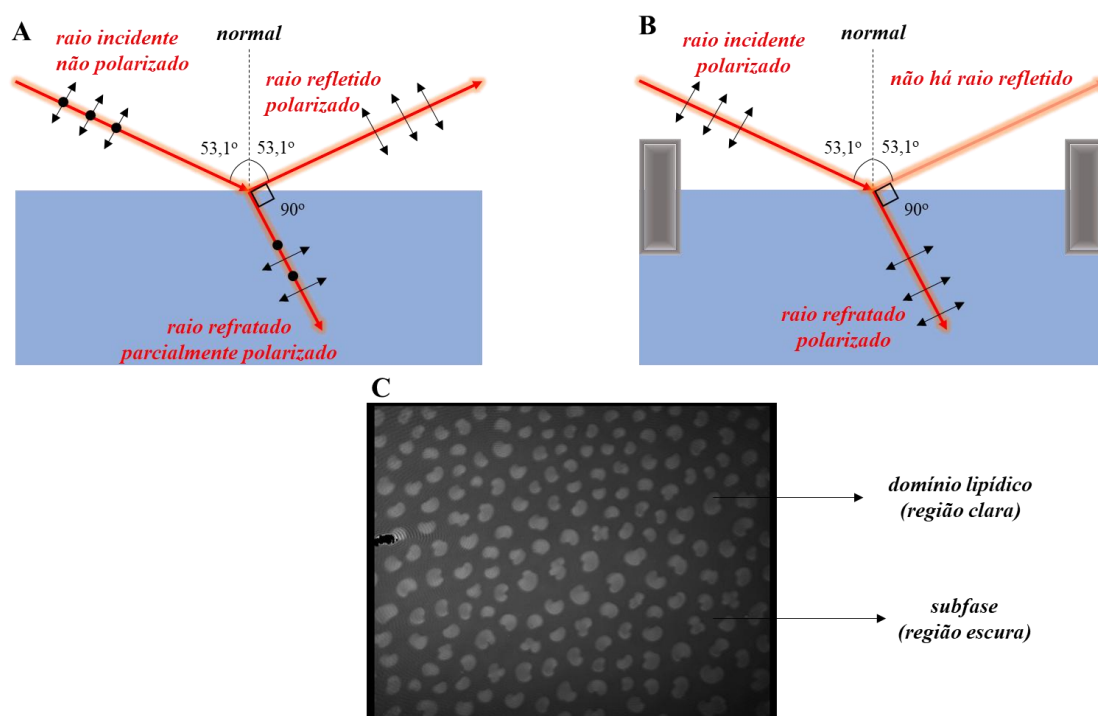


2.1.3 Microscopia por ângulo de Brewster (BAM)

O BAM é outra técnica acoplada à cuba de Langmuir que, diferentemente do PM-IRRAS, nos permite estudar a morfologia da monocamada. Este experimento utiliza o ângulo de Brewster, que ocorre quando um raio de luz não polarizado incide na superfície com ângulo igual à 53,1°, e o raio refletido é polarizado e perpendicular ao raio refratado, como mostra a Figura 10-A. Na técnica de microscopia, o raio de luz incidente já é polarizado, fazendo com que não haja reflexão quando incidido na subfase (Figura 10-B). No entanto, quando o raio é incidido sobre o domínio de moléculas espalhadas na interface ar/água, há reflexão, causando um contraste na imagem, na qual a subfase se

torna escura e os domínios lipídicos se tornam claros⁸⁵, como esquematizado na Figura 10-C.

Figura 10: representação do (A) ângulo de Brewster; (B) da microscopia por ângulo de Brewster; e (C) exemplo de imagem gerada através da técnica.



2.2 Bicamadas lipídicas

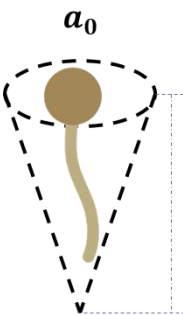
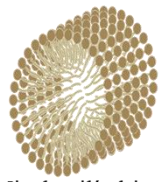
2.2.1 Vesículas unilamelares gigantes (GUVs), grandes (LUVs) e pequenas (SUVs)

Outra alternativa para se mimetizar a membrana celular é o uso de bicamadas lipídicas na forma de vesículas unilamelares gigantes, ou GUVs⁸⁶, vesículas unilamelares grandes, ou LUVs⁸⁷, e vesículas unilamelares pequenas, ou SUVs⁸⁸. Essas estruturas, diferentemente das monocamadas, apresentam formato esférico e, no caso das GUVs, diâmetro mais aproximado com as células naturais⁸⁹. Nesse sentido, quando um filme

lipídico é hidratado com uma solução aquosa, a porção hidrofóbica (cauda) da molécula é repelida pelo solvente, enquanto a porção hidrofílica (cabeça) é exposta ao meio aquoso. Nessas circunstâncias, as cabeças possuem interações eletrostáticas de repulsão entre si, enquanto a cauda rege o tipo de estrutura formada na hidratação dependendo de sua área ocupada, podendo formar a bicamada lipídica⁹⁰. O tipo de estrutura formada pelo lipídio depende do valor de parâmetro crítico de empacotamento (*critical packing parameter* – CPP), o qual é calculado pela Equação 4, onde a_0 é a área ocupada pela cauda, l_c é o comprimento e V o volume ocupado por essa região. A Figura 11 exemplifica os tipos de estrutura dependendo do valor do CPP para o lipídio.

$$CPP = \frac{V}{a_0 \cdot l_c} \quad \text{Equação 4}$$

Figura 11 - diferentes estruturas de bicamadas e seus respectivos CPPs. Adaptado de ⁹¹.

Valor de CPP e respectivas estruturas	
	$CPP < 1/3$ (cone)  Micela esférica $1/3 < CPP < 1/2$ (cone truncado)  Micela cilíndrica
$1/2 < CPP < 1$ (cone truncado)  Bicamada flexível $CPP \sim 1$ (cilindro)  Bicamada planar	
$CPP > 1$ (cone truncado invertido)  Micela invertida	

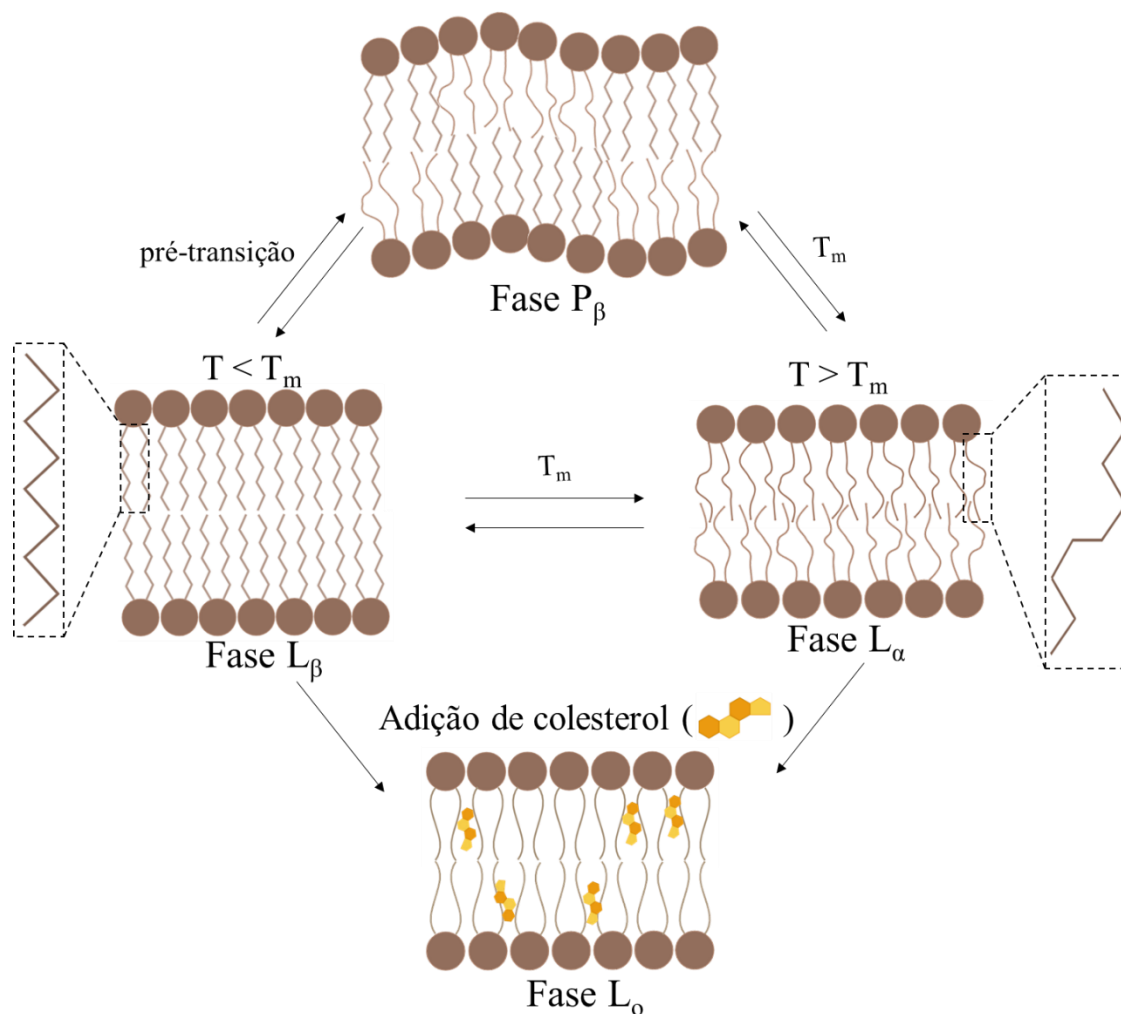
Dos tipos de estruturas apresentados na Figura 11, a bicamada flexível é responsável por estruturar as vesículas que mimetizam a membrana celular. Essas vesículas são divididas segundo o número de bicamadas e seu tamanho (valor do diâmetro)^{87,88}. As vesículas que possuem mais de uma bicamada (ou lamela) concêntricas são chamadas de multilamelares, ou MLV (*multilamellar vesicles*), enquanto as que possuem mais de uma lamela não concêntricas são chamadas de multivesicular, ou MVV (*multivesicular vesicle*). Esses tipos de bicamadas são formados espontaneamente ao hidratar um filme lipídico. Já as bicamadas formadas por uma única lamela são chamadas de unilamelares e possuem subtipos dependendo de seu tamanho: as SUVs possuem diâmetros menores que 100 nm e são formadas ao reduzir as MLVs por sonicação⁸⁸; as LUVs (vesículas unilamelares grandes) possuem diâmetros que variam de 100 nm até 1 µm e são formadas ao extrusar as MLVs^{92,93}. Por fim, as GUVs possuem tamanhos maiores que 1 µm e são formadas por métodos como eletroformação⁹⁴ e formação em gel⁹⁵.

Um aspecto importante das bicamadas lipídicas quando estudadas é a fase das mesmas, que depende da temperatura do ambiente e de sua composição, ou seja, dos lipídios utilizados em sua formação. As vesículas formadas por apenas um tipo de lipídio podem se encontrar em duas fases distintas: a fluida, chamada de líquido-desordenada (L_α), que ocorre acima da temperatura de transição de fase (T_m) da molécula, e a rígida, chamada de fase-gel (ou sólido-ordenada; L_β)⁹⁶, que ocorre abaixo da T_m . A fase L_α possui as cadeias de hidrocarbonetos na conformação *trans* e *gauche*, com maior grau de liberdade entre si, tendo uma maior difusão dos lipídios na bicamada. Já a L_β possui um menor grau de liberdade para difusão, sendo mais empacotada que a fase L_α , e apresentando as cadeias de hidrocarbonetos na conformação *all trans*. Além disso, na fase-gel, as cadeias podem estar inclinadas (L_β') ou não inclinadas (L_β) em relação à

normal da membrana dependendo do nível de hidratação das mesmas. Nesse sentido, o ângulo da inclinação se torna maior quanto maior o nível de hidratação⁹⁶. Para alguns lipídios, como as fosfatidilcolinas (PC), temperaturas ligeiramente inferiores à T_m favorecem uma maior interação dos grupos polares (“cabeças”) com o solvente. Nessa temperatura (pré-transição de fase), as cadeias de hidrocarboneto se encontram parcialmente desordenadas e ondulações se formam na superfície da bicamada, caracterizando assim a fase *ripple* (P_β)⁹⁶.

Uma outra fase surge quando há a adição de colesterol na composição da bicamada, que reduz o ordenamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídios que apresentam a fase-gel e favorece a conformação *trans* para lipídios que apresentem a fase L_α . Esta fase, chamada de líquido-ordenada (L_o), apresenta as duas características vistas nas fases encontradas para lipídios: possui capacidade de difusão lateral das moléculas lipídicas (L_α) ao mesmo tempo que é ordenada (L_β)^{97,98}. Além disso, algumas misturas lipídicas contendo colesterol e lipídios de alta e baixa T_m podem apresentar coexistência de fases, isto é, L_α e L_o na mesma estrutura, sendo um modelo mais próximo das células naturais⁹⁷. Todas as fases, bem como as características das cadeias, estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12: fases das bicamadas lipídicas e suas respectivas conformações de cadeias de hidrocarbonetos (L_β – representação da conformação *trans*; L_α – representação da conformação *gauche*). Adaptada de⁹⁶.

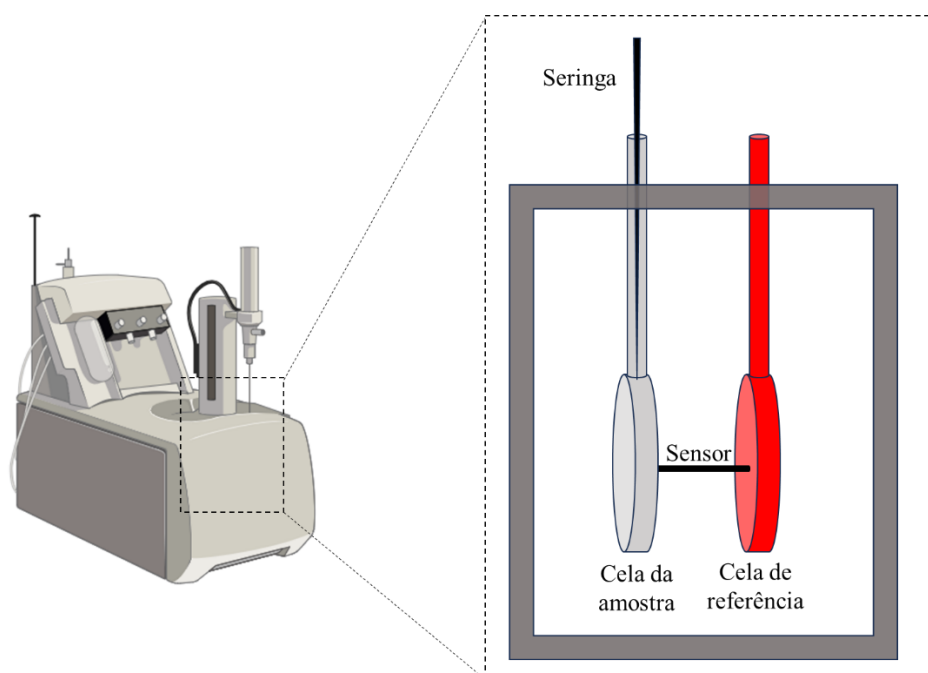


2.2.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (do inglês *Isothermal Titration Calorimetry* – ITC) é uma técnica empregada para o estudo de interações moleculares em solução, permitindo a determinação de parâmetros termodinâmicos associados a esses processos⁹⁹. A medida de ITC é baseada na medição direta do calor trocado durante uma interação, sem depender do uso de sondas de marcação ou métodos espectroscópicos para tal. Para isso, o equipamento é constituído de duas celas ligadas por um sensor de

temperatura, como mostra a Figura 13: a cela de referência, preenchida com água ultrapura e mantida à temperatura constante desejada; e a cela da amostra, na qual é colocada a solução do analito de interesse, e uma suspensão de vesículas (nesse caso LUVs) é injetada pouco a pouco, com volumes pré-definidos.

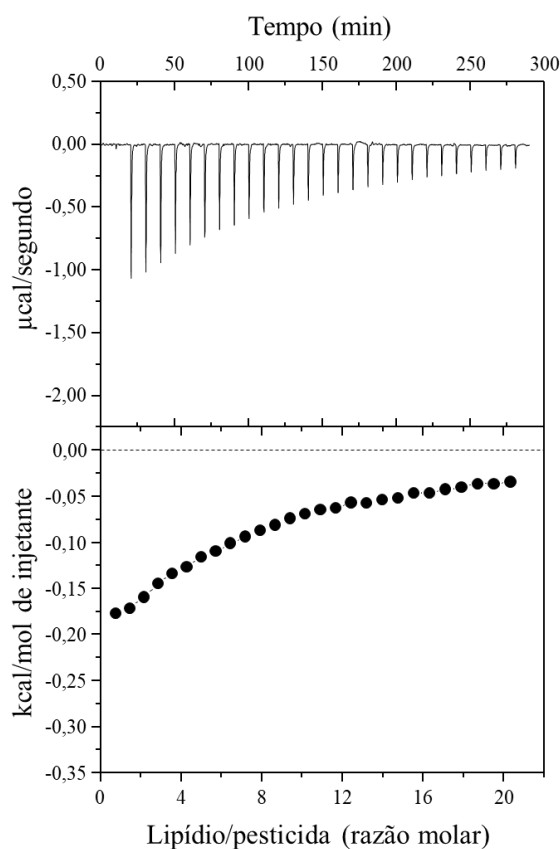
Figura 13 - representação esquemática do interior (zoom) de um equipamento de ITC.



Ao injetar as vesículas na cela da amostra, o analito se liga a essas estruturas, fazendo com que haja liberação de calor (processos exotérmicos), ou absorção de calor (processos endotérmicos). Nesse sentido, há variação na temperatura da cela de amostra, e, para que a mesma permaneça na mesma temperatura da cela de referência, é fornecido ou retirado calor do sistema de interesse. O fornecimento (ou retirada) de calor da cela da amostra em função do tempo origina então um termograma (Figura 14, gráfico superior), no qual os picos positivos se referem a processos endotérmicos e os picos negativos,

exotérmicos. Os picos então são integrados e divididos pela quantidade de matéria injetada em cada injeção, e dispostas no gráfico em função da razão molar entre injetante/analito (Figura 14 – gráfico inferior). Esse gráfico então é usado para determinar parâmetros de interação, como a variação de entalpia (ΔH), importante para se calcular a energia de ligação entre as moléculas.

Figura 14 - termograma da medida de ITC (gráfico superior) e valores das integrais de cada pico em relação à razão molar entre o injetante (lipídio) e o analito (pesticida).



A partir das medidas experimentais, é possível descrever quantitativamente a constante de partição (K) e a variação total de entalpia do processo de interação (ΔH) por meio de um modelo termodinâmico de partição descrito por Herklotz e Seelig⁹⁹. Inicialmente, temos que a extensão de partição do pesticida na bicamada (X_b), dada pela

razão entre a concentração de pesticida ligado ($C_{pest,b}$) e a concentração de lipídio (C_{lip}^0), é diretamente proporcional à concentração de pesticida livre ($C_{pest,f}$), sendo definida pela Equação 4, onde K é a constante de partição:

$$X_b = \frac{C_{pest,b}}{C_{lip}^0} = K C_{pest,f} \quad \text{Equação 4}$$

Uma vez que a concentração total de pesticida (C_{pest}^0) é dada pela soma da concentração de pesticida livre ($C_{pest,f}$) e ligado ($C_{pest,b}$), podemos reescrever a Equação 4 da seguinte forma:

$$C_{pest,b} = \frac{K C_{lip}^0}{(1 + K C_{lip}^0)} C_{pest}^0 \quad \text{Equação 5}$$

Durante os experimentos de ITC, a injeção sucessiva de pequenas alíquotas de lipídio promove variações na concentração total de lipídio na cela, e o calor medido em cada injeção está associado à ΔH . Dessa forma, o calor associado à injeção de uma alíquota de lipídio (δh_i) pode ser descrito pela equação final do modelo (Equação 6), que relaciona o sinal térmico experimental ao incremento de concentração de lipídio (δC_{lip}^0), à concentração total de pesticida (C_{pest}^0), ao coeficiente de partição (K), ao volume da cela do ITC ($V_{cela} = 1,4576$ mL) e à variação total de entalpia do processo:

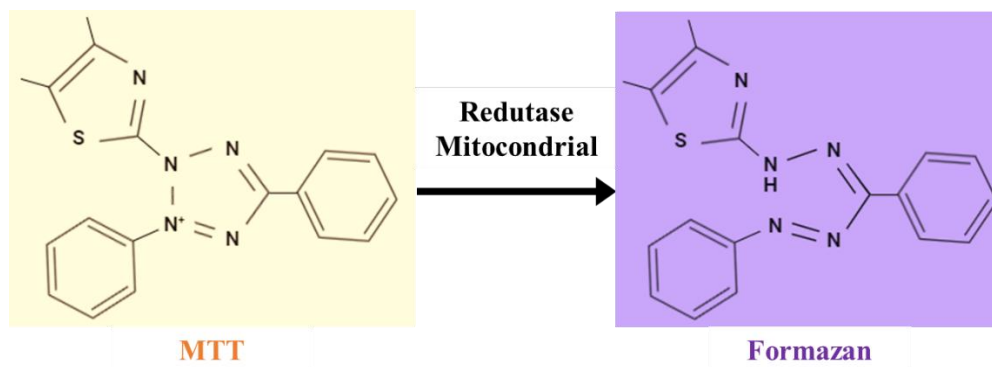
$$\delta h_i = \delta C_{lip}^0 \frac{KC_{pest}^0}{(1+KC_{pest}^0)} V_{cela} \Delta H$$
Equação 6

Dessa forma, é possível estimar os valores de K e ΔH por meio do software Origin, fazendo o *fitting* da curva até que sobreponha os valores das integrais calculados anteriormente.

2.3 Modelos in vitro – ensaios de viabilidade celular

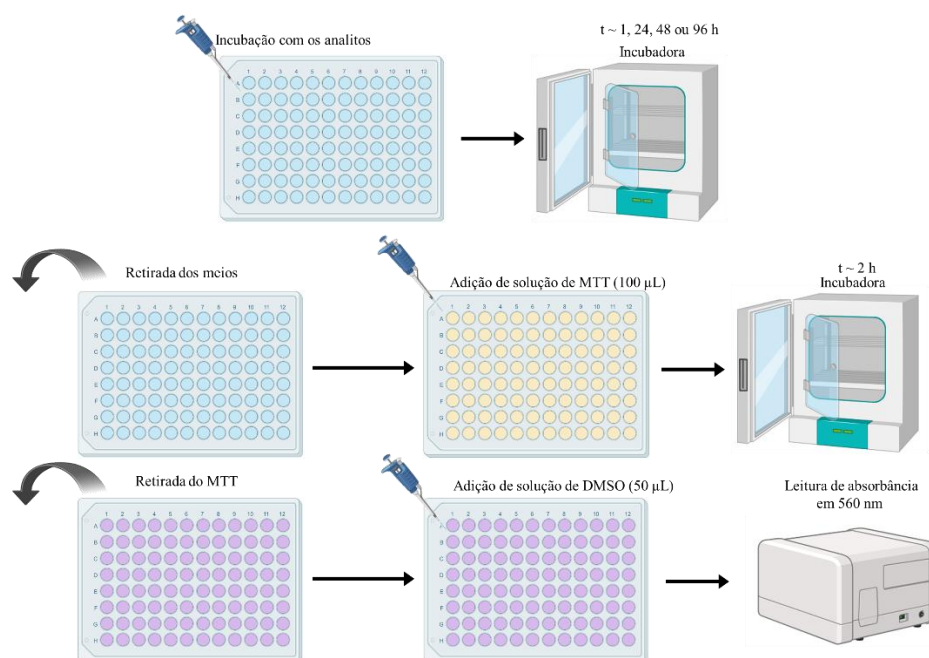
A avaliação da toxicidade de compostos químicos é uma alternativa viável para a compreensão de seus potenciais efeitos biológicos e toxicológicos em sistemas celulares. Entre os métodos mais utilizados para esse tipo de estudo, destaca-se o ensaio de MTT, uma técnica colorimétrica simples e amplamente utilizada para a determinação da viabilidade celular *in vitro*^{100,101}. O ensaio de MTT baseia-se na capacidade metabólica de células em reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), de cor amarela, em formazan, de coloração roxa (Figura 15). Essa reação ocorre predominantemente no interior das mitocôndrias, funcional apenas em células metabolicamente ativas^{102,103}. Assim, a quantidade de formazan formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Figura 15 - estruturas moleculares do sal MTT e do produto de sua redução pelas células, formazan.



A técnica consiste em expor as células a soluções com diferentes analitos, como pesticidas, por exemplo, em diferentes concentrações por períodos de tempos determinados. Após esse período, o meio contendo o analito é retirado dos poços, e é adicionada a solução de MTT em seu lugar, retornando os poços às incubadoras. O meio de MTT é então retirado e em seu lugar é colocado um solvente apropriado para a solubilização dos cristais de formazan, como DMSO. Por fim, a absorbância da solução pode ser quantificada por espectrofotometria, em comprimentos de onda próximos a 560 nm. A redução na absorbância em relação ao controle indica diminuição da viabilidade celular, refletindo efeitos citotóxicos do composto avaliado. A Figura 16 ilustra o processo experimental dessa técnica.

Figura 16 - esquema do processo experimental da citotoxicidade por meio de ensaio de MTT.



Uma das principais vantagens do ensaio de MTT é sua sensibilidade para detectar alterações precoces na viabilidade celular, antes mesmo do aparecimento de sinais morfológicos evidentes de morte celular. Além disso, o método é amplamente aplicável a diferentes tipos celulares, incluindo linhagens tumorais, sendo frequentemente empregado em estudos de toxicidade, farmacologia e avaliação de biomateriais^{104–106}.

2.4 Métodos computacionais

A fim de complementar e dar suporte para os resultados obtidos experimentalmente, métodos computacionais se tornam atrativos e eficazes, uma vez que permitem a diferenciação mais completa de dados e simulam com êxito as propriedades estruturais e eletrônicas das moléculas. Dentre esses métodos encontram-se a projeção IDMAP, responsável por diferenciar dados; a modelagem molecular, que permite calcular

a energia de um sistema com duas moléculas adsorvidas; e a dinâmica molecular, que permite o estudo da cinética de uma estrutura molecular quando na presença de um analito desejado. A combinação de experimentos e simulações de dinâmica molecular permite elucidar o mecanismo de interação entre pesticidas e sistemas miméticos da membrana celular. Por exemplo, Felsztyna *et al.*¹⁰⁷ observaram a interação entre o inseticida fipronil e monocamadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), com resultados de simulação indicando que as moléculas do pesticida estão localizadas entre o grupo de glicerol e as cadeias de hidrocarbonetos do lipídio, corroborando os resultados experimentais.

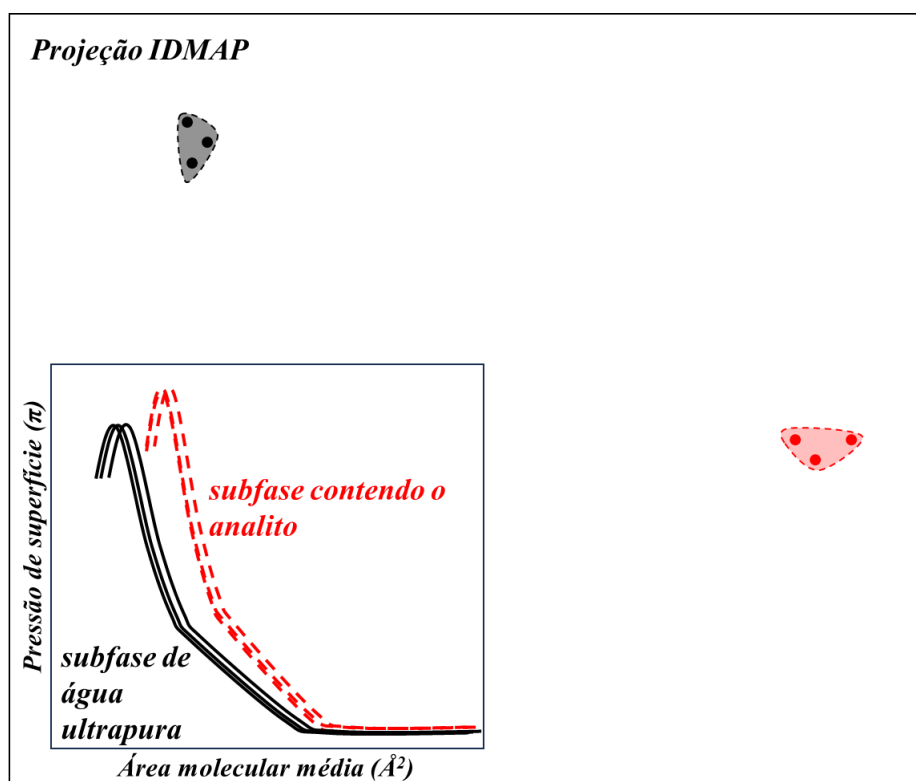
2.4.1 Projeção IDMAP

A projeção IDMAP (do inglês *Interactive Document Map*) é uma técnica que complementa a interpretação de dados pela semelhança entre os mesmos, reduzindo gráficos (ou um conjunto de dados de uma mesma natureza) em pontos dispostos em um plano, como exemplificado na Figura 17. Dessa forma, a dificuldade em se analisar a diferença entre dados que, através da percepção visual parecem semelhantes para quem analisa, é sanada uma vez que a projeção leva em consideração apenas a distância entre os pontos, na qual quanto menor a semelhança entre os dados, maior a distância, e vice e versa^{108,109}.

Nesse sentido, a técnica utiliza a função injetora $f: X \rightarrow Y$ para minimizar $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))| \approx 0$, $\forall x_i, x_j \in X$, onde X é o conjunto de dados dado por $\{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ e $\delta(x_i, x_j)$ é a distância entre os dados “i” e “j”. Já os valores correspondentes dos dados para a projeção são dados por $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$, onde $d(y_i, y_j)$ é a distância entre os pontos para as medidas projetadas. Uma representação dos dados tratados é dada na Figura 17, na qual os pontos possuem cores correspondentes a isoterma de mesma cor, e

cada aglomerado de pontos, chamados de *clusters*, correspondem à isothermas de mesma natureza (ou seja, mesma composição e mesmo sistema sem ou com analito). No caso da distância entre os pontos, tanto alterações no perfil do dado original quanto deslocamentos entre esses dados, como por exemplo nas isothermas, são levados em conta.

Figura 17 - exemplo de projeção IDMAP mostrando *clusters* referentes às isothermas π -A em diferentes subfases. Cada ponto em um *cluster* representa uma isoterma.



Na literatura essa técnica é comumente utilizada para diferenciar espectros referentes a sensores, nos quais uma ampla gama de dados, inicialmente similares ao olhar humano, é analisada, e pequenas diferenças podem ser reveladas pela projeção, reforçando a utilidade do IDMAP^{110–113}. Porém a aplicação da projeção em isothermas π -A também se mostra efetiva, uma vez que mesmo não havendo deslocamentos

expressivos nas curvas de determinado sistema, diferenças não perceptíveis podem ser apontadas pela distância entre os pontos⁶¹.

2.4.2 Modelagem molecular

A modelagem molecular é uma técnica que consiste em um conjunto de ferramentas utilizadas para construir e visualizar sistemas moleculares com o intuito de prever a conformação e possíveis interações entre moléculas¹¹⁴. Nesse sentido, a técnica se baseia na mecânica clássica, levando em conta a estrutura como um conjunto de esferas ligadas por molas. O método da Teoria Funcional de Densidade (DFT – *Density Functional Theory*) é atrativo nas modelagens moleculares por considerar a densidade eletrônica em seus cálculos¹¹⁵, permitindo o estudo em transporte de carga, interfaces entre moléculas e sistemas biológicos¹¹⁶.

Além disso, o uso de DFT em conjunto com outras técnicas computacionais permitem o estudo mais detalhado na interação entre moléculas. O CAFI (*Condensed-to-Atoms Fukui Index*) permite inferir as interações moleculares envolvendo os orbitais moleculares de fronteira dos compostos, indicando sítios reativos das moléculas em relação a agentes externos nucleofílicos e eletrofílicos (f^+ e f^- , respectivamente)¹¹⁷. Já o mapeamento MEP (*Molecular Electrostatic Potential*)¹¹⁸ permite inferir interações eletrostáticas ao indicar regiões ricas ou não em elétrons e energias de adsorção, respectivamente.

2.4.3 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular são utilizadas para prever como cada átomo ou molécula se comporta ao longo de um tempo determinado, levando em conta mudanças conformacionais, ligações e posição de átomos em uma estrutura pré-definida¹¹⁹. Essas simulações são utilizadas para interpretar ou prever resultados experimentais, sendo um ótimo suporte para definir a dinâmica de uma interação entre duas moléculas de interesse. Karplus e McCammon¹²⁰ apontam três principais usos para esse tipo de cálculo computacional. O primeiro utiliza a técnica para calcular o espaço das configurações em um sistema, enquanto a segunda aplicação visa descrever um sistema em equilíbrio, que inclui parâmetros estruturais, de movimento e termodinâmicos. Já a terceira aplicação tem como objetivo descrever a dinâmica das moléculas levando em conta o desenvolvimento da movimentação das mesmas ao longo do tempo. Nesse contexto, o uso da dinâmica molecular é atrativo para definir a interação entre moléculas de interesse com, por exemplo, estruturas biológicas como bicamadas lipídicas.

Nesses cálculos, as moléculas são tratadas como partículas mantidas por forças harmônicas ou elásticas, e as interações entre essas partículas são mantidas por uma somatória das energias potenciais totais do sistema (V_r), como descrito por Namba *et al.*¹²¹. Essa somatória leva em conta as energias para átomos ligados, como comprimento e ângulos de ligação, e para átomos não ligados, como interação de van der Waals e de Coulomb. Para calcular a posição da partícula após determinado tempo, a série de Taylor (Equação 7) é utilizada como tratamento numérico, onde $r(t)$ é a posição inicial da partícula, dr/dt é a velocidade da partícula e d^2r/dt^2 é a aceleração da mesma (sendo esses três termos conhecidos), e Δt é o intervalo de tempo¹²¹.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr}{dt}\Delta t + \frac{d^2r}{dt^2}\frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad \text{Equação 7}$$

A técnica de Dinâmica Molecular utiliza diversos pacotes de programas, como CHARMM e GROMOS¹²⁰, e o AMBER22¹²², utilizado neste trabalho.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos gerais:

- * A determinação dos efeitos do acefato, diuron e seu coquetel sobre monocamadas (Filmes de Langmuir) e bicamadas (GUVs e LUVs) lipídicas compostas por sistemas ternários aplicadas como modelo da membrana celular de mamíferos.
- * A detecção do acefato, inicialmente planejado via espectroscopia vibracional (SERS – do inglês *surface-enhanced Raman scattering*), no que não obtivemos êxito, mas que foi possível por meio de colorimetria utilizando nanopartículas de ouro modificadas com L-cisteína.

Tais objetivos foram atingidos por meio dos seguintes objetivos específicos:

- i) Interações dos pesticidas com monocamadas lipídicas:
 - a) Estudo dos efeitos do acefato e diuron em monocamadas ternárias compostas de POPC/Col/SM na proporção 70/20/10 em mol%, bem como para monocamadas dos lipídios isolados, por meio de isothermas π -A e módulo de compressibilidade;
 - b) Estudo das interações dos pesticidas em nível molecular com as monocamadas ternárias ou dos lipídios isolados via PM-IRRAS.
 - c) Investigação de mudanças morfológicas das monocamadas ternárias na presença da mistura dos pesticidas acefato e diuron.
- ii) Interações com bicamadas lipídicas:
 - a) Estudo de mudanças morfológicas através de microscopia por contraste de fase promovidas pelos pesticidas acefato e diuron, isolados ou em mistura, em GUVs ternárias de POPC/Col/SM.

b) Estudo da formação das GUVs ternárias já na presença da mistura dos pesticidas.

c) Estudo da interação entre acefato ou diuron com LUVs ternárias por meio de Calorimetria por Titulação Térmica.

Além dos objetivos supracitados envolvendo sistemas miméticos da membrana celular, os estudos das interações pesticida/lipídios foram realizados também por meio de métodos computacionais, como DFT e Modelagem Molecular a fim de complementar os resultados experimentais.

iii) Detecção do acefato por meio de colorimetria:

a) Determinar a agregação de nanopartículas de ouro na presença de L-cisteína em diferentes concentrações nas temperaturas de 24, 37 e 50 °C por diferentes períodos de exposição;

b) Avaliar os efeitos do acefato sobre a agregação do sistema nanopartículas+L-cisteína;

c) Construir curvas analíticas e faixa linear para o sistema nanopartículas+L-cisteína com diferentes concentrações de acefato e determinar o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ) do sistema.

Além dos objetivos citados, também foi realizado o estudo de viabilidade celular de células da linhagem Hep-2 na presença de acefato, diuron e de seu coquetel por meio de ensaio de MTT, avaliando a porcentagem de células afetadas pelos pesticidas.

Capítulo 4
Materiais e métodos

Capítulo 4 – Materiais e métodos

4.1 Materiais

O lipídio POPC foi adquirido da Avanti Polar Lipids, enquanto o Col e a SM foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os pesticidas acefato e diuron foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como a glicose e o álcool polivinílico (PVA – MM: 146.000–186.000), utilizados na formação das GUVs. Já a sacarose foi comprada da Synth. Os materiais utilizados no estudo da detecção do acefato via colorimetria (HAuCl_4 , citrato de sódio e L-cisteína) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As células Hep-2, disponibilizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki, foram obtidas através do banco de células do Rio de Janeiro (ref. 0101, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Tais células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM F12 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino, antimicóticos e antibióticos. As soluções de acefato, glicose e sacarose foram preparadas com água ultrapura (sistema Milli-Q, resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), enquanto as soluções-estoque de diuron e dos lipídios foram preparadas com metanol e mistura de clorofórmio com metanol (7:3, v:v), respectivamente. Para o estudo de detecção, todas as moléculas utilizadas foram solubilizadas em água ultrapura. Já para o estudo *in vitro*, os pesticidas foram solubilizados na mesma solução de cultivo das células. Todos os materiais eram de grau analítico (> 90%).

4.2 Monocamadas de Langmuir

4.2.1 Isotermas π -A

Os filmes de Langmuir foram formados em uma cuba de Langmuir da marca KSV com capacidade para 30 mL de subfase aquosa. Aliquotas das soluções estoque à $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ de POPC, colesterol, esfingomiélin ou da mistura ternária POPC/Col/SM na

proporção 70/20/10 mol% diluídos em mistura de clorofórmio:metanol 3:2 (v:v) foram espalhados sobre a subfase. Após 15 minutos (tempo necessário para a evaporação completa do solvente), as barreiras foram comprimidas simetricamente a uma velocidade de 10 mm/min, sendo obtida assim a isoterma de pressão de superfície vs. área molecular média (π -A). Os filmes ternários foram obtidos em subfases de água ultrapura e dos pesticidas diuron e acefato (ambos na concentração de $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L), além do coquetel acefato/diuron ($0,125 \times 10^{-5}$ mol/L de cada pesticida, totalizando $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L). Já as monocamadas dos lipídios POPC, colesterol, esfingomiélin foram formadas sobre subfase de água ultrapura ou do coquetel dos pesticidas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata a uma temperatura de $\sim 23 \pm 1$ °C.

4.2.2 Módulo de compressibilidade (C_S^{-1})

O módulo de compressibilidade foi calculado a partir dos dados obtidos referentes às isotermas π -A para os seguintes sistemas: monocamadas ternárias em subfase de água ultrapura, acefato, diuron ou coquetel; e monocamadas dos lipídios isolados em subfase de água ultrapura ou coquetel. Para obter o valor de C_S^{-1} , a seguinte equação foi utilizada, onde π é a pressão de superfície, A é a área molecular média e T é a temperatura¹²³:

$$C_S^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad \text{Equação 8}$$

Após os cálculos, os valores de C_S^{-1} referente à pressão de superfície de 30 mN/m foram analisados, uma vez que esse valor remete à pressão lateral natural das membranas presentes nas células dos mamíferos^{124,125}.

4.2.3 Espectros PM-IRRAS

Os espectros PM-IRRAS foram obtidos com um espectrofotômetro modelo PMI 550, da KSV Instruments, que está sob supervisão do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., no IFSC (USP – São Carlos). As soluções dos lipídios POPC, colesterol e esfingomielina, bem como a mistura ternária, foram espalhadas na subfase em uma cuba de Langmuir, obedecendo o mesmo procedimento realizado para o item 4.1.1. As monocamadas foram comprimidas até atingir a pressão de 30 mN/m, e os espectros foram coletados no intervalo de 800 a 4200 cm^{-1} , com ângulo rasante de 80°, a uma temperatura de $\sim 23 \pm 1$ °C. Antes do registro de cada espectro das monocamadas, foram obtidos os *backgrounds* das respectivas subfases (de água ultrapura ou contendo os contaminantes). Foram registrados os espectros da monocamada ternária em água ultrapura, diuron, acefato e coquetel, nas mesmas concentrações utilizadas para as isotermas π -A, além dos espectros de POPC, colesterol ou esfingomielina subfase de água ultrapura ou coquetel. Todas as medidas foram realizadas com 600 *scans*.

4.2.4 Cálculos teóricos e modelagem molecular

Cálculos de estrutura eletrônica foram realizados para as moléculas de acefato, diuron, POPC, SM e Col a fim de se avaliar reatividades locais, potenciais eletrostáticos e energias de adsorção. Os cálculos foram realizados por teoria do funcional de densidade (DFT – *Density Functional Theory*) usando as funções de relação de troca B3LYP34^{126–129} e CAM-B3LYP¹³⁰ para sistemas isolados e adsorvidos, respectivamente. O conjunto de bases a 6-31G(d,p) foi selecionado para todos os átomos e o solvente (água) foi simulado através do método do contínuo polarizável (PCM – *Polarizable Continuum Method*)¹³¹. As otimizações de geometria foram realizadas utilizando o pacote

computacional Gaussian 16¹³², enquanto o Orca 4.0¹³³ foi usado para determinar as energias de adsorção.

As reatividades locais dos compostos foram avaliadas utilizando-se índices de Fukui condensados aos átomos (CAFI)^{134,135} e mapas de potencial eletrostático molecular (MEP – *Molecular Electrostatic Potential*). Os CAFIs, derivados da DFT, foram usados para examinar interações moleculares envolvendo os orbitais de fronteira das moléculas. Eles permitem identificar os sítios mais reativos das moléculas em termos de agentes eletrofílicos (f^-) e nucleofílicos (f^+) externos¹¹⁷. Por outro lado, os mapas MEP foram utilizados para identificar regiões moleculares ricas ou deficientes em elétrons, a fim de prever interações eletrostáticas. Os CAFIs foram obtidos através de diferenças finitas considerando os átomos neutros, aniônicos e catiônicos, conforme descrito em outros estudos^{136–138}. O método de partição de Hirshfeld foi utilizado a fim de evitar índices negativos^{139,140} e os mapeamentos MEP foram projetados a partir das cargas atômicas, estimadas pelo esquema CHelp¹⁴¹.

Os sistemas adsorvidos (pesticida + lipídio) foram analisados por meio da aproximação DFT/CAM-B3LYP/6-31G(d,p)/PCM para determinar as energias de adsorção e as mudanças em CAFI e MEPs. As estruturas dos sistemas foram inicialmente construídas alinhando as regiões carregadas negativamente e positivamente dos pesticidas com os lipídios. Para estimar as energias de adsorção, a diferença nas energias totais entre os compostos adsorvidos e os compostos isolados foi considerada, tanto antes quanto após a adsorção, eliminando o erro de superposição do conjunto de bases (BSSE – *Basis Set Superposition Error*) pelo método de contraposição¹⁴². Tais cálculos foram realizados pelo Dr. Orisson Ponce Gomes (UNESP – Bauru) e pelo Prof. Dr. Augusto Batagin-Neto (UNESP – Itapeva).

4.2.5 Microscopia por ângulo de Brewster (BAM)

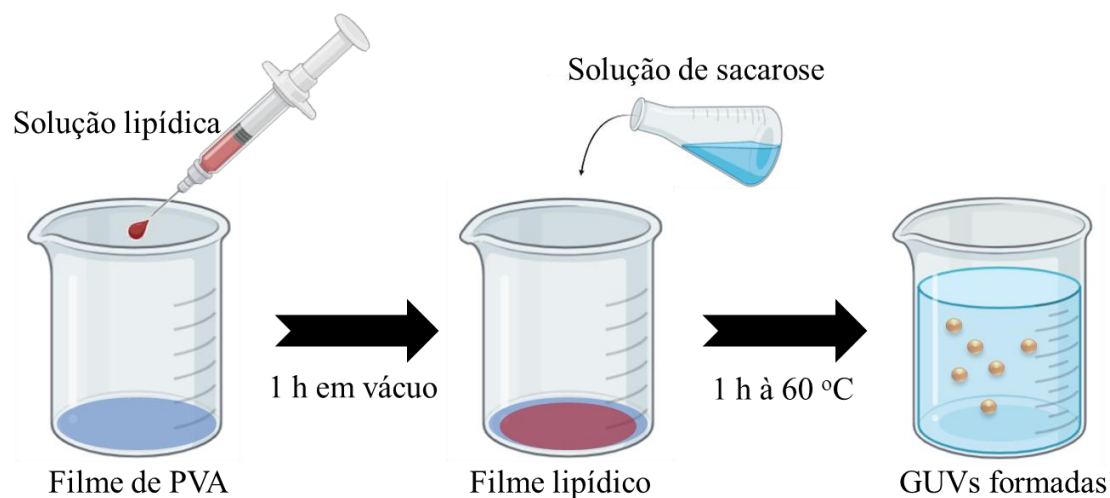
Os experimentos realizados para a captura das imagens de morfologia das monocamadas foram obtidos utilizando um equipamento da marca Accurion Nanofilm EP4 (Goettingen, Alemanha) acoplado à uma cuba de Langmuir (KSV, Helsinki, Finlândia), ambos sob supervisão do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., no IFSC (USP – São Carlos). A solução da mistura ternária foi espalhada em subfase de água ultrapura ou do coquetel, seguindo o procedimento da seção 4.1.1. Após a evaporação do solvente, o laser do equipamento (658 nm) foi incidido na interface ar/água com ângulo de incidência de 53.1° (ângulo de Brewster), e uma câmera CCD (*charged-coupled-device*) é utilizada para capturar as imagens em diferentes pressões de superfície.

4.3 Bicamadas lipídicas e sistema *in vitro*

4.3.1 Formação e observação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As GUVs compostas pela mistura POPC/Col/SM (70/20/10 mol%) foram formadas pelo método gel, descrito por Weinberg *et al.*⁹⁵. Primeiramente, 500 μL de uma solução de PVA (álcool polivinílico, Sigma-Aldrich, com MM: 146.000 - 186.000 g/mol) de concentração 1×10^{-4} mol/L foram adicionados a um béquer de 5 mL com fundo plano. Após a formação do filme de PVA, realizada colocando o sistema em uma estufa à 50 - 70 $^\circ\text{C}$, 10 μL da solução da mistura ternária (1×10^{-3} mol/L) foram espalhados sobre o filme e o sistema foi deixado por 1 hora em vácuo para a evaporação completa do solvente. Por fim, o filme lipídico foi hidratado com uma solução de sacarose (0,2 mol/L) pré-aquecida à 60 $^\circ\text{C}$ (temperatura acima da transição de fase da SM^{51,143}) e o sistema foi deixado em banho aquecido (aquecedor da marca Lauda) por 1,5 hora, até que se formassem as GUVs. O esquema da formação é mostrado na Figura 18.

Figura 18 - esquema da formação em gel das vesículas unilamelares gigantes (GUVs).



Para a visualização das vesículas, 50 μL da solução contendo as GUVs foram adicionados à 200 μL de solução de glicose (0,2 mol/L) ou solução de glicose na mesma concentração contendo os pesticidas diuron, acefato ou sua mistura (todas à 4×10^{-4} mol/L). As osmolaridades de ambas foram medidas por meio de um osmômetro (Osmomat 3000, Gonotec, Alemanha) a fim de evitar diferenças de concentração entre o meio interno e o meio externo das vesículas. Assim, toda mudança morfológica não é atribuída a diferenças de osmolaridade. Para a análise das GUVs ternárias formadas já na presença dos pesticidas, as vesículas foram hidratadas com solução do coquetel (4×10^{-4} mol/L) diluída em solução de sacarose (0,2 M), e 50 μL da suspensão foram adicionados à 200 μL de solução de glicose para a visualização. As imagens por contraste de fase foram obtidas através de um microscópio óptico da marca Nikon C2/C2si Eclipse Ti-E (Kyoto, Japão), usando uma objetiva de 40x, NA 0,6. Vídeos de 30 minutos foram gravados e, no fim de cada observação, foram capturadas imagens das vesículas em diferentes regiões para análise quantitativa (explicada detalhadamente nos resultados).

4.3.2 Formação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) e medidas de ITC

A fim de obter as LUVs para a análise em ITC, filmes de POPC, SM ou mistura ternária foram formados em um tubo de ensaio, secando-se as soluções estoque com fluxo contínuo de N₂ enquanto o tubo era submetido à agitação vórtex. Os filmes foram então submetidos à vácuo por 1 hora a fim de evaporar qualquer resíduo de solvente presente no mesmo. Após a secagem, os filmes lipídicos foram hidratados com 1 mL de água ultrapura, resultando na concentração final de lipídio igual a 20 mM, e o sistema foi levado ao vórtex por 2 minutos. As suspensões lipídicas foram então extrusadas 21 vezes em uma miniextrusor Avanti, equipado com membranas de policarbonato (Whatman, Sigma Aldrich) com poros de 100 nm de diâmetro, formando, por fim, as LUVs. Para a obtenção das LUVs de SM pura ou a mistura ternária, os procedimentos de hidratação e extrusão foram realizados a temperaturas superiores à temperatura de transição de fase do esfingolipídio ($\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), a fim de garantir a fluidez adequada da bicamada durante a formação das vesículas.

As medidas de ITC foram realizadas em um equipamento VP-ITC, da MicroCal, sob supervisão da Profa. Dra. Karin do Amaral Riske (Unifesp - SP). Neste equipamento, a cela de referência foi preenchida com água ultrapura e a cela de medida, com solução de acefato ou diuron, em concentrações de 0,2 ou 0,4 mM. A seringa do equipamento foi preenchida com as suspensões de LUVs de POPC, SM ou mistura ternária, e alíquotas de 10 μL da suspensão foram injetadas a cada 10 minutos na cela da amostra. As medidas foram realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$ para todas as composições lipídicas. Adicionalmente, experimentos a 50 $^{\circ}\text{C}$ foram conduzidos para as LUVs de SM, de modo a investigar a interação acima da temperatura de transição de fase do esfingolipídio.

4.3.3 Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando o programa AMBER22¹²² em uma bicamada hidratada de POPC na presença de diuron ou acefato em diferentes concentrações. As interações em nível atômico foram descritas usando os parâmetros LIPID21¹⁴⁴ para as bicamadas, FF19SB¹⁴⁵ para as moléculas de água e GAFF2 para o diuron e acefato. A bicamada de POPC contendo 100 lipídios por camada foi preparada usando o servidor web CHARMM-GUI¹⁴⁶, sendo equilibrada até alcançar os valores experimentais relatados para a área por lipídio. Para preparar as moléculas de diuron e acefato para as simulações foi utilizado o Gaussian 16¹⁴⁷ no nível de teoria HF/6-31G* para otimizar e calcular seus potenciais eletrostáticos (ESP). Posteriormente, as cargas RESP (*restrained electrostatic potential*) foram determinadas usando o programa antechamber, e os parâmetros ausentes do campo de força GAFF2 foram obtidos com o programa parmchk.

Duas proporções de pesticida-lipídio foram simuladas: 1:200 e 5:200. Para a configuração inicial dos sistemas, todos os pesticidas (acefato ou diuron) foram colocados no meio aquoso. As energias das estruturas iniciais foram minimizadas e aquecidas até 296 K, sendo seguido pelo equilíbrio dos sistemas por 3ns. Por fim as dinâmicas foram simuladas por 200 ns para os sistemas do POPC na ausência ou presença de diuron ou acefato nas duas proporções pesticida-lipídio, sendo os resultados analisados pelo programa CPPTRAJ¹⁴⁸ e as imagens preparadas por VMD 1.9.4a55¹⁴⁹. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh-Ewald¹⁵⁰. A interação entre o diuron ou o acefato com o POPC foi quantificada por meio de cálculos da Função de Distribuição Radial (RDF), que fornecem informações sobre a distribuição espacial das moléculas de pesticida em relação à bicamada lipídica de POPC. Esta etapa foi realizada pelo Prof. Dr. Danilo da Silva Olivier (Universidade Federal do

Norte do Tocantins - UFNT) e pelo Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS).

4.3.4 Ensaios de MTT para avaliação de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada no laboratório sob supervisão do Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki (Unesp – Assis), por meio do ensaio colorimétrico de MTT utilizando a linhagem celular HEp-2 (carcinoma epidermoide laríngeo humano). Tal linhagem é utilizada em testes citotóxicos devido à sua disponibilidade, fenótipo estável, vida útil ilimitada e facilidade de manipulação¹⁵¹. As células foram semeadas em placas de 96 poços (4×10^4 células por poço), em meio de cultura apropriado, e incubadas em condições padrão (37 °C, atmosfera umidificada com 5% de CO₂) até a adesão celular. Após a etapa de adesão, o meio de cultura foi substituído por meio contendo acefato, diuron ou a mistura acefato/diuron nas concentrações de $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L (utilizado nas monocamadas), $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L (utilizado nas bicamadas) e $3,86 \times 10^{-7}$ mol/L (limite máximo de resíduo do diuron em água). Uma vez que a solução estoque do diuron foi solubilizada em metanol, foi incluído um controle de solvente (metanol - C_{met}), contendo a mesma proporção final de metanol presente nos poços tratados com diuron a fim de avaliar eventuais efeitos do solvente sobre a viabilidade celular. Foram empregados também o controle de vida (CV), no qual foi adicionado o meio de cultura, e o controle morte (CM), no qual foi adicionada água ultrapura. Após os períodos de exposição aos tratamentos (1h, 24h, 48h e 96h), os meios de controle e os meios contendo os pesticidas foram trocados por 100 µL de solução de MTT e a placa foi incubada por 2 horas para a formação dos cristais de formazan. Em seguida, o MTT foi removido e os cristais formados foram solubilizados em 50 µL de DMSO em cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas Multiskan FC, no comprimento de onda de 560 nm.

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao controle de vida, considerando 100% como as células não expostas aos pesticidas.

4.3.5 Análise estatística

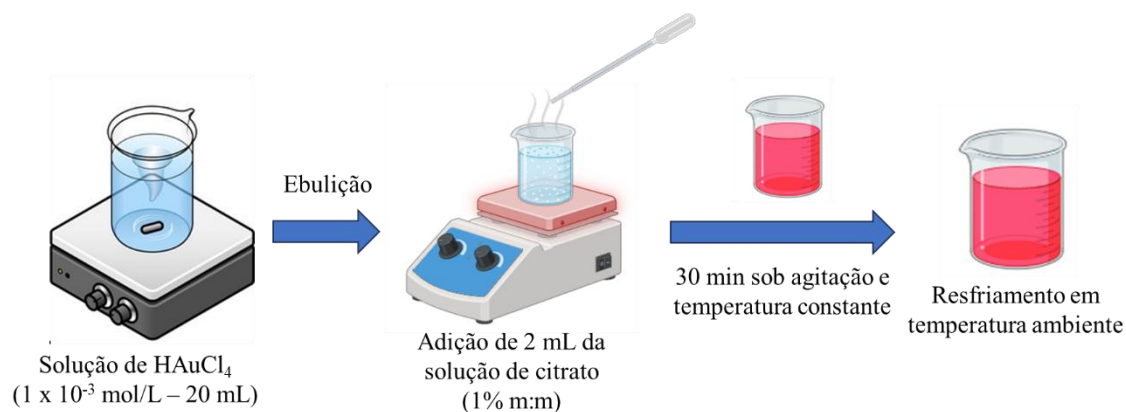
As análises estatísticas dos resultados obtidos na contagem das GUVs e na viabilidade celular foram realizadas no software jamovi¹⁵², sendo os grupos comparados pelo método *ANOVA a um fator*, usado para verificar se três ou mais grupos independentes (por exemplo, grupos controle e expostos aos pesticidas) apresentam médias estatisticamente iguais para uma mesma variável dependente (viabilidade celular, mudanças morfológicas)¹⁵³. A homogeneidade de variâncias foi verificada por meio do teste de *Levene*, que testa a hipótese de igualdade das variâncias entre os grupos experimentais. Neste caso, um p-valor inferior ao nível de significância ($p < 0,05$) sugere heterogeneidade de variâncias, enquanto um p-valor igual ou maior ($p \geq 0,05$) sugere homogeneidade^{154,155}. Nos casos em que se observou homogeneidade, foi aplicado o teste *post-hoc* de *Tukey (HSD)*, enquanto o teste de *Games–Howell* foi utilizado nos casos em que se observou heterogeneidade de variâncias¹⁵⁶.

O p-valor após o teste *post-hoc* representa a probabilidade de se observar um resultado tão extremo quanto o obtido (ou mais extremo), assumindo que a hipótese nula (hipótese de que não há diferença estatística entre os grupos comparados) seja verdadeira¹⁵⁷. Assim, valores de $p < 0,05$ indicam evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese nula, enquanto valores de $p \geq 0,05$ sugerem que não há evidência estatística para afirmar a existência de diferença entre os grupos¹⁵⁸. É importante destacar que o p-valor não mede a magnitude do efeito, devendo ser interpretado em conjunto com a análise experimental e o contexto do estudo¹⁵⁹.

4.4 Detecção do acefato via colorimetria

As AuNPs foram sintetizadas baseadas pelo método descrito por Turkevich *et al.*¹⁶⁰. Inicialmente, 20 mL de uma solução de HAuCl_4 (1 mM) foram aquecidos sob agitação constante. Após atingir o ponto de ebulição, 2 mL de uma solução de citrato (1% em massa) foram adicionados à solução. A cor da solução mudou de transparente para preta e, por fim, vermelho-rubi, indicando a formação das nanopartículas. A mistura foi então mantida sob agitação por 30 minutos e, em seguida, retirada do aquecimento até atingir a temperatura ambiente. A síntese foi armazenada na geladeira, em temperatura $\sim 4^\circ\text{C}$, para usos posteriores. A Figura 19 esquematiza o processo da síntese.

Figura 19 - processo de síntese das nanopartículas de ouro.



As AuNP sintetizadas foram inicialmente analisadas por espectroscopia de extinção no UV-Vis a fim de verificar a banda plasmônica. Nessa etapa, 250 μL do coloide foram diluídos em água ultrapura. Em seguida, diferentes concentrações de L-cisteína foram adicionadas às AuNP, totalizando 500 μL de solução, e as amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, as soluções foram

novamente analisadas por UV-vis na faixa de 400 a 900 nm para investigar a agregação e as alterações na banda plasmônica, nos tempos de 0 e 24 horas. As nanopartículas puras e modificadas com L-cisteína também foram caracterizadas por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR – Perkin Elmer Spectrum One equipado com acessório de refletância total atenuada – ATR), com o objetivo de confirmar a ligação do aminoácido às nanopartículas.

Para investigar os efeitos do acefato na agregação das AuNP, três temperaturas diferentes foram escolhidas: 24 °C, 37 °C e 50 °C. Inicialmente, soluções de AuNP, L-cisteína e acefato foram aquecidas até atingirem as temperaturas desejadas. Em seguida, quatro amostras foram preparadas: AuNP puras; AuNP + acefato (concentração final de 1×10^{-6} mol/L); AuNP + L-cisteína; e AuNP + L-cisteína + acefato. Para a amostra com o pesticida, a solução de acefato foi adicionada as AuNPs+L-cisteína e o sistema foi levado ao vórtex por 10 segundos. Cada amostra apresentou um volume final de 500 µL. As medidas de UV-Vis foram realizadas para cada amostra nos tempos de 10, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos com as amostras sendo retornadas ao aquecimento entre as medições.

Para avaliar a capacidade do sistema em detectar acefato, seis amostras contendo AuNP + L-cisteína + acefato, com diferentes concentrações do pesticida (1×10^{-6} mol/L, $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,6 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,4 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,1 \times 10^{-6}$ mol/L e $0,01 \times 10^{-6}$ mol/L), foram incubadas a 50 °C e analisadas por UV-vis nos mesmos intervalos de tempo descritos anteriormente. Os experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Ludovico Valli, sob supervisão da Profª. Dra. Simona Bettini, na Università del Salento, Lecce, Itália.

Capítulo 5

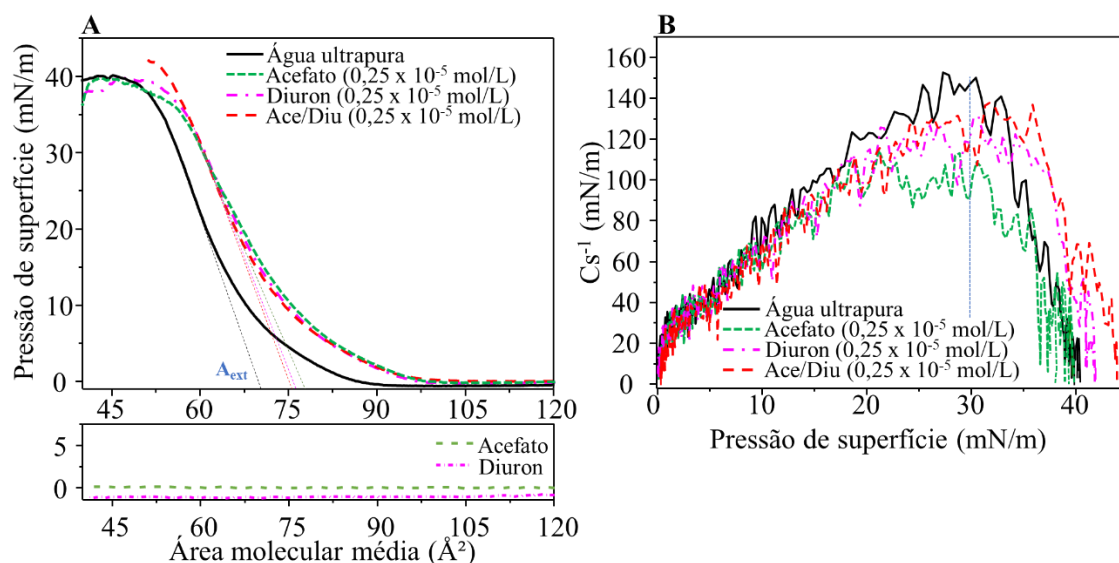
Resultados e discussão das monocamadas de Langmuir

Capítulo 5 - Resultados e discussão: monocamadas de Langmuir

5.2 Resultados de isothermas π -A e módulo de compressibilidade

Inicialmente, foram formados filmes de Langmuir da mistura lipídica POPC/Col/SM (70/20/10 em mol%) em subfase de água ultrapura, soluções dos pesticidas acefato ou diuron (ambas à concentração de $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L) ou do coquetel acefato+diuron (Ace/Diu - concentração final da mistura: $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L). A Figura 20-A mostra as isothermas π -A referentes à média das triplicatas da mistura ternária na ausência e presença dos pesticidas isolados ou em coquetel, bem como a curva obtida na compressão das barreiras somente com as subfases dos analitos na ausência das monocamadas lipídicas. Já a Figura 20-B traz os módulos de compressibilidade das isothermas obtidas.

Figura 20 - A: isothermas π -A da mistura lipídica ternária POPC/Col/SM (7/2/1 em mol %) na ausência (em preto) e presença dos pesticidas acefato (tracejado – verde); diuron (tracejado – magenta); e coquetel Ace/Diu (tracejado - vermelho). As linhas tracejadas em cada curva representam a área extrapolada (A_{ext}) referente à região condensada da isoterma (moléculas lipídicas mais empacotadas). Atividade superficial da subfase com acefato ou diuron à $0,25 \times 10^{-5}$ mol/L (*inset* abaixo). B: Curvas do módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das isothermas π -A, destacando o ponto referente à 30 mN/m.

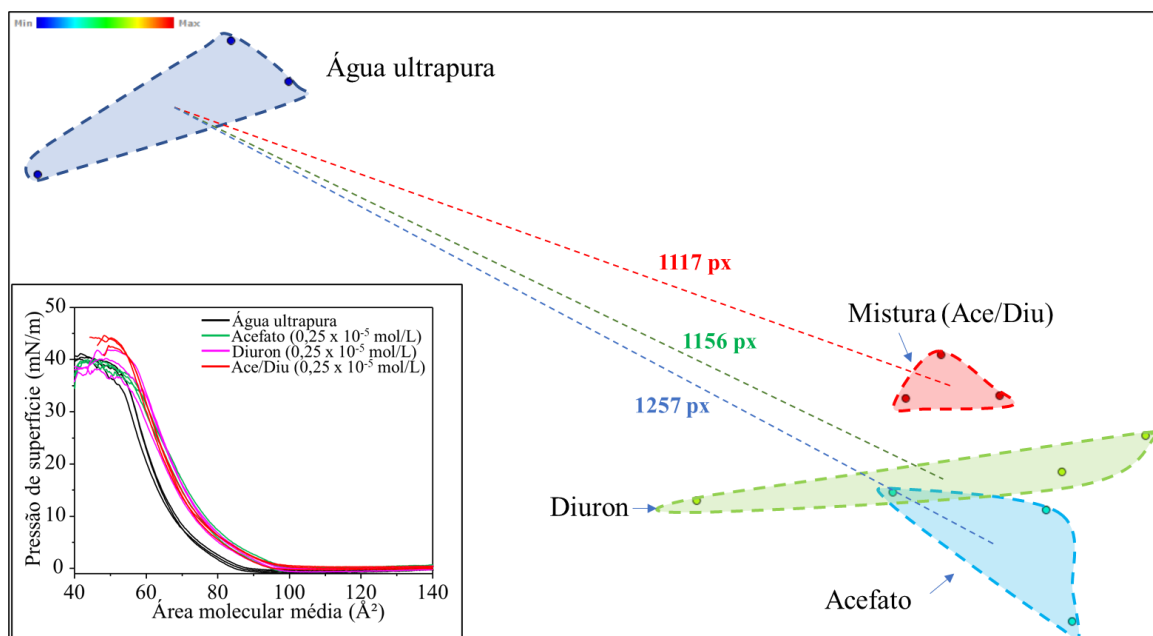


As isotermas π -A da monocamada ternária POPC/Col/SM em subfase de água ultrapura (Figura 20-A, linha preta) possuem o perfil similar àqueles encontrados na literatura^{161,162}. A A_{ext} referente à região condensada da isoterma é igual a $69 \pm 1 \text{ \AA}^2$, com o colapso da monocamada ocorrendo em $40 \pm 1 \text{ mN/m}$. Uma vez que é apresentado apenas um ponto de colapso na monocamada, pode-se assumir que as componentes da monocamada são miscíveis entre si, como descrito por Dynarowicz- Łątka e Kita¹⁶³. A compressão das barreiras com subfase de acefato ou diuron sem a presença de lipídios na interface ar/água (Figura 20-A, *inset*) indica que os pesticidas não possuem atividade superficial. Na presença de acefato (linha tracejada em verde), a isoterma π -A sofre um deslocamento de $9 \text{ \AA}^2$ para maiores áreas moleculares, similar ao ocorrido com a curva referente à monocamada na presença de diuron ($7 \text{ \AA}^2$ para maiores áreas moleculares). Tal deslocamento indica que as moléculas dos pesticidas se encontram próximas às cabeças dos lipídios, na interface ar/água, como descrito por Lemma *et al.*⁶⁰ para monocamadas binárias de DOPC/SM na presença do pesticida picloram. Na presença do coquetel Ace/Diu, um deslocamento similar ao ocorrido para os sistemas com os pesticidas isolados é observado ($7 \text{ \AA}^2$). Para além do deslocamento, um aumento da pressão de colapso da monocamada em $\sim 2 \text{ mN/m}$ é notado quando na presença do coquetel. Połec *et al.*⁵⁸, em estudos de monocamadas compostas por POPE/POPG (3/1), POPE/POPG (1/3) e POPC/POPG/TOCL (72,6%/15,8%/11,6%) na presença de terpenos na subfase, atribui o aumento da pressão de colapso da monocamada à maior estabilidade da mesma. A Figura A1, presente no Apêndice A, mostra o experimento de relaxação da monocamada, mantendo a pressão constante e analisando a mudança de área molecular média com o tempo. Essa técnica permite inferir a estabilidade dos filmes lipídicos, porém os resultados não apresentaram reprodutibilidade entre si, dificultando a análise.

Em relação ao módulo de compressibilidade (Figura 20-B), a monocamada ternária possui um valor de 144 ± 10 mN/m em relação à pressão de superfície de 30 mN/m. Como descrito por Davies e Rideal⁷⁶ e Gew e Misran⁷⁷, diferentes intervalos de valores do C_s^{-1} indicam diferentes fases da monocamada, no qual de 10 à 50 mN/m corresponde à fase líquido-expandida (LE); de 50 à 100 mN/m, fase líquida (L); de 100 à 250, líquido-condensada (LC); e, por fim, acima de 250 mN/m, se tem a fase sólida (S). Portanto, a monocamada composta por POPC/Col/SM se encontra na fase LC quando em subfase de água ultrapura. Já em subfases de acefato ou diuron, os valores diminuem para 101 ± 9 e 119 ± 8 mN/m, respectivamente, e para a subfase do coquetel, diminui para 113 ± 13 mN/m. Essas diminuições dos valores de C_s^{-1} sugerem que, na presença dos pesticidas e de sua mistura, o empacotamento da monocamada diminui, aumentando sua elasticidade, como descrito por Felsztyna *et al.*¹⁰⁷ para monocamadas de DPPC na presença de fipronil. Apesar dessa mudança, a monocamada ternária se encontra na fase LC para todos os casos.

A fim de averiguar a semelhança entre as isotermas π -A da mistura ternária nas quatro subfases, foi plotada a projeção IDMAP (Figura 21), na qual cada isoterma π -A é transformada em um ponto em um plano 2D, sendo a proximidade desses pontos ligada à semelhança entre as curvas^{164–166}. Cada *cluster* possui 3 pontos uma vez que para cada experimento as isotermas π -A foram obtidas em triplicata. Foram utilizadas as áreas referentes às pressões de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mN/m de cada isoterma π -A para a projeção.

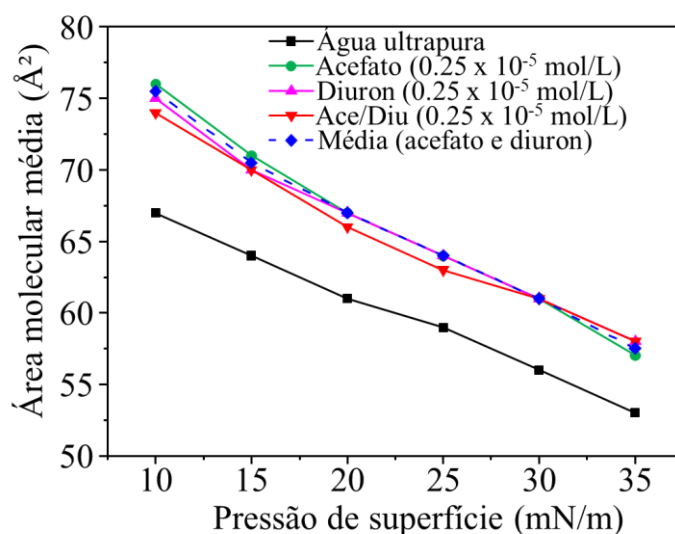
Figura 21 - projeção IDMAP referente às isotermas π -A da monocamada ternária composta por POPC/Col/SM (7/2/1) em subfase de água ultrapura (*cluster* azul escuro); acefato (*cluster* azul claro); diuron (*cluster* verde); e coquetel Ace/Diu (cluster vermelho). As distâncias são representadas pelas linhas pontilhadas com os valores em pixel, calculados por meio do software ImageJ. *Inset*: triplicatas das isotermas π -A obtidas para a monocamada ternária nas distintas subfases.



A projeção IDMAP (Figura 21) confirma a diferença entre as monocamadas ternárias na ausência e na presença dos pesticidas, uma vez que o *cluster* referente à subfase de água ultrapura encontra-se distante daqueles referentes à presença de acefato (1257 px), diuron (1156 px) ou coquetel Ace/Diu (1117 px). Já para as distâncias entre os centros dos *clusters* referentes às monocamadas na presença dos analitos, tem-se que a mistura se distancia do diuron em 126 px e do acefato em 220 px, enquanto o acefato se distancia do diuron em 111 px. A dispersão dos pontos dentro de um mesmo *cluster* pode ser atribuída a uma certa irreprodutibilidade das isotermas π -A na região próxima do colapso. Os dados de projeção e de isotermas π -A (Figura 20) não indicam sinergia na interação com a monocamada em termos de deslocamento ou perfil, uma vez que a distância entre os *clusters* do sistema com coquetel é similar aos valores das distâncias

dos pesticidas isolados. Rubira *et al.*¹⁶⁷ reportam resultado similar para isothermas de POPC na ausência e presença dos pesticidas imazapic e metil paration. Em termos farmacêuticos, quando uma mistura de moléculas gera um efeito equivalente à soma dos mesmos observados separadamente, temos o chamado efeito aditivo, que contrasta com o sinérgico e com o antagônico^{35,36,168}. Portanto, os dados de projeção e de isothermas π -A (Figura 20) indicam efeito aditivo entre o coquetel e a monocamada ternária, uma vez que seu deslocamento nas isothermas equivale aproximadamente a soma dos efeitos do acefato e diuron separadamente, e a distância entre os clusters da monocamada na presença dos pesticidas isolados (onde há sobreposição) e seu coquetel são mínimas. Outro método possível para se constatar o tipo de efeito do coquetel na monocamada é através do gráfico de mudança de área molecular média, reportado por Maximino *et al.*¹⁶⁹. Nesse caso os valores das áreas moleculares para diferentes valores de pressão de superfície para a monocamada ternária na presença dos analitos individualmente e seu coquetel são comparados à média calculada a partir dos valores de área para a monocamada ternária na presença dos analitos individualmente (Figura 22).

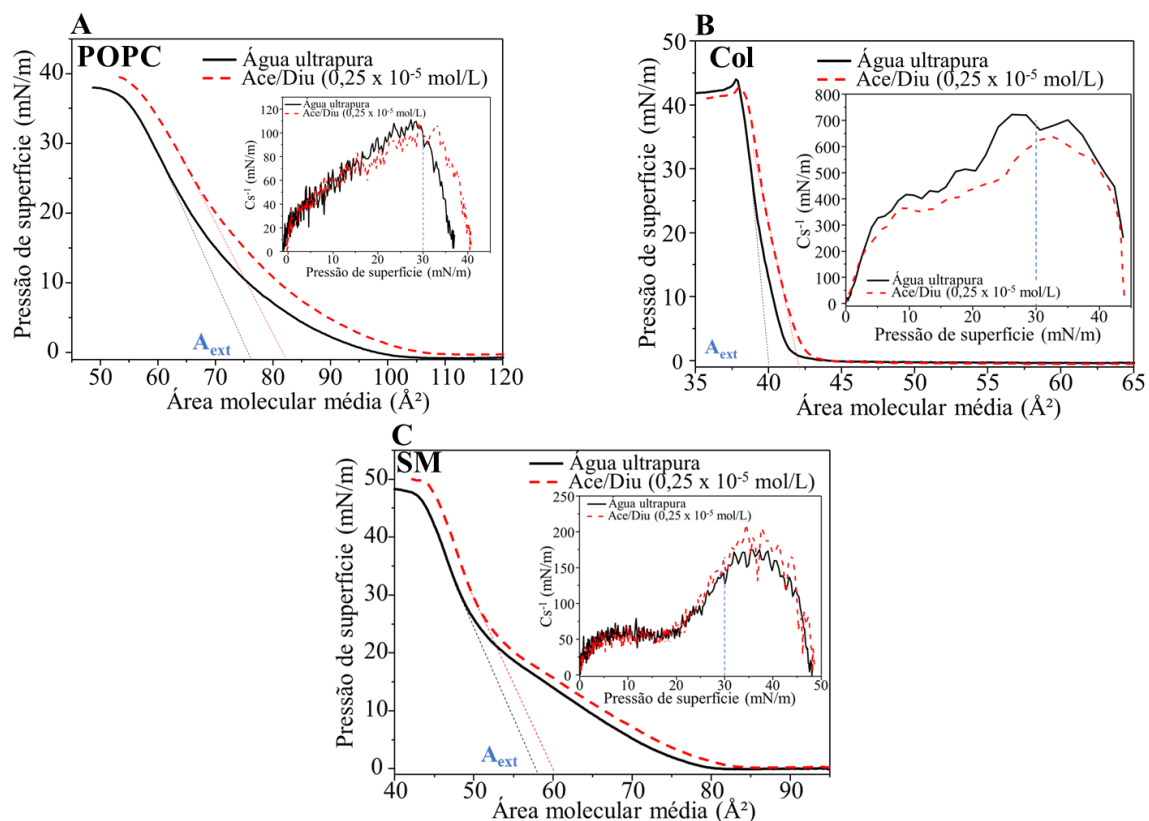
Figura 22 - mudanças na área molecular média devido à presença de acefato (curva verde); diuron (curva magenta); coquetel (curva vermelha). Em azul: média calculada para os valores de área obtidos para as monocamadas na presença de acefato ou diuron na subfase.



É possível notar, na Figura 22, que ambas as subfases com acefato ou diuron possuem valores similares de área ocupada por molécula entre as pressões de 10 e 35 mN/m. A curva referente ao coquetel, em vermelho, é similar à curva referente à média para os sistemas com os pesticidas isolados, em azul. Essa semelhança indica que o coquetel possui efeito aditivo, sendo a soma dos efeitos dos dois pesticidas, reforçando o resultado obtido pelo IDMAP. Para complementar esses resultados, foram realizados os estudos de espectroscopia no infravermelho das monocamadas, descritos na seção seguinte.

A fim de comparar o papel de cada lipídio presente na monocamada ternária na interação com o coquetel Ace/Diu, isothermas π -A de POPC, Col ou SM foram analisadas na ausência e na presença da mistura dos pesticidas, como mostra a Figura 23.

Figura 23 - isothermas π -A de (A) POPC; (B) Col; (C) SM na ausência (em preto) e presença do coquetel Ace/Diu (tracejado - vermelho). Os *insets* representam os módulos de compressibilidade (C_s^{-1}) das isothermas π -A, destacando o ponto referente à 30 mN/m.



Todas as isothermas π -A na Figura 23 referentes às monocamadas em água ultrapura correspondem, em perfil, às encontradas na literatura^{166,170,171}. Na presença do coquetel, a isoterma π -A de POPC (Figura 23-A) é deslocada, considerando a A_{ext} , 7 $\text{\AA}^2$ para maiores áreas moleculares (de $76 \pm 2 \text{\AA}^2$ em água ultrapura para $83 \pm 2 \text{\AA}^2$ em subfase da mistura dos pesticidas). Esse deslocamento é mantido até o fim da compressão, indicando que os poluentes se encontram na interface ar/água, próximos às cabeças dos lipídios, como para a monocamada ternária. Além disso, um aumento de ~ 2 mN/m ocorre na pressão de colapso quando na presença dos analitos, indicando um aumento na

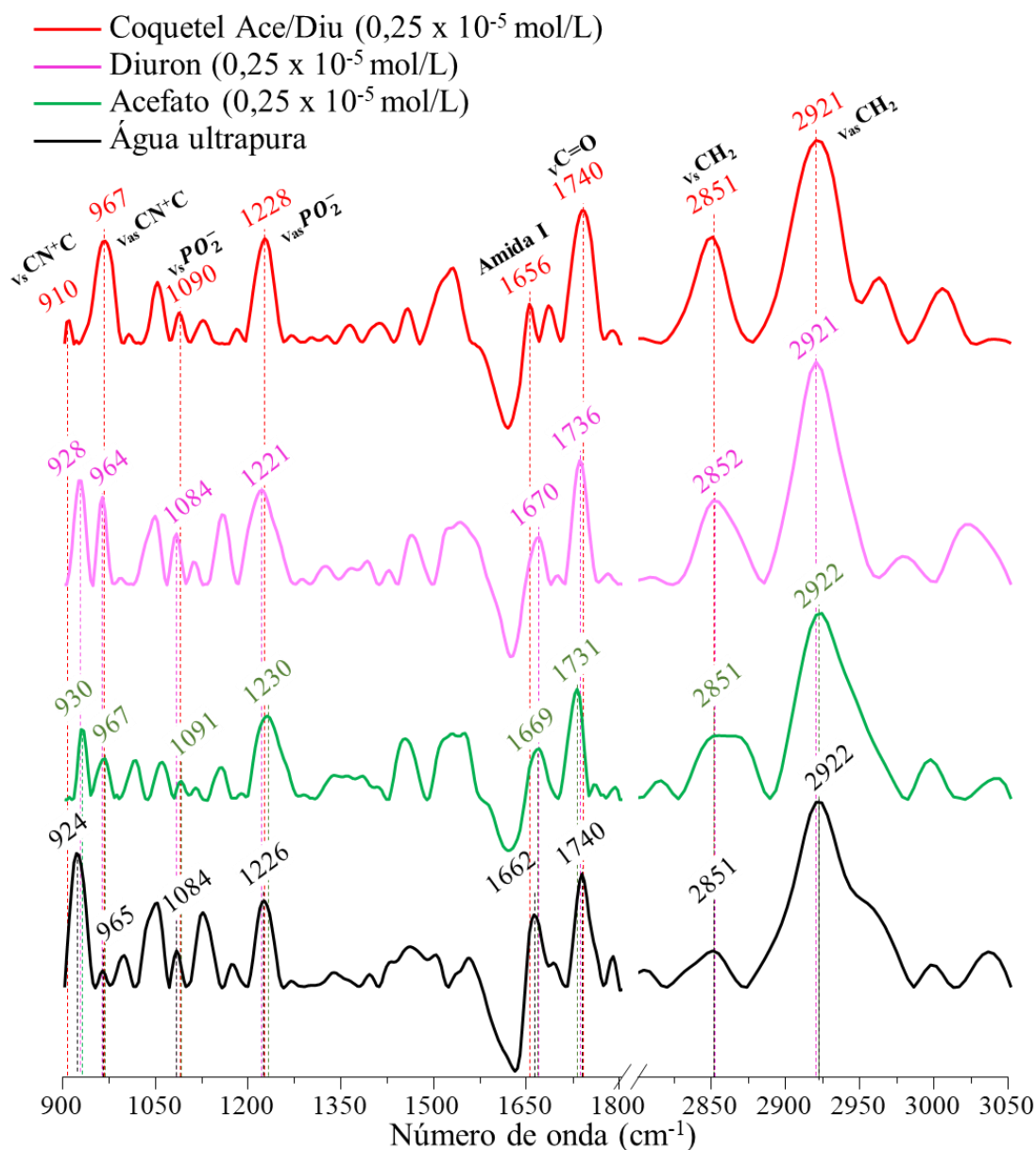
estabilidade do filme, como sugerem Rodriguez *et al.*¹⁷² para monocamadas formadas de um único tipo de molécula. Em relação às monocamadas de Col e SM, não houve deslocamentos expressivos referentes à A_{ext} nas isotermas dos filmes na presença do coquetel, aumentando de $40,0 \pm 0,2$ para $42 \pm 2 \text{ \AA}^2$ e de $58,0 \pm 0,4$ para $60 \pm 1 \text{ \AA}^2$ (aumento de $2 \text{ \AA}^2$ para ambas), respectivamente. A similaridade dos deslocamentos da isotermas ternária (Figura 20) e da isoterma de POPC (Figura 23-A) na presença do coquetel é esperada devido à maior proporção do fosfolipídio na mistura lipídica ternária (70 % em mol).

Já com relação ao módulo de compressibilidade dos lipídios (*insets*), nota-se que o valor obtido para o POPC em água ultrapura referente à pressão de 30 mN/m ($101 \pm 7 \text{ mN/m}$) é próximo aos valores reportados na literatura¹⁷³, encontrando-se na fase LE. Nota-se que monocamada ternária (fase LC – Figura 20-B) possui menor elasticidade que a monocamada de POPC, uma vez que a presença de Col e SM há um maior empacotamento do filme. Não houve mudança significativa do valor para o POPC quando em subfase com coquetel ($97 \pm 6 \text{ mN/m}$), indicando que sua elasticidade não é afetada pela presença dos pesticidas. Para a monocamada de Col e de SM, os valores de C_s^{-1} referentes à água ultrapura são de 664 ± 24 e $136 \pm 3 \text{ mN/m}$, respectivamente, condizente com a literatura¹⁷⁴. Esses valores mudam quando analisados para os filmes em subfase de coquetel, diminuindo para $616 \pm 47 \text{ mN/m}$ no caso do Col, e aumentando para $151 \pm 2 \text{ mN/m}$ para a SM, indicando um aumento da elasticidade (diminuição do empacotamento) para o estero e diminuição da elasticidade (aumento do empacotamento) para o esfingolipídio¹⁷⁵. Apesar disso, as variações não foram suficientes para mudar as fases de ambos os lipídios, permanecendo das fases S (Col) e LC (SM).

5.2 PM-IRRAS das monocamadas de POPC/Col/SM e suas componentes

Os resultados de isotermas π -A discutidos na seção anterior indicam que, para a monocamada de POPC/Col/SM (7/2/1), o coquetel interage de forma aditiva em relação aos pesticidas acefato e diuron isolados. Além disso, foi constatado que a monocamada de POPC é afetada similarmente ao filme ternário, indicando que este lipídio governa os efeitos vistos na mistura lipídica, apesar de se encontrarem em fases distintas (POPC – fase LE; monocamada ternária – fase LC). Portanto, a fim de investigar os efeitos em nível molecular dos pesticidas acefato, diuron e seu coquetel nas monocamadas ternárias ou compostas pelos lipídios isolados, foram obtidos espectros PM-IRRAS de cada sistema. A Figura 24 apresenta os espectros PM-IRRAS da monocamada composta por POPC/Col/SM em subfase de água ultrapura (linha preta), acefato (linha verde), diuron (linha magenta) e coquetel Ace/Diu (linha vermelha). Cada valor destacado representa uma vibração de uma ligação específica, também indicada na figura.

Figura 24 - espectros PM-IRRAS da monocamada ternária composta por POPC/Col/SM (70/20/10 mol%) representando a região das cabeças polares (900-1800 cm^{-1}) e da região das cadeias de hidrocarboneto (2800-3000 cm^{-1}) em subfases de água ultrapura (linha preta), acefato (linha verde), diuron (linha magenta) e coquetel Ace/Diu (linha vermelha).



Inicialmente, observa-se que, na região da cabeça polar (900-1800 cm^{-1}) para a monocamada em água ultrapura (linha preta), as seguintes bandas podem ser consideradas: estiramentos simétrico ($\nu_s \text{CN}^+\text{C}$) e assimétrico do grupo colina ($\nu_{as} \text{CN}^+\text{C}$), em 924 e 965 cm^{-1} , respectivamente; estiramentos simétrico ($\nu_s \text{PO}_2^-$) e assimétrico do

grupo fosfato ($\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$) em 1084 e 1226 cm^{-1} , respectivamente; amida I em 1662 cm^{-1} ; e estiramento do grupo carbonila ($\nu\text{C=O}$) em 1740 cm^{-1} . Já com relação às cadeias de hidrocarbonetos, nota-se as bandas referentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo CH_2 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ em 2851 cm^{-1} e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ em 2922 cm^{-1} , respectivamente). A fim de comparar os valores obtidos em água ultrapura e os obtidos na presença dos analitos, a Tabela 1 contempla os valores de cada vibração para cada subfase.

Tabela 1: modos vibracionais observados nos espectros PM-IRRAS da monocamada ternária em subfases de água ultrapura, acefato, diuron e coquetel Ace/Diu

Modos vibracionais	Números de onda nas respectivas subfases			
	Água ultrapura (cm^{-1})	Acefato (cm^{-1})	Diuron (cm^{-1})	Coquetel Ace/Diu (cm^{-1})
$\nu_{\text{s}}\text{CN}^+\text{C}$	924	930	928	910
$\nu_{\text{as}}\text{CN}^+\text{C}$	965	967	964	967
$\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$	1084	1091	1084	1090
$\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$	1226	1230	1221	1228
amida I	1662	1669	1670	1656
$\nu\text{C=O}$	1740	1731	1736	1740
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	2851	2851	2852	2851
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	2922	2922	2921	2921

Inicialmente, observam-se deslocamentos referentes ao módulo de vibração $\nu_{\text{s}}\text{CN}^+\text{C}$ (924 cm^{-1} em água ultrapura) na presença de acefato e diuron (6 e 4 cm^{-1} para maiores valores, respectivamente). Zawisza *et al.*¹⁷⁶ sugerem que a posição da banda do grupo indica a conformação da estrutura O-C-C-N: a banda centrada em $\sim 930 \text{ cm}^{-1}$ sugere conformação *trans*, enquanto quando centrada em $\sim 910 \text{ cm}^{-1}$, conformação *gauche*. Ou seja, na presença de acefato ou diuron, o grupo permanece na conformação *trans*, assim como em subfase em água ultrapura. Já na presença do coquetel, a posição da banda relacionada ao $\nu_{\text{s}}\text{CN}^+\text{C}$ (910 cm^{-1} , 14 cm^{-1} para menores valores em relação à subfase de

água ultrapura) sugere que a estrutura O-C-C-N, diferentemente do observado para as outras subfases, possui conformação *gauche*.

Uma mudança expressiva ocorre nas intensidades relativas (IR) entre as bandas de estiramento simétrico e antissimétrico do grupo colina ($\nu_{s}CN+C$ e $\nu_{as}CN+C$, respectivamente). Para a monocamada em água ultrapura, o valor da IR é de 8,28, enquanto para as monocamadas em subfase de acefato ou diuron, os valores são de 1,76 e 1,17, respectivamente. Tal mudança na intensidade da banda $\nu_{as}CN+C$ está associada à orientação do grupo colina¹⁷⁷, que em água ultrapura é orientado menos perpendicular à interface ar/água¹⁷⁸. Além disso, nota-se, para a monocamada na presença do coquetel, uma inversão das bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo colina, refletindo em uma diminuição significativa da IR (de 8,28 em água ultrapura para 0,22 na subfase de coquetel), indicando uma verticalização do grupo em relação ao plano da interface ar/água.

Essas mudanças indicam uma possível interação eletrostática via íon-dipolo entre o grupo colina positivo da monocamada ternária com os pesticidas, como visto em um trabalho anterior entre cabeças catiônicas dos lipídios DPPC, DODAB e DPTAP e o acefato¹⁷⁹. Como na presença da mistura Ace/Diu ambas as mudanças ocorreram (orientação e conformação), podemos assumir que, apesar dos resultados das isotermas indicarem efeito aditivo, o coquetel tem um efeito sinérgico na monocamada quando analisada em nível molecular. Tais mudanças são representadas na Figura 28, ao final da discussão das interações lipídio/pesticidas realizadas por meio de modelagem molecular.

Em relação à banda referente ao estiramento simétrico do grupo fosfato ($\nu_{s}PO_2^-$), deslocamentos para maiores comprimentos de onda ocorrem somente para a monocamada ternária em subfase de acefato (1091 cm^{-1} , 7 cm^{-1} maior que em água ultrapura) e em subfase de coquetel (1090 cm^{-1} , 6 cm^{-1} maior). Já em relação ao estiramento assimétrico

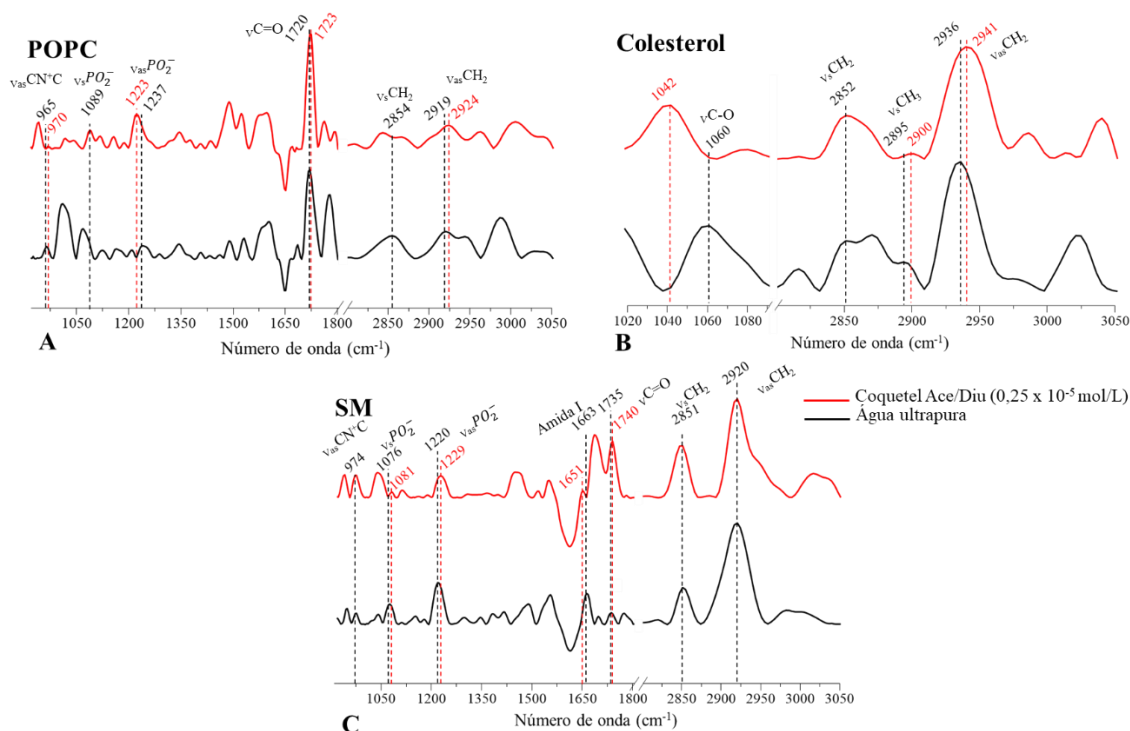
deste grupo ($_{\text{vas}}\text{PO}_2^-$), observa-se um deslocamento de 4 cm^{-1} para maiores números de onda na subfase de acefato (de 1226 para 1230 cm^{-1}), enquanto um deslocamento de 5 cm^{-1} para números de onda menores é observado na presença de diuron (de 1226 para 1221 cm^{-1}). Segundo Zaborowska *et al.*¹⁸⁰ e Ruiz *et al.*¹⁸¹, deslocamentos dessa banda sugerem alterações da hidratação do grupo PO_2 da cabeça dos lipídios: para maiores valores há a diminuição da hidratação (menos exposição do grupo a moléculas de água), enquanto deslocamentos para menores valores indicam o aumento da hidratação do grupo (maior exposição do grupo a moléculas de água). Portanto, os resultados de PM-IRRAS indicam a diminuição da hidratação do grupo PO_2 na presença de acefato e um aumento da hidratação desse grupo na subfase de diuron. No entanto, na subfase do coquetel, não foi observada mudança significativa na posição dessa banda. Nesse contexto, uma vez que a diminuição do empacotamento da monocamada na presença dos analitos conduziriam para uma maior hidratação do grupo fosfato¹⁸⁰, a desidratação observada na presença do acefato indica que as moléculas do pesticida estão rodeando este grupo, diminuindo seu contado com os átomos de H da subfase¹⁸². Já com relação à IR entre as bandas referentes ao estiramento simétrico do fosfato e o estiramento do grupo glicerol ($\nu\text{C-O}$), tanto os pesticidas isolados quanto sua mistura afetam essa região. Tal interação é justificada pelas mudanças dos valores, que variam de $0,32$ em água ultrapura para $0,16$ na presença de acefato, $0,41$ na presença de diuron e $0,23$ na presença do coquetel. Ceridório *et al.*¹⁸³ atribuem a mudança da intensidade da banda de fosfato (aqui apresentada pelas diferença de IR) à incorporação do analito na região da cabeça polar, o que está de acordo com os espectros da Figura 24. Um efeito semelhante é observado para a banda de amida-I (presente nas moléculas de SM), já que a IR entre as bandas desse grupo e do fosfato simétrico diminui de $0,67$ em água ultrapura para $0,48$ (acefato), $0,38$ (diuron) e $0,29$ (coquetel). Além disso, há um deslocamento dessa banda para maiores

números de onda para as monocamadas na presença de acefato e de diuron (7 e 8 cm^{-1} , respectivamente) e para valores menores na presença do coquetel (8 cm^{-1}). Assim como visto para o grupo fosfato, o deslocamento dessa banda está associado à formação de ligações de hidrogênio na região, em que o deslocamento para números de onda maiores ou menores indica um aumento ou diminuição da hidratação da amida, respectivamente^{81,184}. Portanto, na presença de pesticidas isolados, pode-se observar desidratação, enquanto na subfase do coquetel, houve um aumento da hidratação do grupo amida I dos lipídios, indicando que na presença de acefato e diuron esse grupo fica menos exposto à subfase, enquanto o contrário ocorre na presença da mistura dos pesticidas.

Considerando os espectros da região da cadeia de hidrocarbonetos (2800-3000 cm^{-1}), é possível notar mudanças na IR entra as bandas referentes às vibrações simétricas e assimétricas do CH_2 ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) para a monocamada ternária na presença dos pesticidas isolados e de seu coquetel. As IRs referentes aos espectros do filme em subfase de acefato e diuron aumentam de 0,20 (água ultrapura) para 0,34 e 0,38, respectivamente, enquanto na presença do coquetel, o valor aumenta para 0,52. Snyder *et al.*⁸³ e Geraldo *et al.*⁸⁴ reporta que diminuições ou aumentos dos valores da IR indicam aumento ou diminuição do ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios, respectivamente. Portanto, para todos os casos, há uma diminuição na ordenação das cadeias, sendo esse efeito mais proeminente nas monocamadas na presença da mistura Ace/Diu, reforçando que o coquetel exibe um efeito sinérgico no filme lipídico em termos de interação em nível molecular.

A fim de comparar os resultados de espectroscopia PM-IRRAS da monocamada composta de POPC/Col/SM (7/2/1), espectros dos lipídios isolados foram obtidos na ausência (em preto) e presença (curvas vermelhas) do coquetel Ace/Diu (Figura 25).

Figura 25 - espectros PM-IRRAS de monocamadas de (A) POPC; (B) colesterol; e (C) esfingomieline em subfase de água ultrapura (curvas pretas) e em subfase do coquetel Ace/Diu (curva vermelha), representando a região das cabeças polares (900-1800 cm^{-1}) e da região das cadeias de hidrocarboneto (2800-3000 cm^{-1}).



Em relação aos espectros do lipídio POPC em água ultrapura (Figura 25-A), as bandas de cada modo vibracional condizem com os encontrados na literatura, sendo eles: $\nu_{\text{as}}\text{CN}^+\text{C}$ em 965 cm^{-1} ; $\nu_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ e $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ em 1089 e 1237 cm^{-1} ; $\nu\text{C=O}$ em 1720 cm^{-1} ; e $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ em 2854 e 2919 cm^{-1} , respectivamente¹⁸⁵. No que se refere aos grupos presentes na cabeça polar do lipídio na presença do coquetel (900-1800 cm^{-1}), observa-se um deslocamento da banda do grupo colina para maiores números de onda (de 965 para 970 cm^{-1} na presença do coquetel), indicando uma interação íon-dipolo entre o grupo polar da cabeça lipídica e as moléculas do pesticida. Além disso, a banda referente ao $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ apresenta, na presença dos pesticidas, um deslocamento de 14 cm^{-1} para menores valores (1223 cm^{-1}), indicando assim a hidratação deste grupo¹⁸⁶, sugerindo que o grupo está mais exposto à subfase. Já a banda referente a $\nu\text{C=O}$ não apresentou mudanças significativas, deslocando de 1720 cm^{-1} em água ultrapura para 1723 cm^{-1} na presença da

mistura Ace/Diu. Já com relação às bandas referentes às vibrações das cadeias de hidrocarbonetos, uma diminuição de 0,15 da RI das bandas $\nu_s\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_2$ (de 0,83 para 0,68 em subfases de água ultrapura e coquetel Ace/Diu, respectivamente) é observada, revelando que a presença dos pesticidas na subfase aumenta o ordenamento das cadeias alquílicas. Esses resultados mostram que o coquetel interage eletrostaticamente via íon-dipolo com os grupos colina e fosfato do POPC, afetando, assim, a ordem das cadeias presentes na calda das moléculas, similarmente ao ocorrido com as monocamadas ternárias.

Referente ao espectro do colesterol em água ultrapura (Figura 25-B), na região onde seria específica da cabeça dos lipídios, há apenas uma banda localizada em 1060 cm^{-1} , referente ao estiramento $\nu\text{C-O}^{187}$, sendo deslocada para 1042 cm^{-1} na presença do coquetel (18 cm^{-1} para menores valores). Arima *et al.*¹⁸⁷ atribui o deslocamento da banda para menores números de onda ao maior distanciamento entre as moléculas de colesterol, revelando também o aumento da hidratação do grupo, o que se é esperado uma vez que há um menor empacotamento da monocamada na presença do coquetel. Já o espectro referente à monocamada de esfingomielina (Figura 25-C) em água ultrapura possui as seguintes bandas, encontradas na literatura: $\nu_{as}\text{CN}^+\text{C}$ em 974 cm^{-1} ; $\nu_s\text{PO}_2^-$ e $\nu_{as}\text{PO}_2^-$ em 1076 e 1220 cm^{-1} ; amida I em 1663 cm^{-1} ; $\nu\text{C=O}$ em 1735 cm^{-1} ; e $\nu_s\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_2$ em 2851 e 2920 cm^{-1} , respectivamente¹⁸⁸. Na presença do coquetel, as bandas referentes ao $\nu_s\text{PO}_2^-$ e ao $\nu_{as}\text{PO}_2^-$ deslocam para maiores números de onda (1081 e 1229 cm^{-1} , respectivamente). Esse deslocamento revela uma desidratação do grupo fosfato na presença dos pesticidas. Além disso, a banda da amida I desloca de 1663 para 1651 cm^{-1} , indicando uma diminuição na hidratação deste grupo, como o ocorrido com a monocamada ternária na presença do coquetel. Tais resultados sugerem que os pesticidas se encontram rodeando o grupo fosfato, enquanto deixam o grupo amida mais exposto à

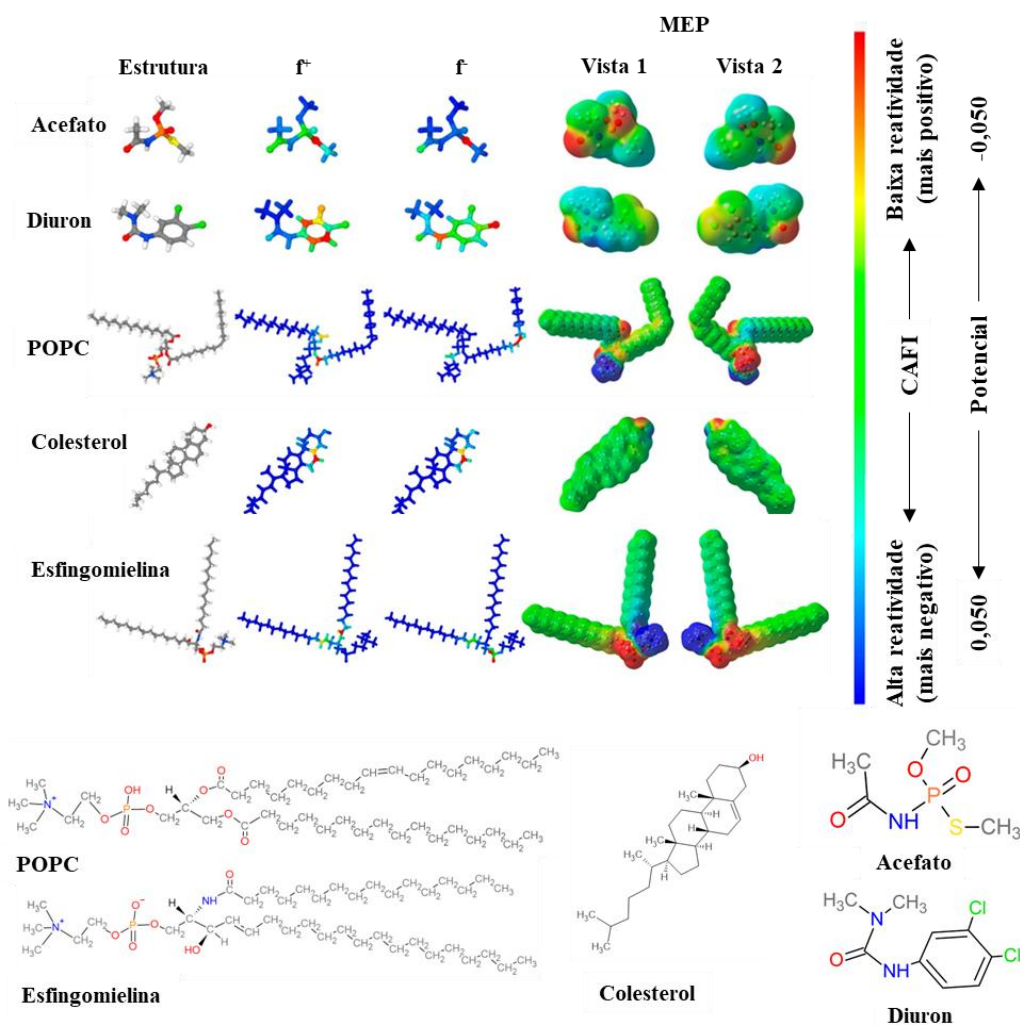
subfase. Quanto ao IR entre as bandas do estiramento simétrico e assimétrico de CH₂, observa-se a diminuição do ordenamento da cadeia alquílica, uma vez que há um aumento no valor na presença do coquetel (de 0,70 em água ultrapura para 1,03 em subfase de coquetel).

Em geral, os dados de PM-IRRAS dos lipídios isolados corroboram os espectros da monocamada ternária, já que o coquetel afeta principalmente a região polar da cabeça do POPC e do SM, assim como o filme ternário. Além disso, para a monocamada ternária, apesar de as isotermas π -A não mostrarem diferenças na interação entre os pesticidas isolados ou em coquetel, os espectros de PM-IRRAS mostram uma maior interação principalmente com o grupo colina presente na cabeça do lipídio, indicando que a mistura dos pesticidas tem um efeito sinérgico sobre a monocamada.

5.3 Cálculos teóricos e modelagem molecular

A fim de confirmar os grupos das moléculas que atuam na interação pesticida/lipídios e determinar a reatividade local dos sistemas isolados ou adsorvidos, cálculos de DFT foram realizados para os pesticidas acefato e diuron, e para os lipídios POPC, esfingomiéline e colesterol. Os cálculos foram realizados pelo Prof. Augusto Bagatin-Neto (Unesp – Itapeva) e pelo Dr. Orisson Ponce Gomes (Unesp – Bauru). Os mapas coloridos que ilustram os descritores CAFI e MEP de POPC (maior componente da monocamada ternária), Col e SM, acefato, diuron, são mostrados na Figura 26. As regiões vermelhas indicam os sítios mais reativos e carregados negativamente para CAFI e MEP, respectivamente, enquanto as regiões azuis representam sítios menos reativos e carregados positivamente.

Figura 26 - mapas da reatividade local e MEP dos componentes acefato, diuron e POPC, SM e Col. Os mapas evidenciam os sítios reativos em relação a agentes externos nucleófilos (f^+) e eletrófilos (f^-). Para auxiliar a visualização, as estruturas exibindo potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) foram rotacionadas (vista 1 e vista 2). Abaixo encontram-se as estruturas de cada molécula com os respectivos átomos nas cores correspondentes ao MEP: *cinza: carbono; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; laranja: fósforo; azul: nitrogênio; e verde: cloro. O hidrogênio, representado em preto nas estruturas moleculares, corresponde ao átomo branco nas imagens de MEP.*

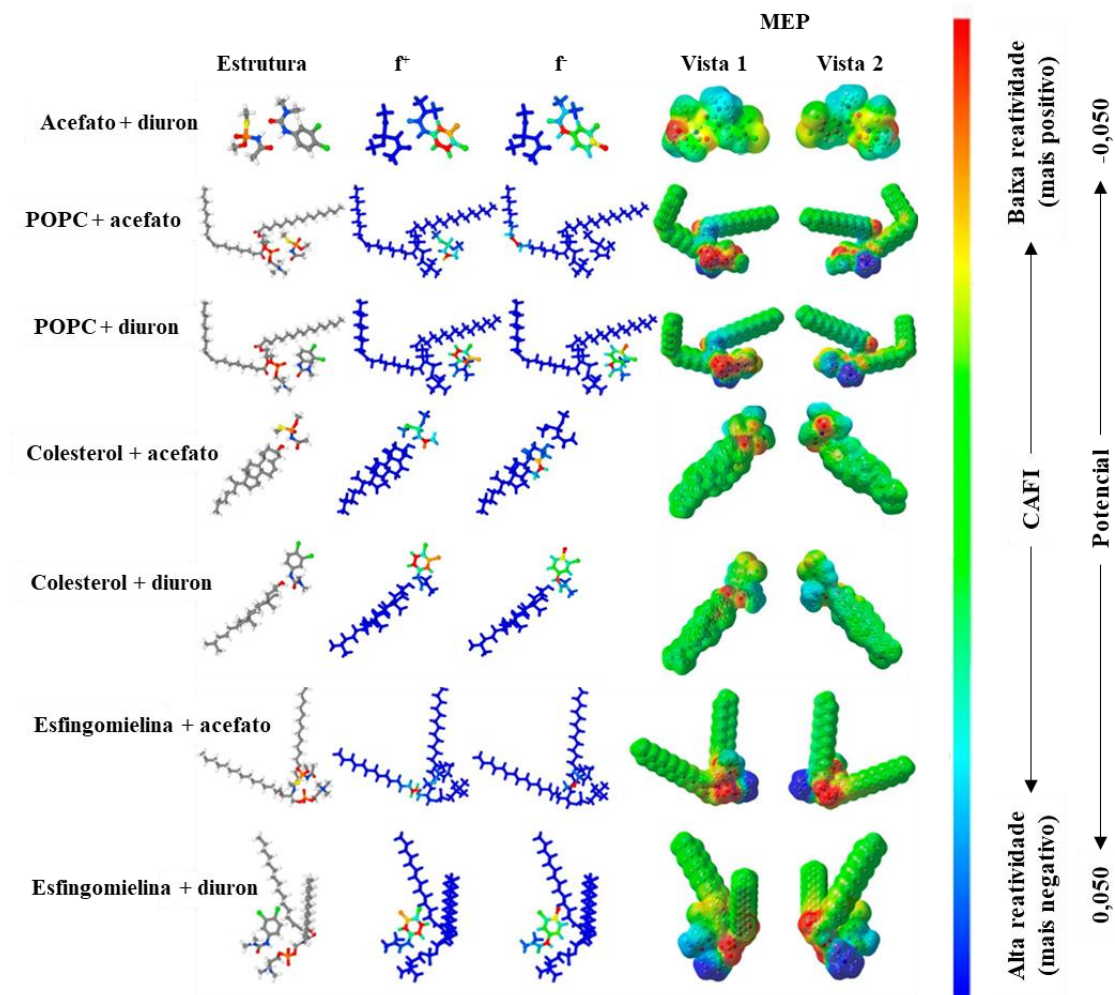


Após a otimização geométrica dos lipídios, as cadeias de hidrocarboneto presentes no POPC e na SM apresentaram uma estruturação aberta, uma vez que não foram impostas restrições de outras moléculas ao lado das mesmas nos cálculos. Além disso, há uma curvatura em uma das caudas, evidenciando a dupla ligação presente nas cadeias de

hidrocarboneto do POPC. Os mapas de CAFE e MEP mostram que o acefato possui duas regiões ricas em elétrons: uma em torno do átomo de oxigênio (O) ligado ao fósforo (P) e outra ao átomo de O ligado ao grupo carbonil. Já o diuron apresenta apenas uma região rica em elétrons (grupo carbonil). Para ambos os pesticidas, as cargas positivas estão localizadas predominantemente nos átomos de hidrogênio (H) presentes nos grupos NH e CH₃. A presença de potencial negativo concentrado nos átomos de oxigênio pode facilitar interações com estruturas positivamente carregadas, como o grupo colina das cabeças de POPC e SM. Esses resultados reforçam os observados nos espectros PM-IRRAS (Figura 24), já que ambos os pesticidas e seu coquetel interagem com a colina (cabeça positiva) da monocamada ternária. Além disso, o coquetel também interage com o mesmo grupo na monocamada formada por moléculas individuais de POPC (Figura 25).

Com base nas estruturas de DFT, foram calculados o CAFE, MEP e as energias de adsorção para os sistemas pesticida + POPC, pesticida + SM ou pesticida + Col, presentes na Figura 27. As estruturas foram modeladas alinhando as regiões negativas e positivas dos pesticidas com os lipídios.

Figura 27 - mapas da reatividade local e MEP dos sistemas alinhados acefato + diuron; POPC + pesticidas, Col + pesticidas e SM + pesticidas. Os mapas evidenciam os sítios reativos em relação a agentes externos nucleófilos (f^+) e eletrófilos (f^-). Para auxiliar a visualização, as estruturas exibindo potenciais eletrostáticos moleculares (MEPs) foram rotacionadas (vista 1 e vista 2).



Os resultados de CAFI e MEP, também apresentados na Figura 27, e os resultados de adsorção, apresentados na Tabela 2, mostram que ambos os pesticidas alteram o balanço de cargas nas regiões da cabeça zwitteriônicas do POPC e da SM, indicando assim uma interação entre os pesticidas e essa região. Já em relação às caudas, os efeitos foram mínimos. A análise de reatividade local reforça a predominância das interações do tipo eletrostática (íon-dipolo) entre as cabeças polares e os pesticidas, como sugerido nos resultados de PM-IRRAS (Figuras 24 e 25). No sistema acefato + diuron, o acefato não

mostra reatividade em relação ao diuron, indicando que o sistema é inerte. Já nos sistemas POPC + pesticida e SM + pesticida, a reatividade é observada principalmente nos pesticidas, enquanto as cabeças zwitteriônicas permanecem inertes.

No geral, a reatividade nos sistemas de POPC e SM adsorvidos aos pesticidas está concentrada nos mesmos, exceto em f' no sistema POPC + acefato e f^+ no sistema SM + acefato (Figuras 27), onde as insaturações nas caudas mantêm alguma reatividade. Porém, uma interação nessa região é improvável devido à forte interação eletrostática entre os lipídios e os pesticidas na região das cabeças polares. Para os sistemas Col + pesticidas, a reatividade está localizada principalmente nos pesticidas, exceto em f' no sistema Col + acefato. Diferente dos outros lipídios estudados, esse esterol não possui uma porção zwitteriônica, e a região mais provável para uma interação eletrostática está no grupo -OH, mesmo grupo observado nas interações entre o Col e o coquetel nos espectros PM-IRRAS (Figura 25-B).

A interação entre as cabeças lipídicas e os pesticidas é reforçada pelos resultados de energia de adsorção apresentados na Tabela 2. Os valores revelam que as energias de adsorção dos sistemas POPC + pesticidas (-13,931 kcal/mol para o acefato e -13,675 kcal/mol para o diuron) ou SM + pesticidas (-18,043 kcal/mol para o acefato e -18,228 kcal/mol para o diuron) são, respectivamente, 15 e 50 % maiores que a energia de adsorção entre os pesticidas (-11,886 kcal/mol). Entretanto, as energias de adsorção dos sistemas Col + acefato (-7,564 kcal/mol) e Col + diuron (-7,855 kcal/mol) são mais baixas, uma vez que não há um grupo zwitteriônico na cabeça dessa molécula.

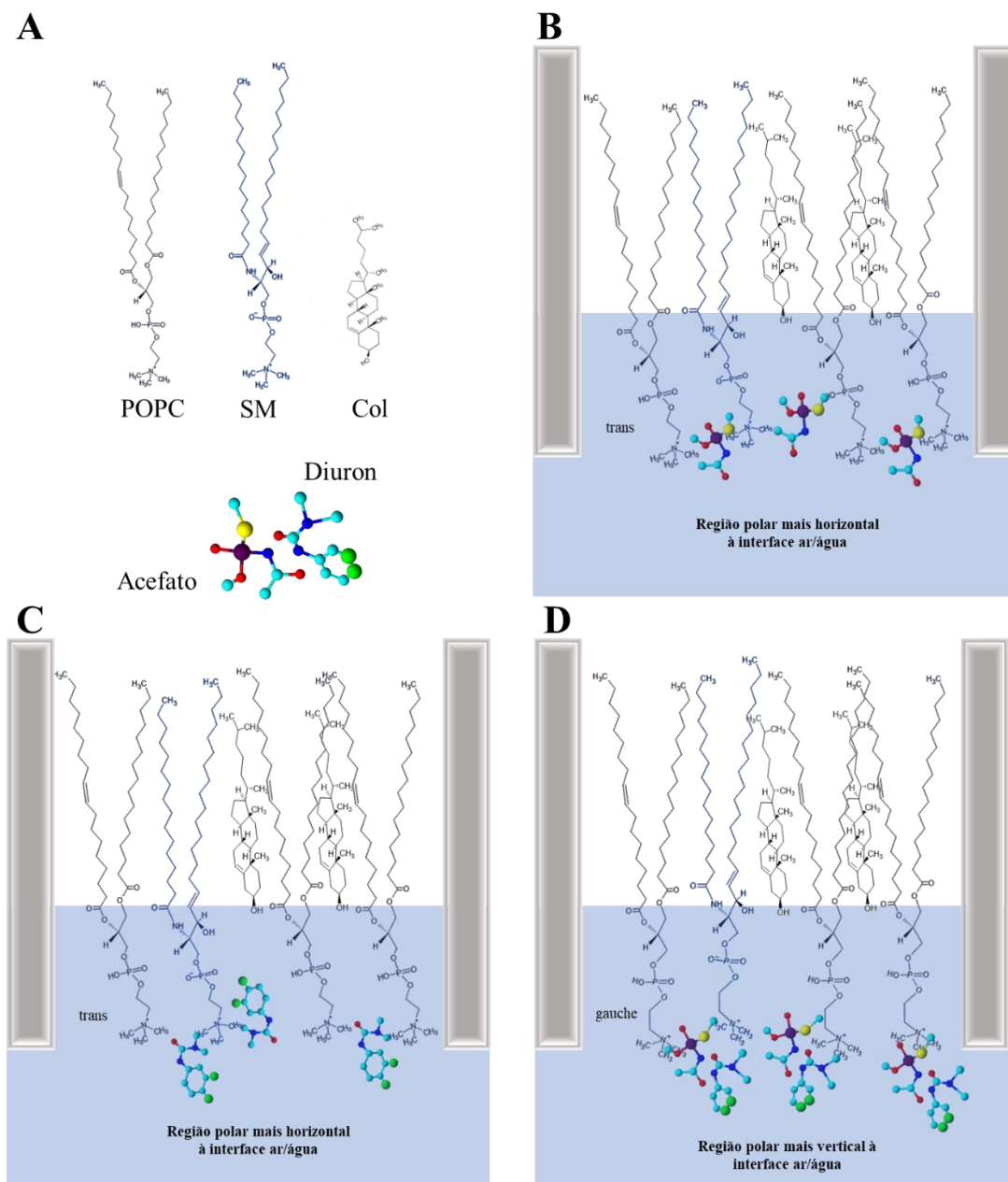
Tabela 2: energias de adsorção dos sistemas (considerando como meio a água).

Sistema	Energias de adsorção (kcal/mol)
Acefato + Diuron	-11,886
POPC + Acefato	-13,931
POPC + Diuron	-13,675
Col + Acefato	-7,564
Col + Diuron	-7,855
SM + Acefato	-18,043
SM + Diuron	-18,228

Ao analisar as diferenças de interação entre os pesticidas e os lipídios, é provável que o acefato, embora tenha energias de adsorção semelhantes ao diuron, possua maior vantagem estrutural para interagir com as regiões positivas do POPC e SM devido a duas regiões distintas ricas em elétrons, enquanto o diuron possui apenas uma. Por outro lado, o diuron é o mais reativo entre os lipídios e o acefato, com uma porção de reatividade significativa em seu anel, sugerindo que essa região poderia ser alvo de agentes químicos externos. Por fim, é possível observar que no sistema acefato+diuron, uma região rica em elétrons é mantida no oxigênio ligado ao fósforo no acefato, enquanto o diuron mantém sua reatividade. Assim, na monocamada ternária, essa região negativa do coquetel (acefato+diuron) poderia ser atraída pela colina positiva das moléculas de POPC e/ou SM por interações eletrostáticas, enquanto o anel do diuron poderia ser alvo de agentes externos. Esses resultados reforçam os dados experimentais de PM-IRRAS, uma vez que os pesticidas foram encontrados interagindo principalmente com a região da cabeça polar dos lipídios na monocamada.

A Figura 28 mostra as estruturas dos lipídios e pesticidas (A) e o esquema da monocamada ternária na presença dos pesticidas acefato (B), diuron (C) e do coquetel Ace/Diu (D), levando em conta a discussão dos resultados. Na ilustração, os pesticidas acefato e diuron estão dispostos com as regiões eletricamente negativas alinhadas ao grupo colina dos lipídios POPC e SM. É importante notar que, nesses casos, o grupo O-C-C-N possui conformação *trans*, e as cadeias de hidrocarboneto se encontram desordenadas, como já discutido anteriormente. Já para coquetel acefato+diuron, a mistura está disposta com o oxigênio ligado ao fósforo do acefato mais próximo ao grupo colina dos lipídios POPC e SM, como levantado anteriormente pelos cálculos de DFT. Além disso, as cadeias de hidrocarboneto dos dois lipídios se mostram menos ordenadas (representadas pela abertura das cadeias), e o grupo O-C-C-N possui configuração *gauche* em suas ligações. Por fim, as moléculas de Col estão localizadas com o grupo OH na interface ar/água, mais próximas às cadeias de hidrocarboneto dos outros lipídios da mistura ternária para todos os casos.

Figura 28: (A) estruturas moleculares dos lipídios e dos pesticidas; representação esquemática da monocamada de POPC/Col/SM na presença de (B) acefato; (C) diuron; e (D) coquetel Ace/Diu. Nas imagens 3D dos átomos de acefato e diuron, cada átomo é representado de cor diferente: **azul claro: carbono; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; roxo: fósforo; azul escuro: nitrogênio; e verde: cloro.**

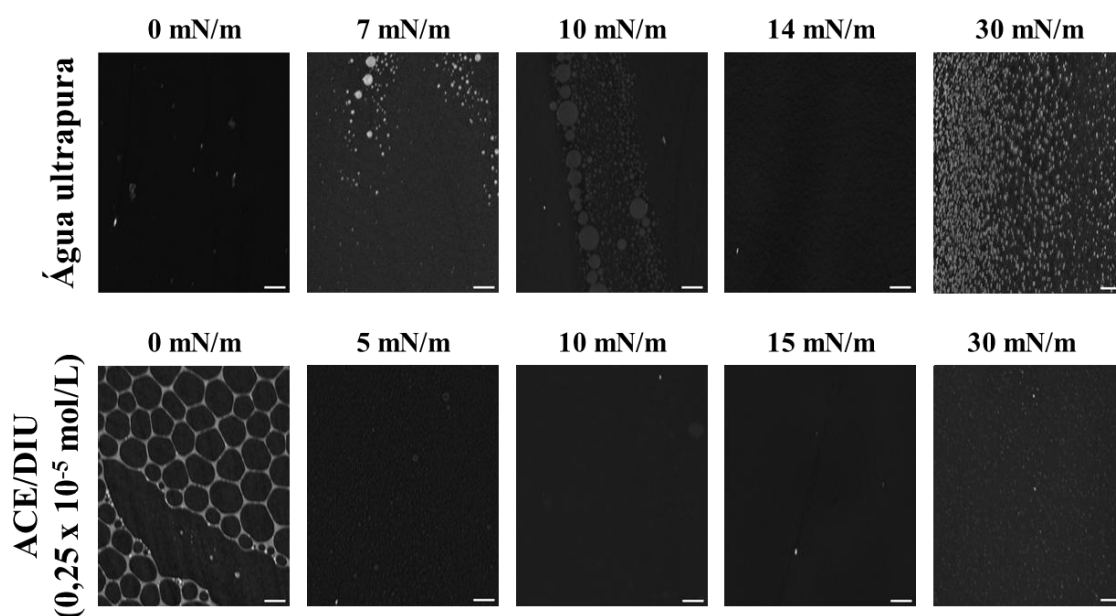


5.4 Microscopia por ângulo de Brewster (BAM)

A fim de estudar a morfologia do filme ternário na presença da mistura dos pesticidas, foram obtidas imagens de BAM da monocamada de POPC/Col/SM na

ausência e presença da mistura Ace/Diu (Figura 29). As imagens estão divididas por pressão de superfície em que a imagem foi gravada: aproximadamente 0, 5, 10, 15 e 30 mN/m.

Figura 29 - imagens de BAM da monocamada de POPC/Col/SM em subfases de água ultrapura (linha superior) e subfase de coquetel Ace/Diu (linha inferior). Barra de escala: 50 μm .



A morfologia da monocamada da mistura ternária comprimida sobre água ultrapura (Figura 29 - linha superior) está de acordo com trabalhos encontrados na literatura^{161,189,190}, uma vez que os domínios lipídicos circulares aparecem em pressões iguais à 7 mN/m, tornando-se mais evidentes e numerosas em 30 mN/m. No entanto, diferentemente das imagens encontradas na literatura, a morfologia obtida mostra uma monocamada com menos domínios lipídicos. Essa diferença pode ser atribuída à maior proporção de POPC (70%) em comparação com as reportadas^{161,189,190} (40, 35, 25, 15 e 5%). Na presença do coquetel de poluentes (linha inferior), os domínios lipídicos são

menos numerosos e menos próximos na pressão de 30 mN/m. Segundo Beata *et al.*¹⁸⁹, esse efeito pode estar relacionado à dificuldade de interação entre as moléculas lipídicas, levando a uma monocamada menos empacotada. Este resultado está de acordo com os resultados das isotermas π -A e do módulo de compressibilidade (Figura 20-B), uma vez que os valores de C_s^{-1} diminuem na presença do coquetel.

Em resumo, os resultados das isotermas π -A indicam que o coquetel tem um impacto semelhante na monocamada ternária em comparação com os poluentes individuais (Figuras 20 e 23, respectivamente). Dos lipídios que compõem a monocamada, o POPC apresentou mudanças na isoterma quando na presença do coquetel semelhante ao observado para a mistura POPC/Col/SM, levando em conta o deslocamento na área molecular média e o leve aumento na pressão de superfície. Tal semelhança indica que este lipídio desempenha o papel principal na interação coquetel-monocamada ternária, provavelmente devido à sua maior proporção na mistura ternária (70%). Os valores de C_s^{-1} do filme ternário também mostram um aumento na elasticidade na presença de ambos os pesticidas e de seu coquetel. No entanto, isso não foi suficiente para alterar a fase da monocamada, que permanece na fase LC. Os resultados de espectroscopia PM-IRRAS para o POPC e para a SM (Figuras 25 A e B) indicam que os pesticidas interagem principalmente com os grupos colina e fosfato, presentes na cabeça polar das duas moléculas, o que é corroborado pelos cálculos de DFT e energias de adsorção. Entretanto, diferentemente do visto nas isotermas, nos espectros PM-IRRAS da monocamada ternária (Figura 24) o coquetel apresenta uma interação mais intensa na região das cabeças polares em comparação com os pesticidas isolados, indicando, nesse caso, um efeito sinérgico do coquetel em níveis moleculares.

Capítulo 6

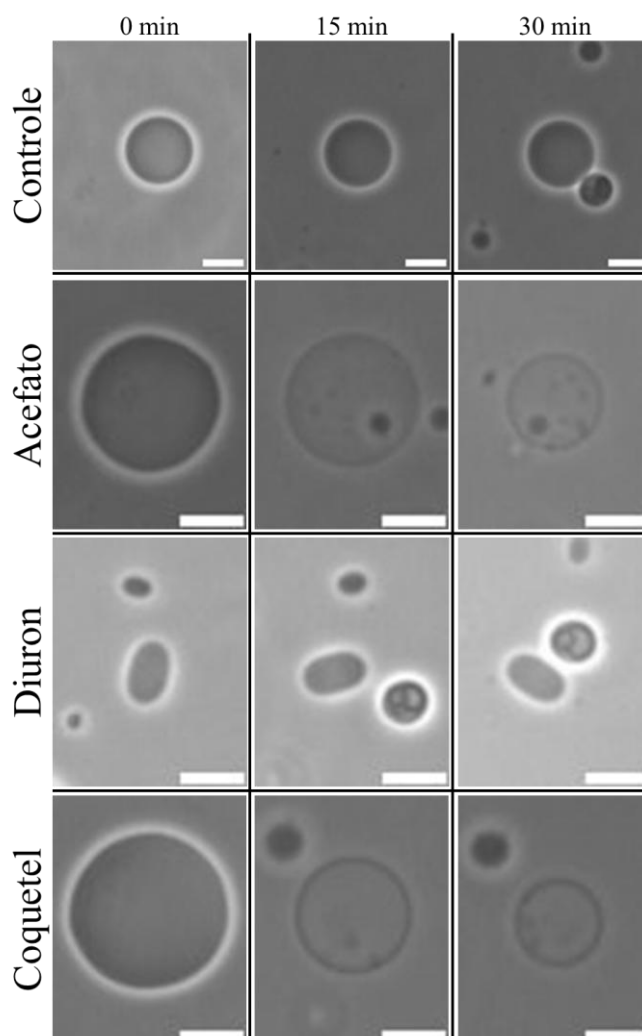
Resultados e discussão das bicamadas lipídicas e sistema in vitro

Capítulo 6 - Resultados e discussão das bicamadas lipídicas

6.1 Microscopia por contraste de fase de GUVs ternárias (POPC/Col/SM)

A fim de estudar os efeitos dos pesticidas acefato e diuron e de sua mistura em estruturas lipídicas 3D, foram adicionadas GUVs da mistura POPC/Col/SM em meio de glicose, sendo observadas na ausência e na presença dos pesticidas isolados ou em coquetel (Figura 30).

Figura 30 - imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (controle, linha A); com acefato (linha B); com diuron (linha C); e com a mistura ace/diu (linha D). Todos os pesticidas estão à concentração de 4×10^{-4} mol/L. Barras de escala: 10 μ m. Imagens gravadas em 0, 15 e 30 minutos.

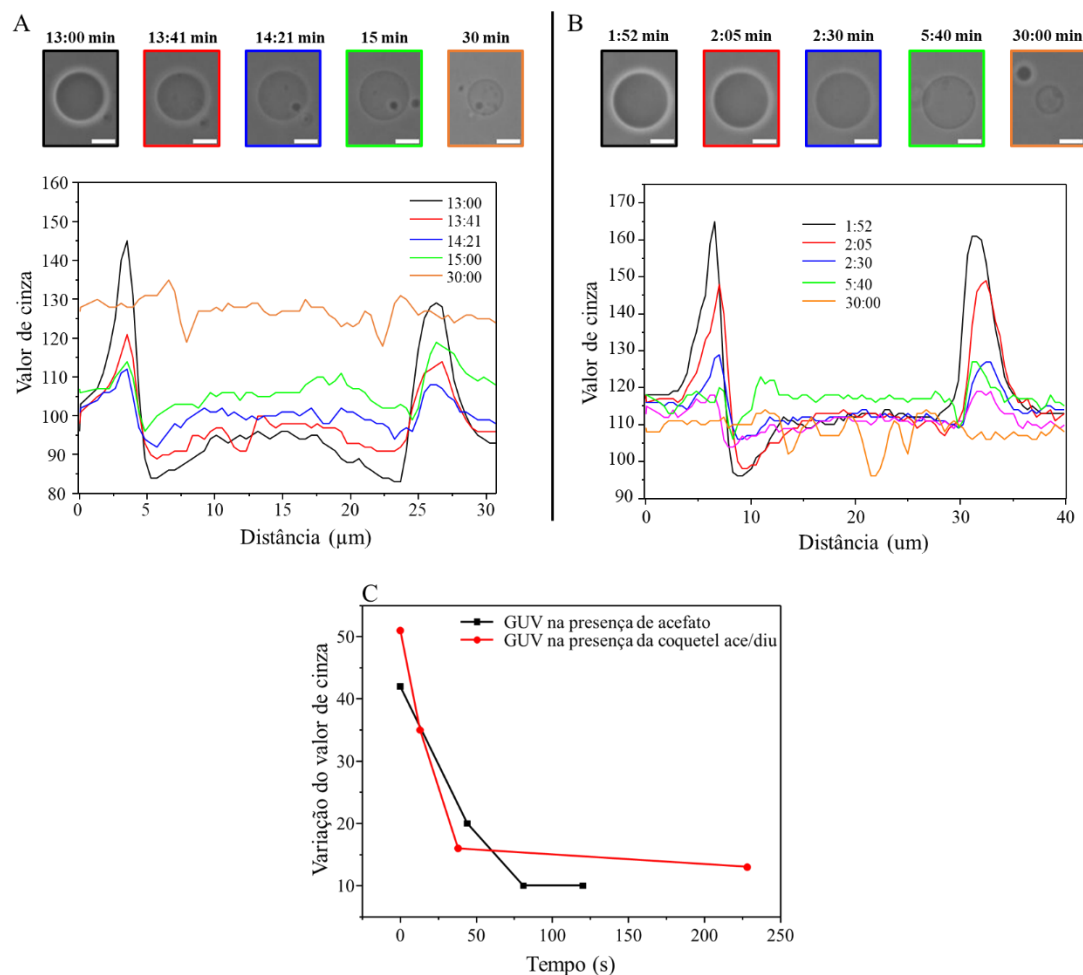


É possível observar que as GUVs observada no sistema de controle têm a forma esférica comum esperada^{51,191,192}, que se mantém estável até o final da visualização, com tamanho de 22 μm . É importante frisar que o diâmetro da vesícula não é padronizado, sendo variado a cada formação. Na presença de acefato, diuron e da mistura dos pesticidas é possível notar mudanças morfológicas, tais como: perda de contraste de fase (para acefato e coquetel) e formato prolato (diuron). É possível notar que tanto para o sistema na presença do acefato quanto na presença do coquetel, após perder o contraste de fase, as vesículas observadas diminuem de tamanho (de 23 para 15 μm e de 25 para 10 μm , respectivamente). A perda do contraste de fase está ligada à formação de poros ou defeitos na bicamada lipídica, como sugere Cabrera *et al.*¹⁹³ para vesículas de POPC/POPG (1:1 em mol %) na presença do peptídeo MP-1. O mesmo grupo sugere que a diminuição do tamanho da vesícula está ligado à mudanças na razão volume-área, fazendo com que “dobras” entre as camadas interna e externa ocorram. Tais “dobras” promovem a acumulação lipídica em algumas regiões das vesículas, demarcadas por pontos mais escuros na estrutura. A diminuição do diâmetro das vesículas, no entanto, pode estar ligada ao processo de invaginação (ou formação de *bud* interna)^{194,195}, uma vez que é possível visualizar, principalmente para o caso da GUV na presença de acefato, o aparecimento de áreas mais escuras na região interna da vesícula, que se tornam mais numerosas com o tempo. Outra possibilidade para a diminuição do diâmetro é a formação de cordões lipídicos, ou protrusões, na qual a vesícula perde parte das moléculas de sua camada interna para a solução aquosa, formando cordões¹⁹⁶. Essa perda pode ter ocorrido para a vesícula na presença do coquetel ace/diu, ainda que não visível nas imagens, uma vez que poucas áreas escuras aparecem no interior da estrutura ao longo do tempo. A presença de vesículas com o formato prolato (quando analisadas na presença do diuron) também pode estar ligada à alteração da relação área-volume da estrutura¹⁹⁷. Assim, a

presença de diuron na região polar dos lipídios provoca uma alteração na área em excesso, levando à deformação das vesículas^{198,199}.

Apesar dos sistemas em exposição ao acefato e à mistura apresentarem a perda do contraste de fase, o tempo em que o mesmo foi observado difere para os dois. A Figura 31 apresenta imagens de microscopia por contraste de fase das vesículas na presença de acefato (A) e na presença da mistura (B) em função do tempo, bem como o perfil do valor de cinza correspondente para ambos, abaixo das imagens. É importante ressaltar que esse estudo foi realizado apenas para a vesícula observada nas imagens, e não para toda a população de GUVs presente no poço de observação.

Figura 31 - perda do contraste de fase em função do tempo das vesículas ternárias na presença de (A) acefato e (B) mistura ace/diu. Barras de escala: 10 μm . Abaixo de cada linha de imagens se encontra o respectivo perfil de valor de cinza. As bordas nas imagens coincidem com as cores de cada curva nos gráficos. (C) variação do valor de cinza em função do tempo.



Nota-se que na presença do acefato (Figura 31-A), a vesícula acompanhada na análise começa a perder o contraste de fase em 13:41 minutos de observação. Podemos visualizar esse efeito através do perfil do “Valor de cinza” no gráfico abaixo das imagens de microscopia. Esse perfil foi obtido através do programa ImageJ, traçando-se uma reta no ponto médio da vesícula, atravessando toda sua extensão horizontal. O gráfico indica, nesse caso, o quão claro é aquele ponto da imagem: quanto mais próximo de 250, mais intenso (claro) é o ponto na reta traçada, e quanto mais próximo de 0, menos intenso (mais

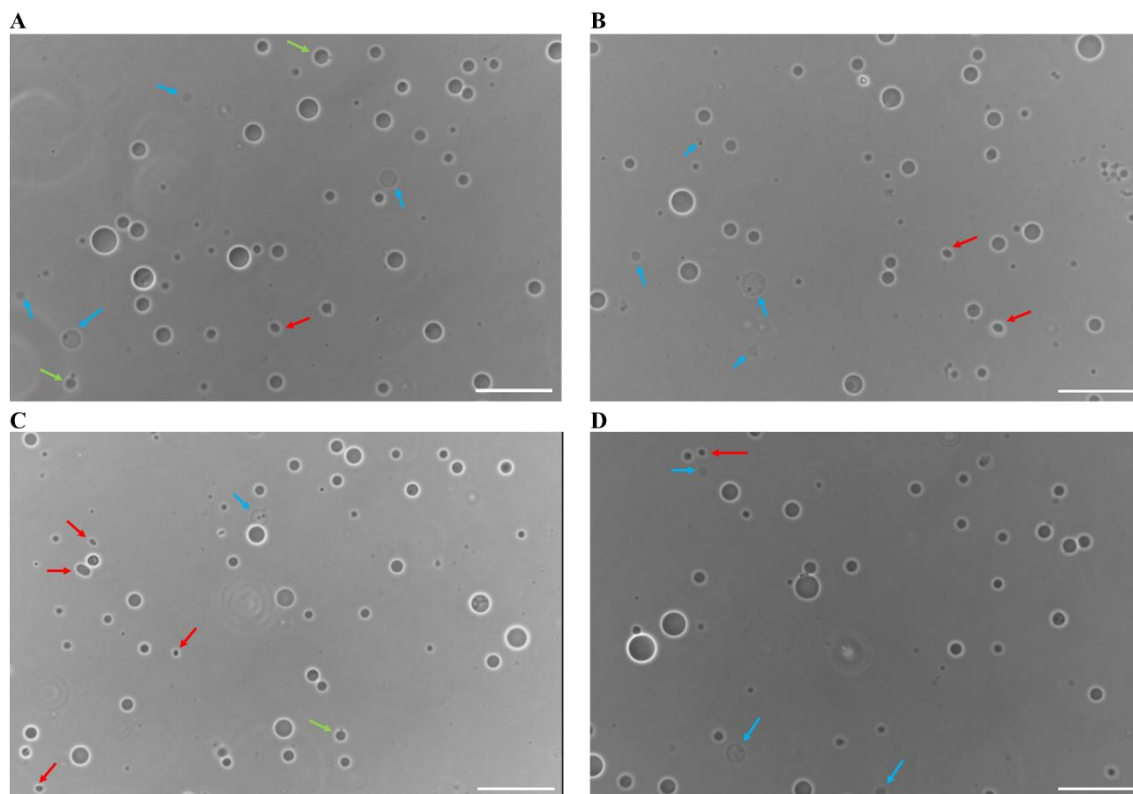
escuro) é aquele local²⁰⁰. Assim, os pontos com altos valores de cinza se referenciam à “borda” da vesícula, e a região entre os pontos, com menor valor de cinza, corresponde ao interior da bicamada. Quanto mais próximos os valores dos picos estiverem do valor do centro, menor será o contraste de fase. Para o sistema na presença do acefato, foram escolhidos os pontos da “borda” em 3 e 26 μm , e para o centro, em 14,5 μm . No tempo de 13 minutos (borda preta), os picos possuem valores de 144 e 120, enquanto o centro possui valor de 95. Já em 13:41 (borda vermelha), esses valores são de 120, 113 e 97, respectivamente, indicando o escurecimento das regiões da borda e, portanto, o início da perda do contraste de fase. Em 15 minutos (borda verde), nota-se que o contraste de fase é perdido, uma vez que os valores dos picos de valor de cinza são de 113 e 119 para os pontos de 3 e 26 μm , respectivamente, e de 105 para a região central.

Já para a GUV observada na presença do coquetel ace/diu (Figura 31-B), foram escolhidos os pontos de borda em 6 e 31 μm e para o centro, em 18,5 μm . No tempo de 1:52 minutos de observação (borda preta), os picos dos pontos em 6 e 31 μm possuem valores de cinza de 165 e 161, respectivamente, enquanto o centro possui valor de 111. Em comparação ao acefato, o contraste de fase começa a ser perdido mais rapidamente (2:05 minutos – borda vermelha) para a GUV na presença da mistura do pesticida. Isso pode ser notado uma vez que os valores de cinza para as bordas diminuem para 147 e 149, referente à 6 e 31 μm , respectivamente, e para 113 para o centro. No entanto, a perda total do contraste se dá em 5:40 minutos (3:35 minutos totais em comparação aos 1:19 minutos na presença do acefato), indicando que o coquetel afeta a bicamada mais lentamente. Essa diferença no tempo de perda de contraste de fase é confirmada na Figura 31-C, na qual estão apresentados o valor de cinza em função do tempo para a GUV na presença de acefato (em preto) e para a GUV na presença do coquetel ace/diu (em vermelho). Os valores do tempo são referentes ao início da perda do contraste, enquanto

a variação do valor de cinza se deve à diferença entre valor mínimo (centro da GUV) e o valor máximo (borda da GUV). Nota-se, portanto, que a vesícula na presença de acefato perde seu contraste de fase mais rapidamente (79 segundos) em comparação com a GUV na presença do coquetel (215 segundos). É importante frisar que essa análise foi realizada apenas para a vesícula acompanhada em cada sistema. Portanto, adiante serão discutidas as imagens da área total observada, bem como uma análise quantitativa incluindo a contagem das vesículas em diferentes regiões do poço de observação.

A fim de obter uma visualização geral da área observada em cada sistema, a Figura 32 mostra as imagens de microscopia por contraste de fase das vesículas na ausência dos pesticidas (Figura 32 -A), na presença de acefato (Figura 32-B), diuron (Figura 32-C) e da mistura dos dois pesticidas (Figura 32-D), todos em concentração igual à 4×10^{-4} mol/L.

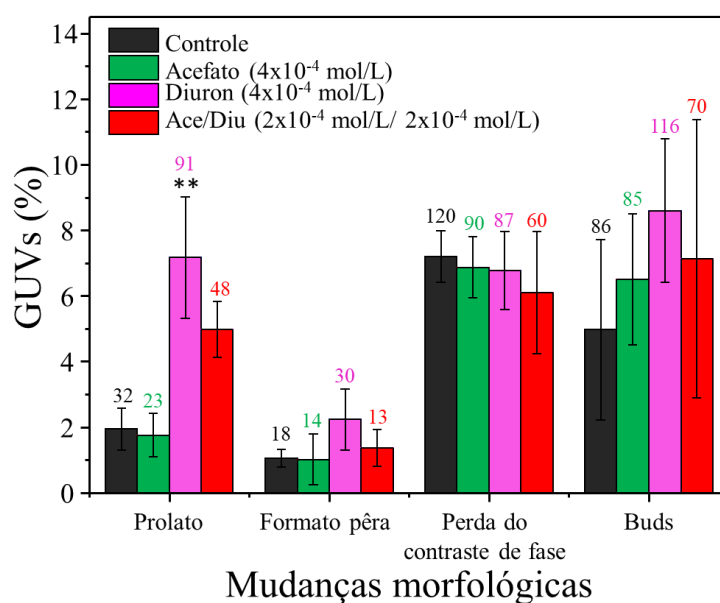
Figura 32: imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (A); com acefato (B); com diuron (C); e com a mistura ace/diu (D). Todos os pesticidas estão à concentração de 4×10^{-4} mol/L. Barras de escala: 50 μ m. Imagens gravadas após 30 minutos de observação. *As setas azuis indicam vesículas sem contraste de fase; as vermelhas indicam GUVs com formato prolato; e as setas verdes indicam presença de buds.*



Nota-se que, na Figura 32-A, são observadas 36 GUVs com formato esférico esperado (82 %), 4 não possuem contraste de fase (9,0 %), enquanto 2 (4,5 %) possuem o formato prolato e 2 possuem a presença de *buds* em sua estrutura (4,5 %). Para o acefato (Figura 32-B), são observadas 30 vesículas esféricas (83,5 %), 4 sem contraste de fase (11,0 %) e 2 com formato prolato (5,5 %), não possuindo, nesta imagem, nenhuma com presença de *buds*. As vesículas observadas na presença do diuron (Figura 32-C) também possuem sua totalidade com formato esférico, sendo observadas 35 GUVs nessa condição (83,5 %), com adição de 2 sem contraste de fase (4,5 %), 4 com formato prolato (9,5 %) e 1 com presença de *bud* em sua estrutura (2,5 %). Por fim, na presença do coquetel

ace/diu, esses números são, respectivamente, de 26 (79,0 %), 3 (9,0 %), 2 (6,0 %) e 2 (6,0 %). Nota-se que para essa observação geral de uma região, não há, inicialmente, mudanças significativas na porcentagem de vesículas com mudanças de morfologia. Portanto, uma análise quantitativa foi realizada a fim de obter um estudo mais detalhado levando em contas as demais GUVs observadas nos poços de observação. Para isso, após a finalização do experimento (30 min de observação), 10 fotos de cada sistema em diferentes regiões do poço de observação foram capturadas. As vesículas de cada foto foram contadas, levando em conta a ausência ou a presença de mudanças morfológicas, para cada triplicata. Por fim, foi realizado o cálculo da média aritmética e do desvio padrão, sendo plotadas no gráfico da Figura 33. É importante citar que o número total das vesículas acima de cada barra é referente à soma total das vesículas contadas de cada formação independente.

Figura 33 - análise quantitativa da contagem das vesículas na ausência (barras pretas) e presença de acefato (barras verdes), diuron (barras magentas) e mistura (barras vermelhas) com seus respectivos desvios padrão e número de GUVs contadas. Contagem realizada após 30 minutos de observação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA a um fator, seguida de testes post hoc de Tukey).

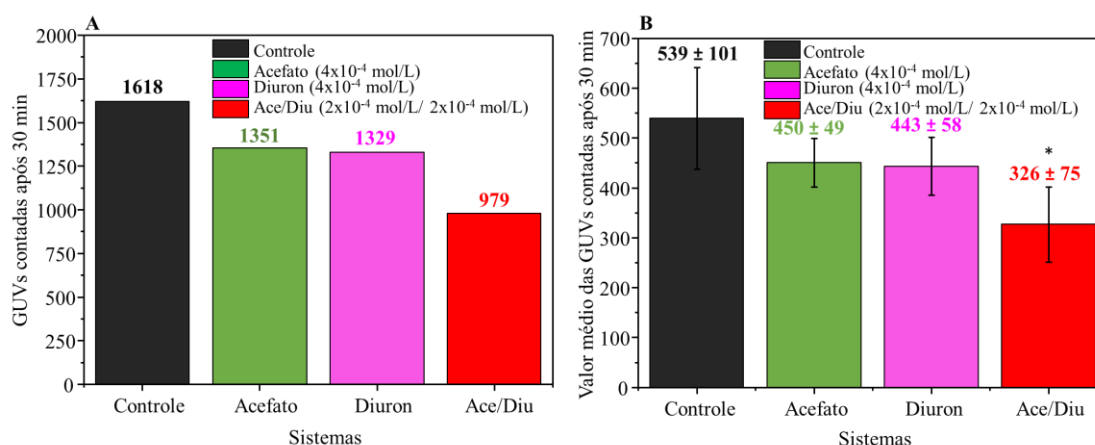


Inicialmente, é importante destacar que a análise quantitativa é realizada comparando os valores obtidos entre o sistema controle e os sistemas com cada pesticida para cada mudança morfológica. É possível observar na Figura 33 que a mudança para a forma prolato apresentou a maior diferença entre as vesículas de controle ($2,0 \pm 0,6 \%$) e as vesículas na presença de diuron ($7,0 \pm 2,0 \%$) e coquetel ($5,0 \pm 1,0 \%$), enquanto na presença de acefato este valor permaneceu similar ($1,75 \pm 0,7\%$). Neste caso, a análise estatística indicou que, para o sistema contendo diuron, a diferença observada foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), isto é, não corresponde à aleatoriedade dos dados^{201,202}. Esse valor evidencia que o número de vesículas com formato prolato não pode ser atribuído a variações aleatórias dos dados, mas sim ao efeito da exposição a esse pesticida. As GUVs no formato pêra¹⁹⁸ apresentaram valores similares, sendo eles: $1,0 \pm 0,3 \%$ no controle; $1,0 \pm 0,8 \%$ na presença de acefato; $2,2 \pm 0,9 \%$ na presença de diuron; e $1,37 \pm 0,6 \%$ no sistema com o coquetel. As vesículas sem contraste de fase apresentaram valores elevados, no entanto para todos os sistemas os valores foram similares, sendo de $7,2 \pm 0,8 \%$ no controle, $6,9 \pm 0,9 \%$ e $6,8 \pm 1,2 \%$ na presença de acefato ou diuron, respectivamente, e $6,1 \pm 1,9 \%$ em meio contendo a mistura dos pesticidas. Por fim, a presença de *buds*^{203,204} foi visualizada em $5,0 \pm 2,8 \%$ das GUVs no controle, enquanto na presença de acefato este valor atingiu $6,5 \pm 2,0 \%$. $8,6 \pm 2,2 \%$ das bicamadas na presença de diuron apresentaram esta mudança morfológica, valor próximo ao visto para o coquetel ($7,1 \pm 4,2 \%$). Portanto, nota-se que, apesar das vesículas apresentarem alterações morfológicas na presença dos pesticidas e seu coquetel, não houve diferenças significativas quando analisadas em comparação ao controle.

Uma vez que os resultados de morfologia não foram suficientes para inferir os efeitos dos pesticidas nas vesículas, o número total de GUVs também foi contado após 30 minutos de observação. A Figura 34-A mostra esses valores para as vesículas no

sistema controle e na presença dos pesticidas, bem como seu coquetel. Já a Figura 34-B mostra a média do valor para cada experimento realizado na triplicata.

Figura 34 - análise (A) da contagem total e (B) da média das vesículas na ausência (barras pretas) e presença de acefato (barras verdes), diuron (barras magentas) e mistura (barras vermelhas) após 30 minutos de visualização. * $p < 0,05$ (ANOVA a um fator, seguida de testes post hoc de Tukey).



Observa-se, na Figura 34-A, que os valores totais de vesículas ao fim de 30 minutos diminuem na presença dos pesticidas: enquanto no sistema controle 1618 GUVs foram contadas, na presença de acefato o valor diminuiu para 1351 (17% a menos) e, na presença de diuron, 1329 GUVs foram contadas (18% a menos em relação ao controle), similar ao valor encontrado para o acefato. Já na presença do coquetel Ace/Diu uma diminuição mais expressiva do valor é observada, já que 979 GUVs foram contadas, ou seja, 40% a menos que o valor do sistema controle. O p-valor ($< 0,05$) reforça que o dado não é proveniente de aleatoriedade dos valores, e possui significância estatística.

O número de vesículas contadas para cada experimento da triplicata é apresentado na Tabela 3. Nota-se, pela tabela, que para os três experimentos realizados há a tendência na diminuição das vesículas contadas ao fim dos 30 min de observação. Esses valores são

refletidos quando analisados em suas médias, como visto na Figura 34-B: enquanto no controle a média das vesículas contadas foi de 539 ± 101 , na presença de acefato e diuron o valor diminui para 450 ± 49 e 443 ± 48 , respectivamente. Já na presença do coquetel, o valor médio contado foi de 326 ± 75 vesículas, reforçando o menor número visualizado na presença da mistura dos pesticidas. Essa diminuição sugere que, apesar de não terem sido observadas rupturas visíveis ao microscópio, os pesticidas podem estar causando alterações nas GUVs que levam ao rompimento das estruturas, principalmente no sistema com o coquetel, indicando a possível sinergia do coquetel sobre as bicamadas lipídicas após 30 minutos de exposição.

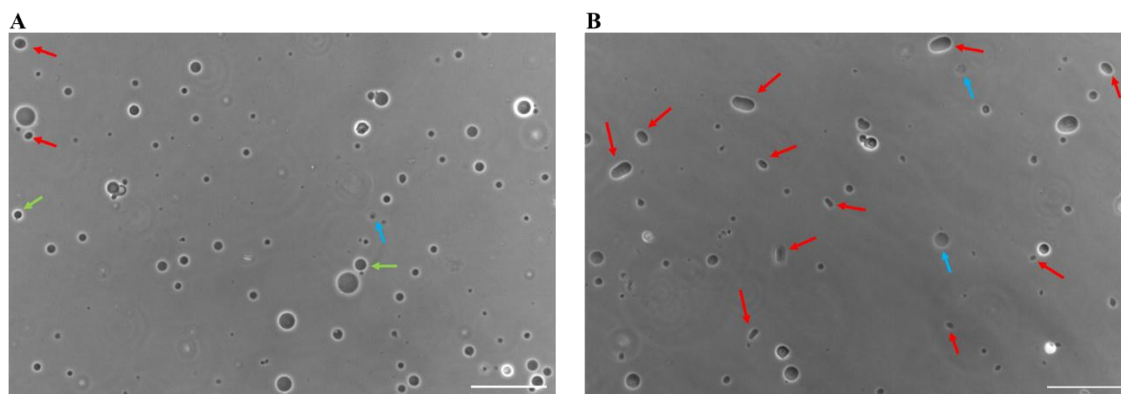
Tabela 3: contagem total de GUVs após 30 minutos de exposição

Medida	GUVs (controle)	GUVs (Acefato)	GUVs (Diuron)	GUVs (Ace/Diu)
1	422	405	405	376
2	599	502	414	239
3	597	444	510	364

Além do estudo de bicamadas (GUVs) até então apresentado, também foi realizada a análise das GUVs formadas já na presença do coquetel Ace/Diu diluído na sacarose, utilizada para hidratar os filmes lipídicos. Nesse sentido, as vesículas formadas já expostas à mistura dos analitos têm maior proximidade com o experimento em monocamadas de Langmuir, uma vez que as moléculas lipídicas na interface água/ar são comprimidas com os pesticidas já presentes na subfase. A Figura 35 mostra as imagens de microscopia por contraste de fase do poço de observação para as vesículas controle, ou seja, aquelas formadas na ausência dos pesticidas e observadas em sacarose (Figura

35-A) e para as vesículas formadas na presença do coquetel (Figura 35-B). As setas indicam GUVs com alterações na morfologia: as azuis representam as vesículas sem contraste de fase; as setas vermelhas representam as vesículas com formato prolato; e as setas verdes representam as vesículas com *buds*.

Figura 35: imagens de microscopia por contraste de fase das GUVs formadas por POPC/Col/SM nos sistemas sem pesticidas (A); e formadas na presença da mistura ace/diu à concentração de 4×10^{-4} mol/L (B). Barras de escala: 50 μ m. Imagens gravadas após 30 minutos de observação. As setas azuis indicam vesículas sem contraste de fase; as vermelhas indicam GUVs com formato prolato; e as setas verdes indicam presença de *buds*.

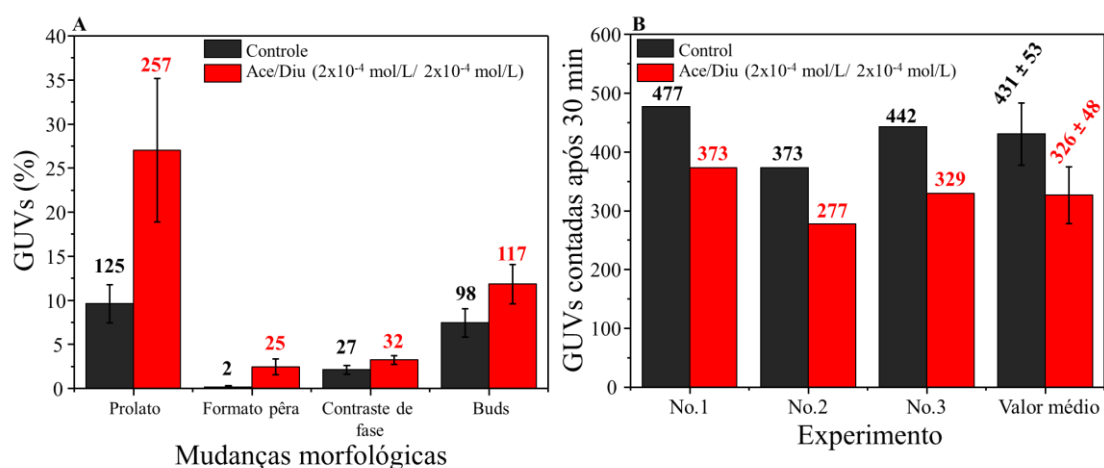


Na ausência do coquetel foram contados, na imagem da Figura 35-A, um total de 56 vesículas, sendo a maioria delas esféricas, com o esperado (51), 2 delas no formato prolato, 2 contendo *buds* e uma sem contraste de fase. Já para as GUVs na presença do coquetel (Figura 35-B), foram contadas um total de 31 vesículas, sendo que 14 delas possuíam formato prolato e 2 não apresentaram contraste de fase. Essa observação indica que o coquetel pode impedir a formação de vesículas e, quando formadas, há a tendência de não apresentarem o formato esférico esperado.

Assim como foi realizado para as GUVs formadas na ausência dos pesticidas, uma análise quantitativa foi feita para as vesículas formadas já na presença do coquetel a fim

de se obter o estudo detalhado incluindo as outras vesículas observadas. A Figura 36-A mostra o gráfico das mudanças morfológicas das vesículas expostas durante a formação, enquanto a Figura 36-B mostra o número total de vesículas contadas após 30 min de cada triplicata, bem como da média dos valores.

Figura 36 - A – análise quantitativa dos efeitos morfológicos das GUVs de POPC/Col/SM 70/20/10 mol% na ausência (controle) e expostas ao coquetel Ace/Diu durante a formação; e B – número total de vesículas contadas após 30 minutos. Os valores acima das barras se referem aos números de vesículas contadas para cada mudança morfológica ou número de experimento.



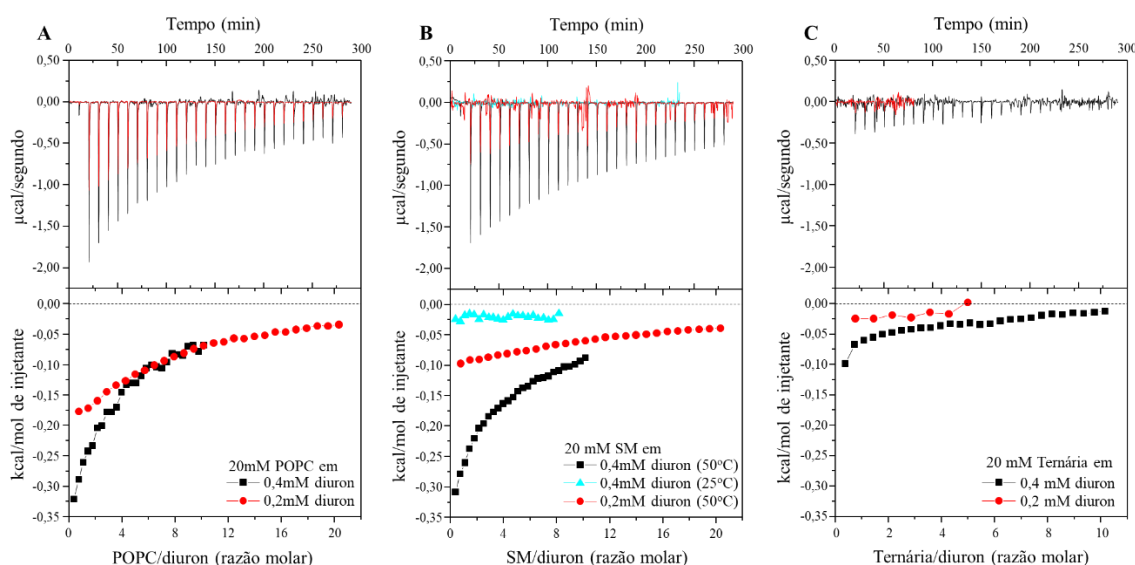
A Figura 36-A mostra que $27 \pm 8\%$ das GUVs formadas na presença do coquetel (barras em vermelho) exibiram formato prolato, valor superior ao observado no controle (barras em preto - $9 \pm 2\%$) e nas GUVs expostas ao coquetel após a formação ($7 \pm 2\%$, Figura 33-A). Além disso, $12 \pm 2\%$ das GUVs expostas ao coquetel durante a formação apresentaram *buds* em suas estruturas. Por outro lado, as vesículas com formato pêra e sem contraste de fase não apresentaram valores significativos, sendo observadas tais mudanças em $2 \pm 1\%$ e $3 \pm 1\%$ das bicamadas contadas, respectivamente. O número total de GUVs expostas ao coquetel durante a formação e contadas após 30 minutos de visualização (Figura 36-B) foi 24% menor do que o total de vesículas formadas em

sacarose pura (326 ± 48 e 431 ± 53 , respectivamente). Esses resultados indicam que o coquetel impacta negativamente a formação das vesículas, uma vez que menos GUVs foram formadas e uma proporção maior apresentou mudanças morfológicas. Esses efeitos podem ser relacionados com os resultados obtidos para os filmes de Langmuir, onde monocamadas foram formadas em subfase na presença dos pesticidas. Como o acefato e o diuron têm afinidade pelas cabeças polares dos lipídios, seu coquetel pode dificultar a formação espontânea de vesículas esféricas ao interagir com essas regiões.

6.2 Medidas de ITC das LUVs de POPC, SM e da mistura ternária

Uma vez observado que os pesticidas não afetam significativamente as GUVs ternárias, foram realizadas as medidas de ITC para LUVs compostas por POPC, SM ou pela a mistura ternária POPC/Col/SM (70/20/10 mol%), na presença de diuron ou de acefato, a fim de comparar o valor de energia de ligação entre o método experimental com os cálculos teóricos obtidos por DFT. Uma vez que os cálculos de DFT foram realizados para o lipídio POPC na presença de acefato ou diuron, os experimentos foram realizados somente para os pesticidas isoladamente. A Figura 37 mostra os termogramas (gráficos superiores) e integrais dos picos por mol de solução injetada (gráficos inferiores) obtidos para a titulação de POPC (A), SM (B) e mistura ternária (C) em solução de diuron a 0,2 ou 0,4 mM.

Figura 37 - termogramas referentes à titulação de LUVs de (A) POPC, (B) SM e (C) mistura ternária POPC/Col/SM (70/20/10 mol%) em solução de diuron em concentrações iguais a 0,2 e 0,4 mM. As concentrações lipídicas para todas as suspensões são iguais a 20 mM.



Inicialmente, observa-se que, em todos os sistemas investigados, o processo de interação entre o pesticida e as vesículas é exotérmico, uma vez que os picos observados nos termogramas apresentam valores negativos de energia. Tal aspecto é observado em resultados reportados na literatura para sistemas semelhantes, como para LUVs de POPC tituladas no peptídeo valorfina²⁰⁵, e para o surfactante TritonX titulado em LUVs de esfingomieline na fase fluida (45 °C)²⁰⁶.

Para as LUVs de POPC (Figura 37-A), é possível notar que, para a concentração de diuron igual a 0,4 mM (quadrados pretos), a primeira injeção de lipídio resultou em um valor de energia de -32 kcal/mol. À medida que novas injeções foram realizadas, os valores tornaram-se progressivamente menos negativos, atingindo $-6,8$ kcal/mol na última injeção (28). Já para a concentração de pesticida igual a 0,2 mM (círculos vermelhos), os valores de energia observados foram de $-17,7$ kcal/mol na primeira injeção e $-3,4$ kcal/mol na última. Para as LUVs de esfingomieline investigadas a 50 °C

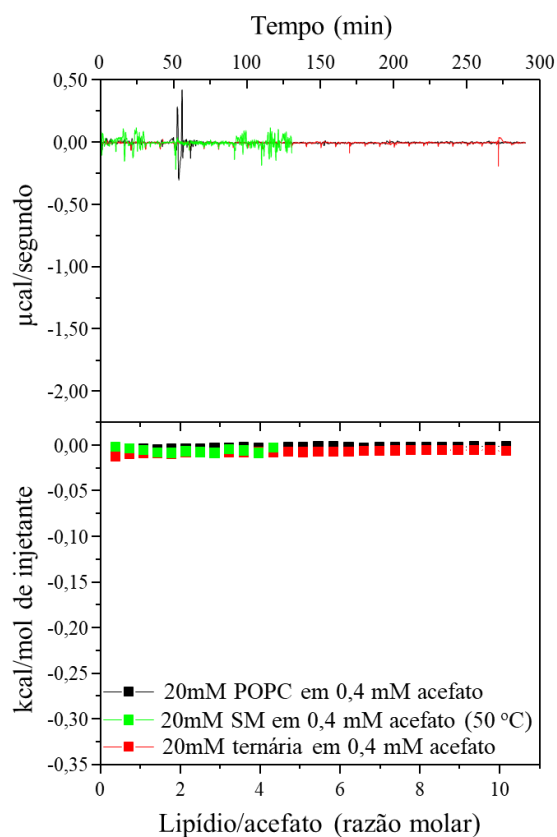
injetadas em diuron na concentração de 0,4 mM (Figura 37-B, quadrados pretos), foram observados valores de energia semelhante aos observados para o POPC na primeira e na última injeção: $-30,8$ e $-8,7$ kcal/mol, respectivamente. Já para a concentração de 0,2 mM esses valores foram de $-9,7$ e $-3,9$ kcal/mol.

Em contraste, para as vesículas compostas pela mistura ternária (Figura 37-C), não foram detectadas variações significativas ao longo da titulação. Para a maior concentração de diuron (0,4 mM, quadrados pretos), a energia associada à primeira injeção foi de $-9,8$ kcal/mol, diminuindo para $-1,3$ kcal/mol na última injeção. Para a menor concentração de pesticida (0,2 mM – círculos vermelhos), apenas oito injeções foram realizadas, uma vez que os sinais obtidos não indicaram interação relevante entre o diuron e as vesículas já na primeira injeção.

Nota-se, entretanto, que para os sistemas compostos por POPC e SM os valores de energia não convergem para 0 kcal/mol ao final da titulação, e não houve presença de um platô ao fim da curva. Esse comportamento pode estar relacionado à afinidade limitada do pesticida por esses sistemas lipídicos e a não saturação total das vesículas pelo pesticida²⁰⁷.

Uma vez discutidos os resultados referentes à interação do diuron com os diferentes sistemas lipídicos, os resultados a seguir abordam a interação do acefato com os mesmos sistemas. A Figura 38 apresenta os termogramas obtidos para as LUVs de POPC (em preto), SM (em verde) e da mistura ternária (em vermelho) na presença desse pesticida na concentração de 0,4 mM.

Figura 38: termogramas referentes à titulação de LUVs de POPC (em preto), SM (em verde) e mistura ternária POPC/Col/SM (70/20/10 mol%) (em vermelho) em solução de acefato em concentração igual a 0,4 mM. As concentrações lipídicas para todas as suspensões são iguais a 20 mM.



Diferentemente do observado para o diuron, não foram identificados indícios de interação entre o acefato e os sistemas lipídicos investigados, uma vez que não se observam variações significativas de energia ao longo das injeções, desde as primeiras adições de lipídio, sendo todos os valores próximos à linha de base. De modo geral, os resultados sugerem que o acefato apresenta uma afinidade ainda menor pelas bicamadas do que aquelas observadas para o diuron. Apesar desses fatores, o inseticida pode estar interagindo eletrostaticamente com os grupos polares das cabeças dos lipídios, permanecendo na região externa das vesículas, uma vez que resultados de dinâmica

molecular mostraram que tanto o acefato quanto o diuron se encontram nessa região, como discutido adiante.

A fim de se obter os valores de constante de afinidade e entalpia da ligação, foram realizados os ajustes no modelo teórico de calor associado à interação (Equação 6). Uma vez que os sinais dos termogramas foram significativos somente para o POPC e SM na presença de diuron, tais cálculos foram realizados para estes dois sistemas. A Figura 39 mostra a comparação entre os valores experimentais (quadrados ou círculos) e os valores teóricos ajustados (linhas pretas ou vermelhas) para o POPC (A) e SM (B) na presença de diuron a 0,4 mM (em preto) e 0,2 mM (em vermelho). A Tabela 4 mostra os valores de K e ΔH encontrados nos ajustes teóricos associados à cada sistema.

Figura 39 - comparação entre os valores experimentais (pontos) e ajustes teóricos (linha contínua) para as titulações dos lipídios (A) POPC e (B) SM, ambos a 20 mM, em diuron a 0,4 (preto) e 0,2 mM (vermelho).

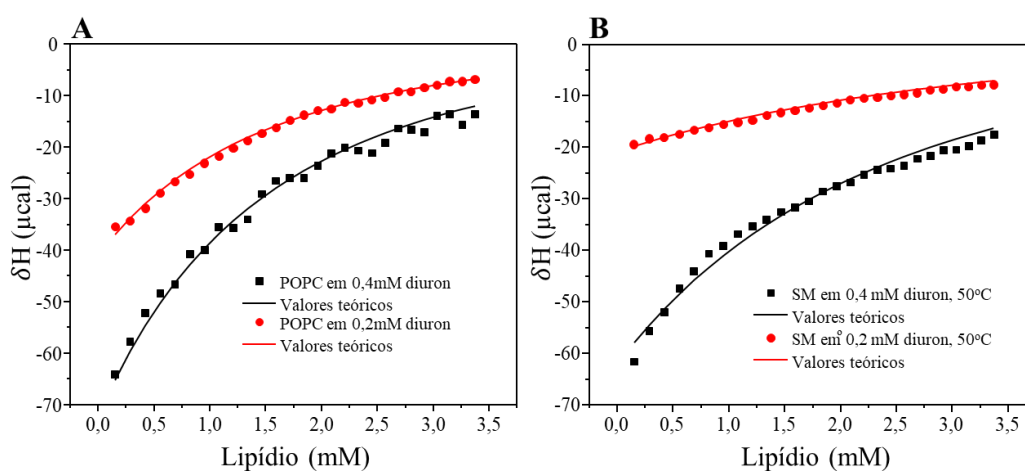


Tabela 4: constante de afinidade (K) e entalpia da interação ΔH do diuron com LUVs de POPC e SM.

Concentração de diuron (mM)	K (M ⁻¹)		ΔH (kcal/mol)	
	POPC	SM	POPC	SM
0,4	$3,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	-3,0	-4,3
0,2	$3,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	-3,4	-4,3

Para as LUVs de POPC, os valores da constante de afinidade obtidos foram de $3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para ambas as concentrações de diuron investigadas (0,4 e 0,2 mM). Já os valores de entalpia obtidos para o sistema POPC foram negativos, com $-3,0 \text{ kcal/mol}$ para 0,4 mM e $-3,4 \text{ kcal/mol}$ para 0,2 mM, confirmando o caráter exotérmico do processo de interação. Já para as LUVs de SM, os valores de constante de afinidade foram inferiores aos observados para o POPC, com $1,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para a concentração de diuron de 0,4 mM e $1,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para 0,2 mM, com valores de entalpia iguais a $-4,3 \text{ kcal/mol}$ para ambas as concentrações estudadas. Os valores de K obtidos para ambos os lipídios são consistentes com uma interação fraca ou moderada^{208,209}, possivelmente associada à adsorção superficial do diuron na interface lipídio/água.

De forma geral, os valores relativamente baixos de constante de afinidade indicam que a interação do diuron com ambos os modelos miméticos de membrana é fraca, enquanto os valores negativos de ΔH confirmam que o processo é exotérmico. Esses resultados são compatíveis com um mecanismo de interação predominantemente superficial, sem evidências de inserção do pesticida na bicamada lipídica, com os mesmos permanecendo na região dos grupos polares dos lipídios na camada exterior da LUV.

A comparação entre os resultados de DFT e ITC indica que ambas as abordagens apontam para interações energeticamente favoráveis entre o diuron e os sistemas

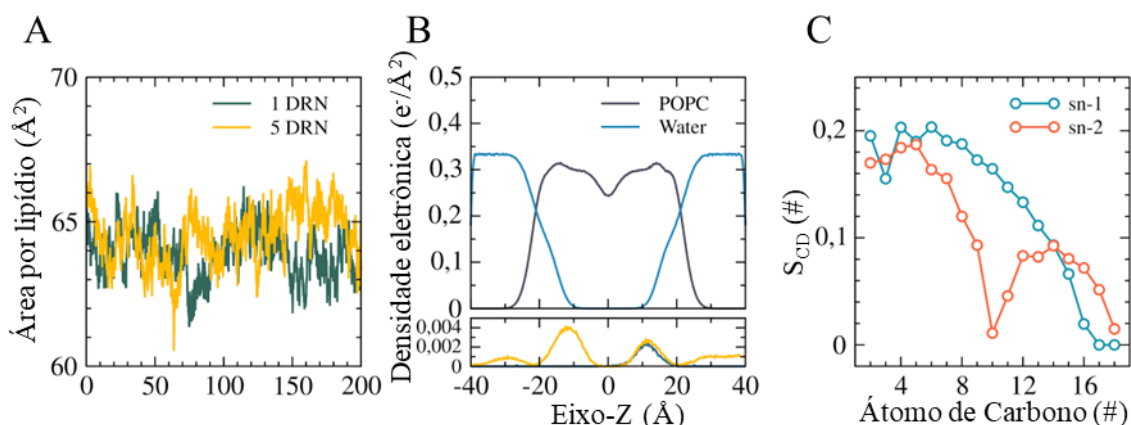
lipídicos, embora em escalas distintas. É importante frisar que os cálculos de DFT são realizados para um par de moléculas lipídio/pesticida, sendo a energia de adsorção dada em kcal/mol desse par. Já para o ITC, os valores representam a interação entre as LUVs dos lipídios, já formadas e empacotadas, com o pesticida, sendo a entalpia de interação dada por kcal/mol de injetante. Nos cálculos de DFT, a energia de adsorção (Tabela 2) foi mais negativa para o par SM + diuron (-18,228 kcal/mol) do que para POPC + diuron (-13,675 kcal/mol), sugerindo maior afinidade local do diuron pela SM. De modo semelhante, os dados de ITC mostraram entalpias de interação mais exotérmicas (negativas) para LUVs de SM (-4,3 kcal/mol, para ambas as concentrações de pesticida) em comparação com as LUVs de POPC (-3,0 e -3,4 kcal/mol para as concentrações de 0,4 e 0,2 mM de diuron, respectivamente), indicando que a interação diuron/SM também é entálpicamente mais favorecida no sistema experimental. Entretanto, as constantes de afinidade obtidas por ITC foram maiores para POPC do que para SM, sugerindo que, embora a interação local com SM seja energeticamente mais intensa, o processo de partição do diuron nas LUVs ocorre de forma mais favorável para as bicamadas de POPC. Portanto, os resultados de ITC e DFT indicam, juntos, que o diuron apresenta maior interação entálpica com SM, mas maior afinidade pelo sistema de POPC.

6.3 Dinâmica molecular de bicamadas de POPC

A fim de esclarecer as possíveis interações entre acefato ou diuron com bicamadas lipídicas foram realizados estudos de dinâmica molecular (DM), calculados pelo professor Danilo S. Olivier (UFNT – Araguaína, TO). O lipídio escolhido para os cálculos foi o POPC, uma vez que é a molécula com maior porcentagem na bicamada ternária. As proporções de pesticida para lipídio utilizadas foram de 1:200 e 5:200, durante um tempo de simulação de 200 ns, com os seguintes parâmetros sendo analisados: área por lipídio,

perfil de densidade eletrônica e parâmetro de ordem da cadeia alquílica. Os resultados são apresentados nas Figuras 40 e 41 para o diuron e Figuras 42 e 43 para o acefato.

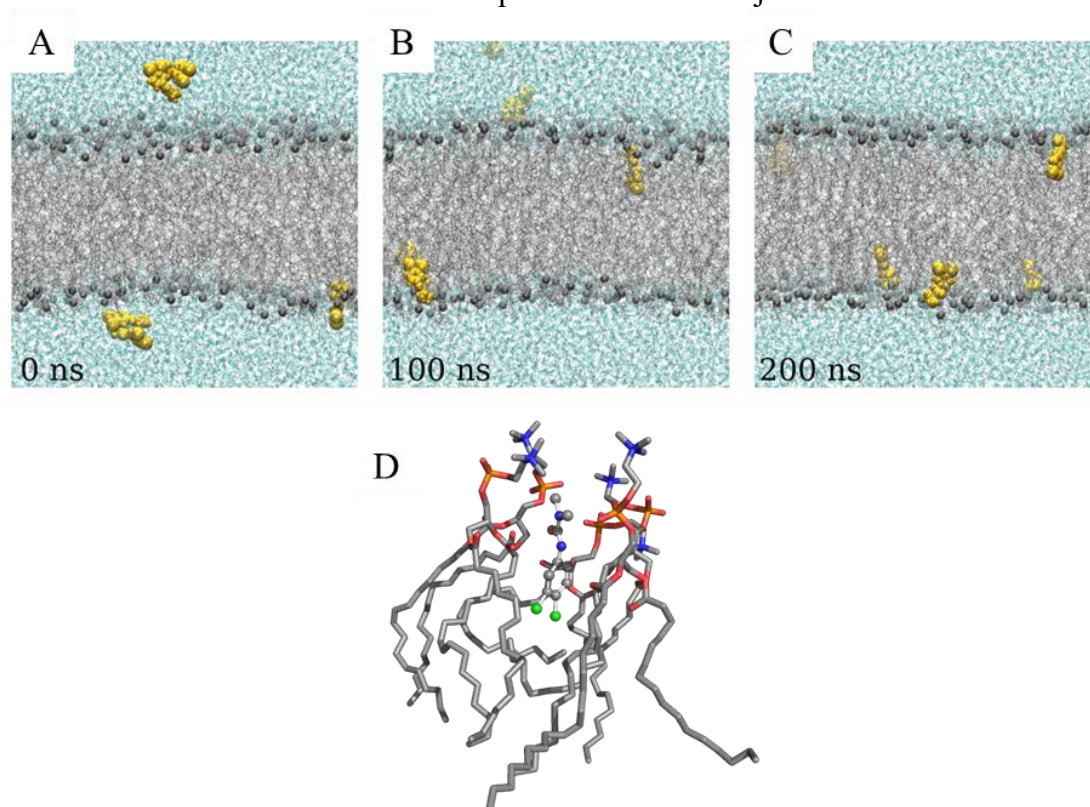
Figura 40 - simulações de dinâmica molecular de bicamadas do lipídio POPC na presença de diuron. A – área ocupada pela cabeça do lipídio durante 200 ns de simulação; B – perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica, água e moléculas de pesticidas nas concentrações (número de moléculas) 1 e 5. C – parâmetro de ordenamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídio sn-1 e sn-2.



Na presença de diuron (Figuras 40), nota-se que o pesticida é inserido na bicamada lipídica, sem afetar a área por lipídio da membrana de POPC. Foram observadas pequenas flutuações em torno de $63,9 \pm 0,7 \text{ \AA}^2$ na bicamada lipídica na presença de uma molécula do pesticida e em torno de $64,5 \pm 0,8 \text{ \AA}^2$ para 5 moléculas do analito durante a simulação (Figura 40-A). O valor de área por lipídio está de acordo com os resultados obtidos por Shahane *et al.*²¹⁰ e Goodyear *et al.*²¹¹, uma vez que para bicamadas de POPC este parâmetro atingiu $\sim 63 \text{ \AA}^2$ para ambos autores. O perfil de densidade eletrônica mostrou que o formato da membrana não mudou devido à interação com o diuron. Os valores máximos encontrados para a cabeça do lipídio estão em torno de $\pm 18 \text{ \AA}$, conforme esperado, devido à carga do fosfato. Também é possível notar que a densidade eletrônica da água no meio da bicamada é zero, indicando que, devido ao empacotamento das

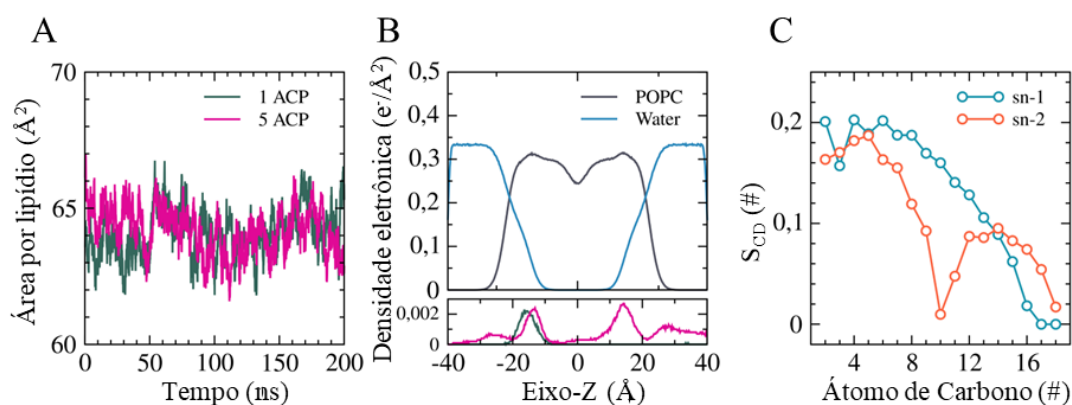
moléculas de POPC, a entrada de moléculas de água no meio das cadeias de hidrocarboneto é dificultada. Além disso, este resultado para o diuron (cerca de $\pm 12 \text{ \AA}$ - Figura 40-B) indica a sua inserção abaixo do grupo fosfato, em ambos os lados da membrana. O parâmetro de ordem da cadeia alquílica pode indicar mudanças no empacotamento dos lipídios, porém como a inserção do pesticida não foi profunda nessa região do POPC, este parâmetro não foi alterado (Figura 40-C). Esses resultados indicam que, apesar da inserção das moléculas de diuron na bicamada lipídica com seus anéis inseridos próximos às cadeias de hidrocarbonetos, com pode ser visualizado nas imagens da dinâmica presentes Figura 41-A à D, a simulação não mostrou alterações nos parâmetros estruturais da membrana.

Figura 41 - imagens da dinâmica da inserção do diuron nas bicamadas de POPC em (A) 0, (B) 100 e (C) 200 ns. D – imagem aumentada da simulação em 200 ns. As esferas pretas representam o centro do grupo fosfato da cabeça do POPC; as linhas cinzas representam as cadeias alquílicas; a água é representada pelas linhas azuis, enquanto o diuron está representado em laranja.



A mesma abordagem foi realizada para o acefato no sistema, nas quais a área ocupada pela cabeça do lipídio, o perfil de densidade eletrônica e o parâmetro de ordenamento das cadeias de hidrocarbonetos estão presentes na Figura 42 e as imagens na dinâmica no tempo de 200 ns se encontram na Figura 43.

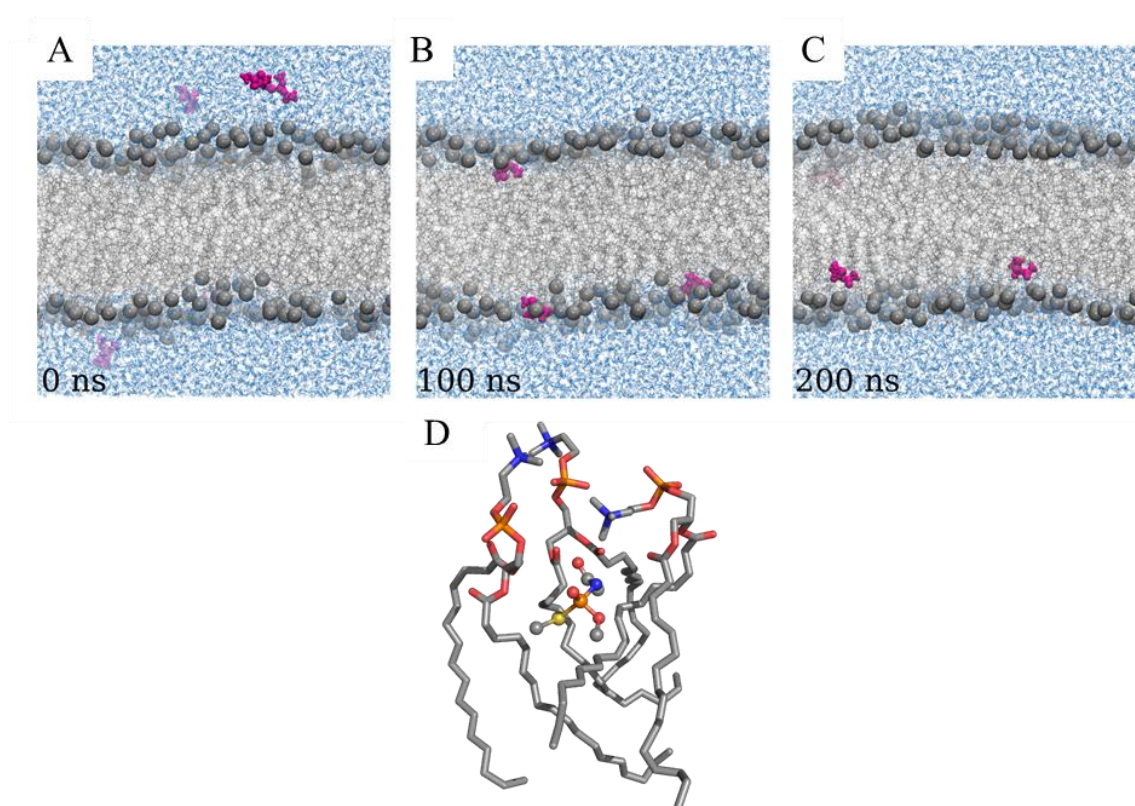
Figura 42 - simulações de dinâmica molecular de bicamadas do lipídio POPC na presença de acefato. A – área ocupada pela cabeça do lipídio durante 200 ns de simulação; B – perfil de densidade eletrônica representando a bicamada lipídica, água e moléculas de pesticidas nas concentrações (número de moléculas) 1 e 5. C – parâmetro de ordenamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídios sn-1 e sn-2.



Durante a simulação, as moléculas do inseticida acefato entraram na bicamada, sem alterar a área por cabeça lipídica (Figura 42-A), assim como ocorre para o diuron. Para ambas as concentrações de acefato, a área média por lipídio foi de $64,1 \pm 0,7 \text{ Å}^2$, semelhante aos valores médios para POPC na presença de moléculas de diuron. O perfil de densidade eletrônica para os sistemas mostrou que a presença de acefato não afetou a estrutura das bicamadas de POPC, com o pesticida inserido na região dos grupos de cabeça do lipídio (Figura 42-B). Devido ao tamanho da molécula e uma vez que o acefato não afeta a área por lipídio ou o perfil de densidade eletrônica, é possível esperar que não afete o empacotamento da cadeia de hidrocarbonetos, como observado na Figura 40-C.

As imagens das simulações (Figuras 43-A a D) mostram que, ao final dos 200 ns, as moléculas foram inseridas na bicamada lipídica de POPC, próximas às cabeças polares do lipídio.

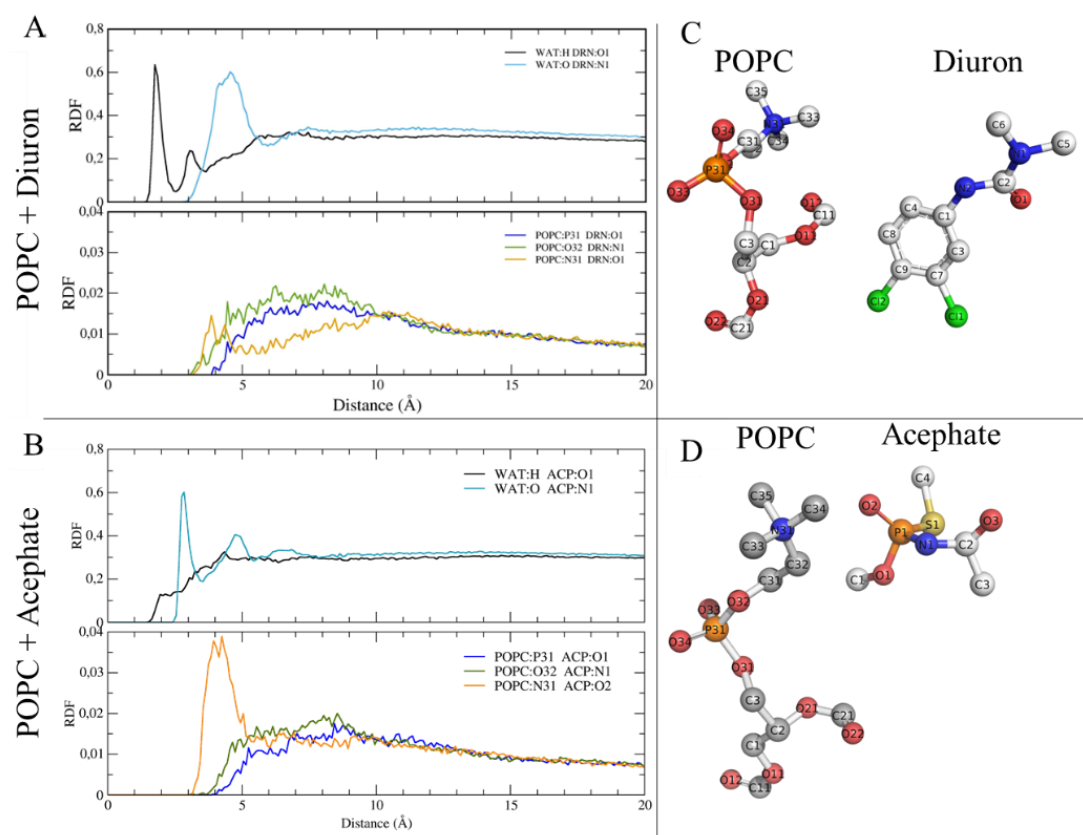
Figura 43 - imagens da dinâmica da inserção do acefato nas bicamadas de POPC em (A) 0, (B) 100 e (C) 200 ns. D – imagem aumentada da simulação em 200 ns. As esferas pretas representam o centro do grupo fosfato da cabeça do POPC; as linhas cinzas representam as cadeias alquílicas; a água é representada pelas linhas azuis, enquanto o acefato está representado em roxo.



Os resultados de DM para a bicamada de POPC na presença dos pesticidas acefato e diuron mostram que, apesar de interagirem com a membrana e se inserirem próximo ao grupo fosfato da cabeça, eles não foram capazes de afetar a estrutura da bicamada lipídica. A fim de averiguar a distribuição espacial das moléculas de acefato ou diuron em relação à cabeça polar do POPC nas bicamadas, cálculos de Função de Distribuição Radial (RDF)

foram obtidos durante a simulação de dinâmica molecular. A Figura 44 mostra os gráficos de RDF de soluto-membrana para o diuron (Figura 44-A) e acefato (Figura 44-B), bem como as representações estruturais (Figura 44-C para diuron; Figura 44-D para o acefato).

Figura 44 - gráficos de RDF ilustrando as interações entre (A) moléculas de água e diuron, bem como átomos específicos de POPC ao redor do herbicida; e (B) moléculas de água e acefato e átomos específicos de POPC ao redor do inseticida. (C) Representação esquemática do grupo de cabeça de POPC e moléculas de diuron e (D) moléculas de POPC e acefato. As abreviações se referem a cada molécula estudada e seus respectivos átomos: WAT – água; ACP – acefato; DRN – diuron; POPC – lipídio POPC; H – hidrogênio; O – oxigênio; N – nitrogênio; P – fósforo.



Observa-se, na Figura 44-A, que todas as moléculas de diuron foram posicionadas na bicamada lipídica com o átomo de nitrogênio (N1) orientado em direção à interface POPC-água (ou seja, próximo à cabeça polar do lipídio), enquanto o anel aromático

apontava para o centro da membrana (ou seja, cadeias alquilas). Interações fortes entre o átomo de oxigênio (O1) do diuron e os átomos de hidrogênio das moléculas de água próximas à superfície do POPC são indicadas por um pico acentuado em aproximadamente 2-3 Å. Da mesma forma, um pico significativo em torno de 4 Å é observado para as interações entre o átomo de nitrogênio (N1) do diuron e os átomos de oxigênio das moléculas de água próximas, sugerindo a presença de uma camada de solvatação. Os gráficos de RDF para as interações entre os átomos da cabeça do POPC (P31, O32, N31) exibem um padrão mais difuso, com picos se estendendo de cerca de 3 Å a 10 Å. Essa distribuição mais ampla sugere a presença de moléculas do lipídio ao redor do diuron, provavelmente devido às características estruturais complexas tanto do pesticida quanto do lipídio. Esses resultados indicam que a camada de solvatação do diuron e as interações da membrana com o pesticida dependem da orientação do soluto e do ambiente lipídico, com a formação de camadas distintas de solvente ao redor de grupos funcionais.

Com relação ao acefato (Figura 44-B), ao fim da simulação, foi observado que as moléculas do pesticida estavam orientadas com seu átomo de enxofre (S1) apontando para as cadeias de hidrocarbonetos, enquanto o átomo de nitrogênio (N1) apontava para a cabeça polar do lipídio. O gráfico de RDF para as moléculas de água ao redor do acefato possui um pico de interação entre os átomos de O da água e o átomo N1 do pesticida em aproximadamente 3 Å, com um pico secundário menor perto de 4 Å e, diferentemente do visto para o diuron, nenhuma camada de solvatação foi observada. Em relação às interações com o POPC, nota-se um pico intenso correspondente às interações entre o átomo de nitrogênio N31 do lipídio e o átomo O2 do acefato, em cerca de 4 Å, e os gráficos para os pares P31 e O32 exibem distribuições mais amplas, variando de 4 Å a 10 Å. Esses resultados sugerem que o acefato adota uma orientação preferencial, com N1

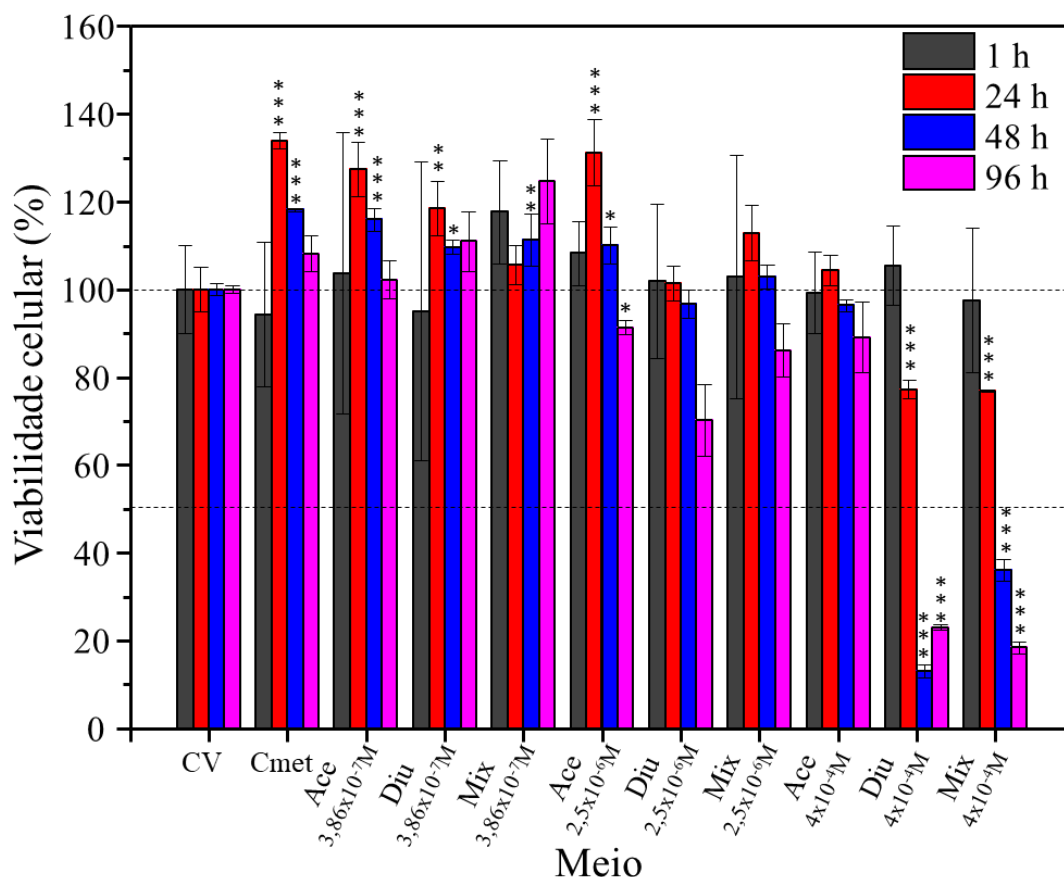
voltado para a interface de água e O₂ interagindo com o átomo N31 do POPC, indicando interações fortes entre o acefato e o grupo colina do lipídio em sua configuração final.

De forma geral, os resultados das dinâmicas moleculares e cálculos de RDF mostram que os pesticidas acefato e diuron interagem com as cabeças polares do POPC, presente na bicamada lipídica. Adotando o POPC como parte majoritária da bicamada ternária, pode-se concluir que a ausência de flutuações observadas na dinâmica corrobora os resultados experimentais, uma vez que não houve mudanças significativas nas vesículas expostas após a formação. Entretanto, a inserção de diuron e acefato nas cabeças polares dos lipídios, indicada nos resultados de MD e dos cálculos de RDF, está de acordo com mecanismos de interação entre os pesticidas e os lipídios, concordando também com os resultados de PM-IRRAS (Figura 24), que sugerem que ambos os pesticidas (e seu coquetel) estão localizados na mesma região dos lipídios na forma de monocamada.

6.4 Ensaios de MTT para avaliação da toxicidade dos pesticidas

Por fim, ensaios de viabilidade celular foram realizados com o objetivo de investigar os efeitos dos pesticidas em sistemas biológicos mais complexos, complementando os estudos realizados nos modelos miméticos apresentados. Para isso, foram utilizadas células da linhagem HEP-2, permitindo avaliar a citotoxicidade do acefato, do diuron e de sua mistura. A Figura 45 apresenta os resultados do ensaio de MTT, expressos em porcentagem de viabilidade celular, obtidos após a exposição das células às diferentes concentrações dos pesticidas ($0,25 \times 10^{-5}$ mol/L; 4×10^{-4} mol/L; e $3,86 \times 10^{-7}$ mol/L), nos tempos de 1, 24, 48 e 96 horas.

Figura 45 - viabilidade celular das células Hep-2 expostas aos pesticidas acefato (Ace), diuron (Diu) e à mistura acefato+diuron (Mix), nas concentrações de $3,86 \times 10^{-7}$ M, 4×10^{-4} M e $2,5 \times 10^{-6}$ M, por 1 hora (barras pretas), 24 horas (barras vermelhas), 48 horas (barras azuis) e 96 horas (barras magentas). As linhas horizontais no gráfico correspondem às porcentagens de 50 % e 100 %. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA a um fator, seguida de testes *post hoc* de Tukey -1, 24 e 48 h - ou Games-Howell - 96 h).



A Figura 45 apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) para células HEp-2 expostas ao acefato, ao diuron e à mistura acefato/diuron em diferentes concentrações, avaliados após 1 (barras pretas), 24 (barras vermelhas), 48 (barras azuis) e 96 h (barras magentas) de incubação. Os resultados são expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de vida (CV), considerado como 100%.

Inicialmente, observa-se que no tempo inicial de exposição (1 h – barras pretas), não houve redução significativa da viabilidade celular, sendo inclusive registrados valores

iguais ou superiores a 100% para alguns sistemas. Tal aumento na viabilidade é estatisticamente significativo para os sistemas de controle com metanol (24 h e 48 h, $p < 0,001$), acefato e diuron na concentração de $3,86 \times 10^{-7}$ mol/L (24 e 48 h, $p < 0,05 - p < 0,001$), mistura a $3,86 \times 10^{-7}$ mol/L (48 h, $p < 0,01$) e acefato na concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L (24 e 48 h, $p < 0,05 - p < 0,001$). Esse comportamento sugere que, em curtos períodos de incubação, os pesticidas avaliados não induzem citotoxicidade pronunciada, mas podem aumentar o metabolismo das células. Tal efeito é observado por Colaço *et al.*²¹² para células mononucleares do sangue periférico expostas a nanopartículas de glucano e curcumina, que atribuem esse aumento ao estímulo metabólico e proliferação das células. Esse estímulo também descrito por Ghaemi *et al.*²¹³ para duas linhagens celulares de câncer gástrico (AGS e MKN-45) expostas ao pesticida diazinon. Nesse trabalho, os autores observaram o aumento da viabilidade celular para valores superiores à 100% faixa de concentração do analito de $0,01 \times 10^{-6}$ a $0,1 \times 10^{-6}$ mol/L, seguido da diminuição de células viáveis em maiores tempos de exposição. Uma possível explicação para esse aumento é a hormese: estresse intermitente, leve a moderado, que estimula as funções biológicas dos organismos vivos²¹⁴. Tal efeito é observado por Taroncher *et al.*²¹⁵ para células da linhagem Caco-2 expostas a proteínas hidrolisadas. No entanto, apesar do aumento na viabilidade para as células aqui estudadas, nota-se também a diminuição da viabilidade celular para maiores tempos de exposição, principalmente para o diuron e para a mistura de pesticidas. Portanto, a fim de avaliar os resultados de forma direta, a Tabela 5 mostra os valores de porcentagem para cada sistema.

Tabela 5: valores de viabilidade celular das células Hep-2 referentes ao ensaio de MTT

Meio	Viabilidade (%) – 1 hora	Viabilidade (%) – 24 horas	Viabilidade (%) – 48 horas	Viabilidade (%) – 96 horas
Controle Vida	100 ± 10	100 ± 5	100 ± 1	100 ± 1
Controle Metanol (4% v:v)	94 ± 17	134 ± 2	118 ± 1	118 ± 4
Acefato ($3,86 \times 10^{-7}$ M)	104 ± 32	127 ± 6	116 ± 3	102 ± 4
Diuron ($3,86 \times 10^{-7}$ M)	95 ± 34	119 ± 6	110 ± 3	111 ± 7
Mistura ($3,86 \times 10^{-7}$ M)	118 ± 12	106 ± 4	111 ± 6	124 ± 10
Acefato ($0,25 \times 10^{-5}$ M)	108 ± 7	131 ± 8	110 ± 4	91 ± 2
Diuron ($0,25 \times 10^{-5}$ M)	102 ± 18	101 ± 4	97 ± 3	70 ± 8
Mistura ($0,25 \times 10^{-5}$ M)	103 ± 28	113 ± 6	103 ± 3	86 ± 6
Acefato (4×10^{-4} M)	99 ± 9	104 ± 3	96 ± 1	89 ± 8
Diuron (4×10^{-4} M)	105 ± 9	77 ± 2	13 ± 2	23 ± 1
Mistura (4×10^{-4} M)	98 ± 16	77 ± 1	36 ± 3	19 ± 1

Inicialmente, observa-se que, para o acefato, as diminuições são notadas na concentração intermediária em 96 h ($91 \pm 2\%$) e na maior concentração investigada em 48 e 96 horas ($96 \pm 1\%$ e $89 \pm 8\%$, respectivamente). Dessas, somente a diminuição na viabilidade em 96 h na concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L possui relevância estatística ($p < 0,05$). Apesar de os valores não indicarem alta toxicidade para essas condições, a diminuição gradativa sugere que o pesticida pode exercer citotoxicidade tardia²¹⁶.

Já para o diuron, a diminuição da viabilidade celular, já observada em 96 horas de exposição ao pesticida na concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L ($70 \pm 8\%$), se acentua para a maior concentração estudada. Nesse sentido, é possível observar que, nos tempos de 24,

48 e 96 horas e à concentração de 4×10^{-4} mol/L, as porcentagens da viabilidade atingem 77 ± 2 , 13 ± 2 e 23 ± 1 %, respectivamente, com p valores que sugerem que esses dados estão estatisticamente significativos ($p < 0,001$). Essa diminuição indica que o efeito citotóxico do diuron é dependente do tempo de exposição, tornando-se mais pronunciado em períodos prolongados. Além disso, tais valores indicam que este pesticida, em comparação ao acefato, possui maior potencial tóxico para as células estudadas. Comportamento semelhante é descrito por Huovinen *et al.*²⁸ para o diuron exposto a células de coriocarcinoma placentário humano (BeWo). Os autores observaram que, após 48 horas de exposição ao pesticida na concentração de 2×10^{-4} mol/L, menos da metade das células possuíam viabilidade. Kao *et al.*²¹⁷ também mostram a diminuição da viabilidade celular causada pelo diuron. Nesse caso, foi observada uma queda na viabilidade celular da linhagem Hep-G2 de cerca de 50 % quando na presença do pesticida na concentração de 50 µg/mL ($\sim 2,15 \times 10^{-4}$ mol/L).

Por fim, a exposição à mistura dos dois pesticidas promove a diminuição de células viáveis em 96 horas na concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (86 ± 6 %). Os valores são ainda menores para a maior concentração nos tempos de 24, 48 e 96 horas (77 ± 1 , 36 ± 3 e 19 ± 1 %, respectivamente, com $p < 0,001$), indicando semelhança ao diuron na dependência do tempo de exposição e concentração dos pesticidas.

Em trabalho reportado por Duarte e Vale²¹⁸, é discutido o tipo de efeito (sinérgico, antagônico ou aditivo) para fármacos expostos a células. Nesse contexto os autores explicam essas características para o aumento da viabilidade celular, e não a diminuição, como aqui descrito: caso o aumento da viabilidade em células tratadas com mistura de dois fármacos seja igual ao da soma das viabilidades de cada fármaco separado, há o efeito aditivo. Caso haja valores menores na mistura, o efeito é antagônico, e caso seja maior, sinérgico. Nesse contexto, aplicando o conceito de Duarte e Vale de

forma análoga para a redução da viabilidade celular, a mistura acefato/diuron foi preparada utilizando metade da concentração de cada pesticida, resultando em uma concentração final equivalente àquela empregada para os compostos isolados. Neste caso, portanto, os valores de viabilidade para a mistura acefato/diuron sugerem que a exposição simultânea aos dois pesticidas pode intensificar os efeitos citotóxicos ao longo do tempo, uma vez que os valores encontrados para a mistura, principalmente na concentração de 4×10^{-4} mol/L, são inferiores à média das viabilidades observadas para o acefato e o diuron individualmente (91 % em 24h, 55 % em 48 h e 56 % para 96 h).

Em conjunto, os resultados do ensaio de MTT demonstram que tanto o acefato quanto o diuron apresentam citotoxicidade dependente de concentração e tempo, sendo que o diuron e a mistura dos pesticidas resultam em efeito mais pronunciado sobre a viabilidade celular em exposições prolongadas. Este resultado está de acordo com o observado para as GUVs ternárias, uma vez que, para o diuron e para a mistura, foi observado um maior número de vesículas com mudanças morfológicas e um menor número de vesículas ao fim da exposição, respectivamente.

No geral, os resultados obtidos com monocamadas lipídicas indicam que os pesticidas interagem principalmente com a região polar (cabeça) dos lipídios constituintes da membrana celular. De forma complementar, os dados de ITC sugerem uma afinidade baixa dos pesticidas com as LUVs, enquanto os dados de Dinâmica Molecular sugerem que os pesticidas se encontram entre as cabeças polares dos lipídios, sem inserção no interior da bicamada. Assim, a redução da viabilidade celular observada por ensaio de MTT pode estar ligada com a interação entre os pesticidas com a região externa da membrana celular da linhagem investigada. A maior diminuição observada para as células na presença do diuron está de acordo com os dados obtidos de constante de ligação calculados com os resultados de ITC, que indicam que este pesticida possui um grau de

interação maior com a bicamada do que o acefato. Além disso, para o caso do coquetel, os resultados de PM-IRRAS mostram que a mistura dos pesticidas interage de forma mais proeminente com a cabeça dos lipídios que o diuron e o acefato isolados, sugerindo uma interação mais forte com a membrana, o que pode contribuir para uma maior diminuição da viabilidade celular.

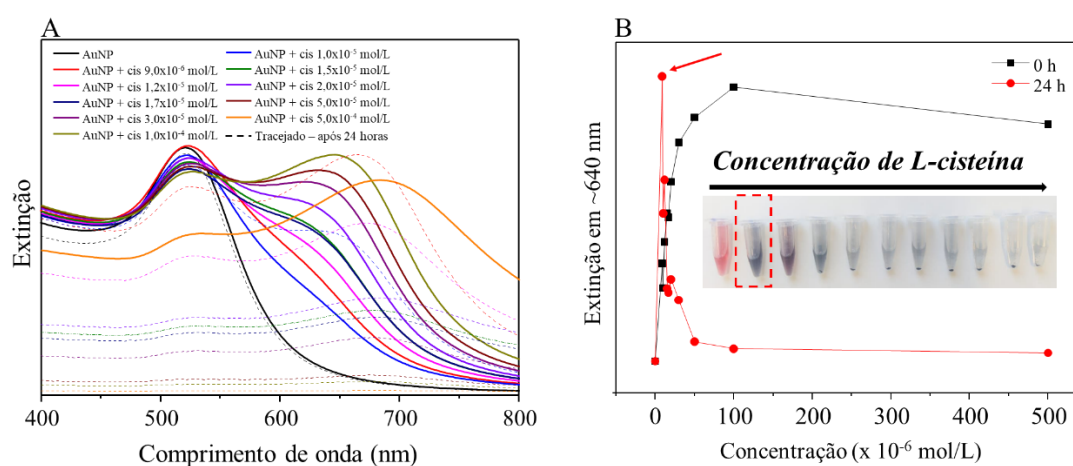
Capítulo 7

Detecção do pesticida acefato via efeito plasmônico no UV-Vis

7.1 Resultados e discussão – Detecção do pesticida acefato via efeito plasmônico no UV-Vis

Inicialmente foram realizadas medidas de extinção no UV-Vis para as AuNPs na presença de L-cisteína em concentrações distintas para avaliar a agregação do sistema. A Figura 46-A mostra os espectros UV-vis das AuNP sintetizadas diluídas em água ultrapura na ausência e presença de L-cisteína em diversas concentrações à 24° C, nos tempos de 0 horas (linhas contínuas) e 24 horas (linhas tracejadas). A Figura 46-B mostra o valor das intensidades das bandas em 520 e 640 nm em 0 (linhas pretas) e 24 horas (linhas vermelhas), a fim de verificar a concentração ideal de cisteína para a continuação dos experimentos, juntamente com as imagens das cores das amostras.

Figura 46 - (A) espectros de extinção no UV-vis de AuNPs na presença de L-cisteína nos tempos de 0h (linhas contínuas) e 24 h (linhas tracejadas). (B) Valores da intensidade da banda em 640 nm nos tempos de 0 (linha preta) e 24 horas (linha vermelha). *Inset* em B – coloração das amostras contendo L-cisteína em diversas concentrações.

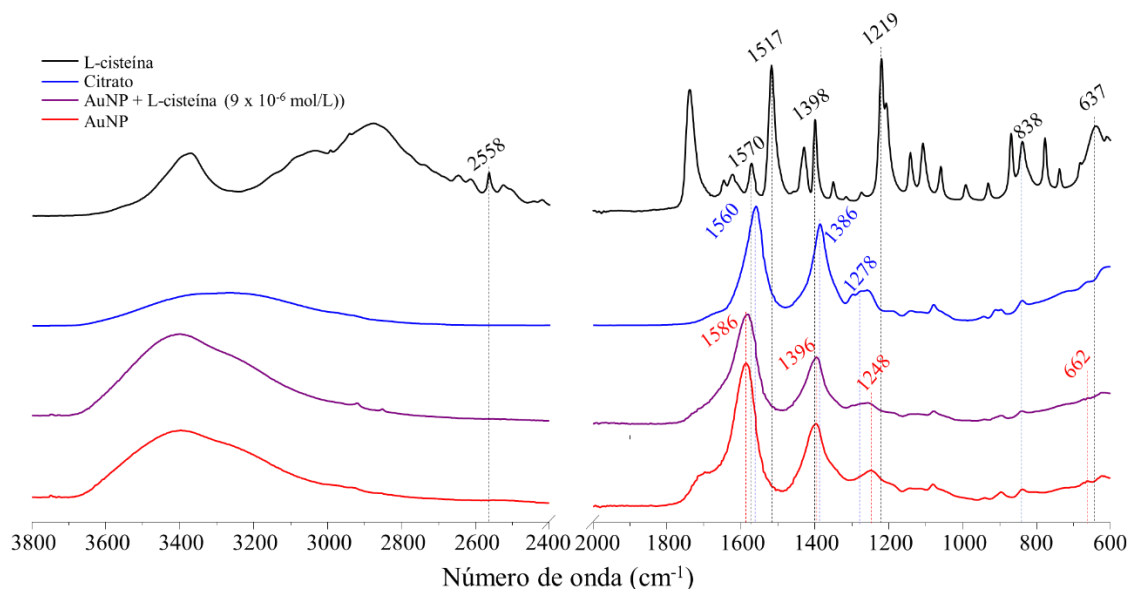


Na Figura 46-A, a banda característica bem distinguida em 520 nm é visualizada no espectro referente às AuNPs sem adição da cisteína (curva preta), condizente com os trabalhos encontrados na literatura^{219–221}. Na presença do aminoácido em diferentes

concentrações, uma tendência de a banda deslocar-se para maiores comprimentos de onda é observada, indo de valores iguais a 622 nm (9×10^{-6} mol/L) até 685 nm (5×10^{-4} mol/L). Tal mudança está associada à agregação das nanopartículas, o que reflete no deslocamento da banda e na mudança de cor da solução (de vermelho vinho para roxo e azul). Essa mudança já é reportada na literatura, como no trabalho de Chen *et al.*²²², Acres *et al.*⁶⁹ e Gopale e Diggikar²²³. Nota-se, no entanto, que para a maior concentração do aminoácido (5×10^{-4} mol/L), há uma diminuição da intensidade das duas bandas. Essa característica foi observada junto à precipitação do coloide (*inset* em B), o que está de acordo com a menor intensidade verificada. Após 24 horas (linhas tracejadas), nota-se a maior agregação das nanopartículas, indicadas pelo aumento da banda plasmônica na faixa de 622-685 nm e a diminuição da banda em 520 nm (nanopartículas isoladas). As soluções contendo as AuNPs com cisteína nas concentrações de $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L até 5×10^{-4} mol/L revelam um espectro pouco intenso, indicando a precipitação do coloide. Porém, na concentração de cisteína igual a 9×10^{-6} mol/L, após as 24 horas de exposição, ambas as bandas em 520 e 665 nm são mantidas, revelando que este sistema é estável. Além disso, a banda em maiores comprimentos de onda se mostra mais intensa do que vista no tempo inicial (Figura 46-B, seta vermelha), sugerindo que o coloide possui maior agregação em maior tempo de exposição.

A fim de se verificar a ligação da cisteína nas AuNPs, foram obtidos espectros FT-IR (módulo ATR) da amostra estável (9×10^{-6} mol/L), em adição aos espectros da L-cisteína pura, citrato e AuNP sem adição do aminoácido. Tais espectros estão dispostos na Figura 47.

Figura 47: espectros de FT-IR, módulo ATR, de AuNP (em vermelho); AuNP + L-cisteína (em roxo); citrato (em azul); e L-cisteína (em preto). Os destacados são referentes às vibrações de cada molécula ou sistema.



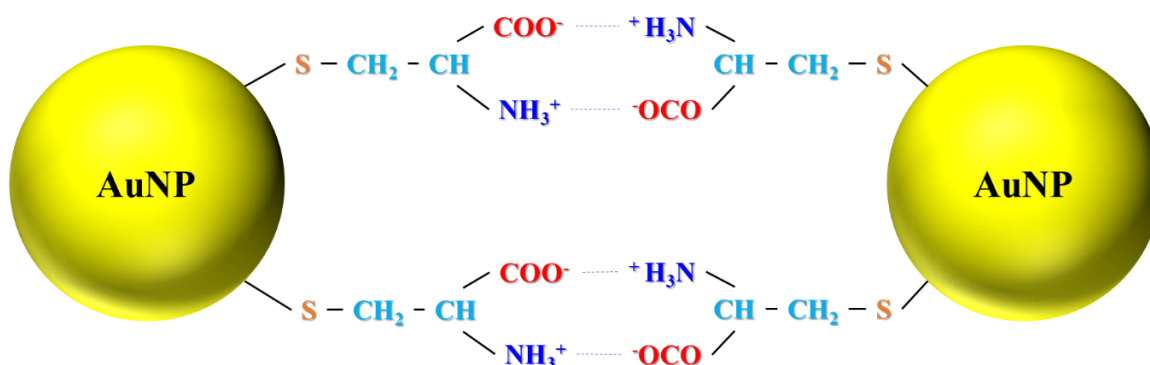
Primeiramente, observa-se que os modos vibracionais das moléculas, identificados por ν – estiramento (acompanhado de s é simétrico, e de as é assimétrico); δ – deformação angular no plano; e γ – deformação no plano), correspondem à literatura: para a L-cisteína, pode-se observar os modos vibracionais referentes ao ν_{CS} (637 cm^{-1}), à δ_{COO^-} (838 cm^{-1}), ao ν_{CO} (1219 cm^{-1}), $\nu_s COO^-$ (1398 cm^{-1}), $\gamma_{NH_3^+}$ (1517 cm^{-1}), $\delta_{NH_3^+}$ (1570 cm^{-1}) e ν_{SH} (2558 cm^{-1})^{224,225}. Já para o citrato, nota-se a presença dos picos referentes à deformação C-H (1277 cm^{-1}), estiramento $\nu_s(COO^-)$ (1386 cm^{-1}) e $\nu_{as}(COO^-)$ (1560 cm^{-1})^{226,227}.

Em relação ao perfil de cada curva, observa-se que aqueles referentes para as AuNPs na ausência e presença de cisteína são semelhantes, revelando que, mesmo com a adição do aminoácido no sistema, sua concentração não foi suficiente para mudar o perfil dos espectros. Além disso, tais curvas apresentam semelhança também em relação à medida realizada para o citrato, com exceção dos picos em 1386 e 1560 cm^{-1} , que, quando

observados para as AuNPs, deslocam-se para 1396 e 1586 cm^{-1} , indicando a formação de AuNPs estáveis^{227,228}. No entanto, a mudança mais importante observada foi o desaparecimento do pico em 2558 cm^{-1} no espectro referente à L-cisteína quando comparado àquele referente às AuNPs + L-cisteína. Essa banda é atribuída ao modo vibracional νSH e sua ausência na medida realizada para as nanopartículas na presença do aminoácido indica interação entre o S (enxofre) da cisteína com o ouro^{224,229}, sugerindo a ligação entre o aminoácido e a nanopartícula. Dessa forma, o resultado obtido indica que o aminoácido se liga com as AuNPs em sua superfície.

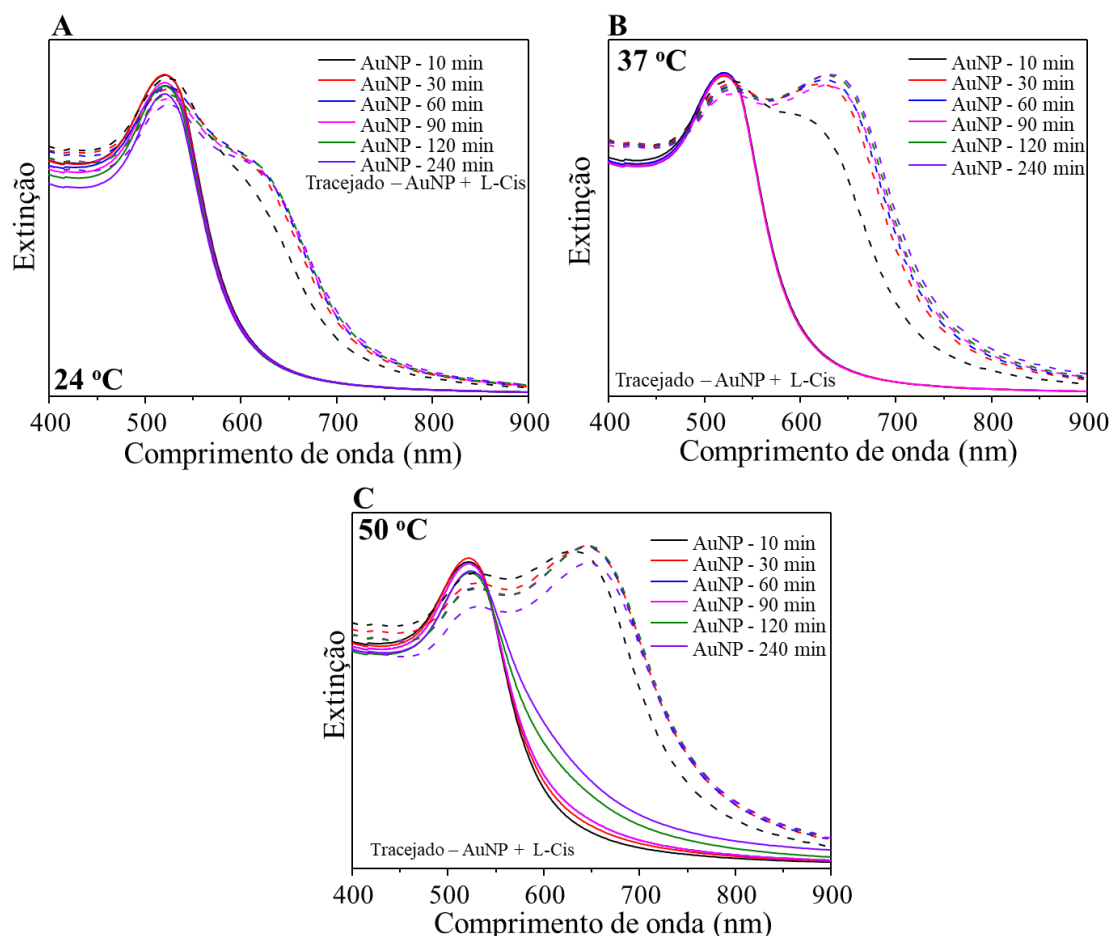
Em relação ao mecanismo de agregação, Cheng *et al.*²³⁰ propõem que, após a ligação da L-cisteína nas nanopartículas por meio do grupo tiol ($-\text{SH}$), os grupos remanescentes do aminoácido (NH_3^+ e COO^-) permanecem livres para promover a ligação com as moléculas ligadas nas nanopartículas adjacentes. Esses grupos conferem ao aminoácido um caráter zwitteriônico, que é atingido na faixa de pH entre 1,91 e 8,16^{231,232}. Considerando que o pH do sistema estudado (5,1–5,9) se encontra nesse intervalo, a forma zwitteriônica da L-cisteína é predominante, indicando que o mecanismo de agregação proposto satisfaz a agregação observada. Um mecanismo semelhante é descrito por Rabbani *et al.*²³³, que sugerem que a L-cisteína se liga à AuNP, deslocando as moléculas de citrato originalmente adsorvidas, e favorece a agregação por meio de interações eletrostáticas entre os grupos funcionais do aminoácido. A Figura 48 mostra o esquema da ligação entre as nanopartículas propostas pelos trabalhos citados.

Figura 48 - esquema da ligação entre os grupos funcionais COO^- e NH_3^+ livres dos aminoácidos, responsáveis pela agregação das nanopartículas. Adaptado de²³⁰.



Uma vez observado que a L-cisteína se liga às nanopartículas, realizou-se um estudo de agregação em função da temperatura e do tempo. Para isso, foram obtidos espectros de extinção no UV-Vis das AuNPs na ausência e presença L-cisteína nas temperaturas de 24, 37 e 50 °C. Apesar de a concentração de 9×10^{-6} mol/L do aminoácido ter se mostrado promissora nos testes iniciais, a complexidade do sistema e sua sensibilidade a pequenas variações experimentais dificultaram a reprodução exata dessa condição. Assim, antes da realização dos ensaios sistemáticos, foram conduzidas varreduras de concentrações de L-cisteína com o objetivo de definir a condição experimental mais adequada para os estudos. Portanto, os estudos em diferentes temperaturas foram conduzidos utilizando $1,7 \times 10^{-5}$ mol/L do aminoácido, sendo essa concentração que se mostrou mais favorável na varredura. A Figura 49 mostra os espectros de extinção para as nanopartículas na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de L-cisteínas nos tempos de 10, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos nas temperaturas de 24 (Figura 49-A), 37 (Figura 49-B) e 50 °C (Figura 49-C).

Figura 49 - espectros de extinção no UV-vis das AuNPs na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de L-cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C.



A Figura 49 mostra o papel da temperatura na estabilidade e na agregação das AuNPs na presença de L-cisteína. Em baixas temperaturas (24 °C - Figura 49-A), o sistema apresenta uma banda plasmônica estreita e bem definida em ~520 nm, característica de AuNPs, que se mantêm em todos os tempos da medida. Já na presença de L-cisteína (linhas tracejadas), observa-se a tendência de aumento da absorbância na região de ~614 nm, enquanto há uma diminuição da intensidade das bandas na região de 520 nm. Tal mudança revela a possível agregação das nanopartículas, ainda que menos intensa que a observada no teste inicial (Figura 46).

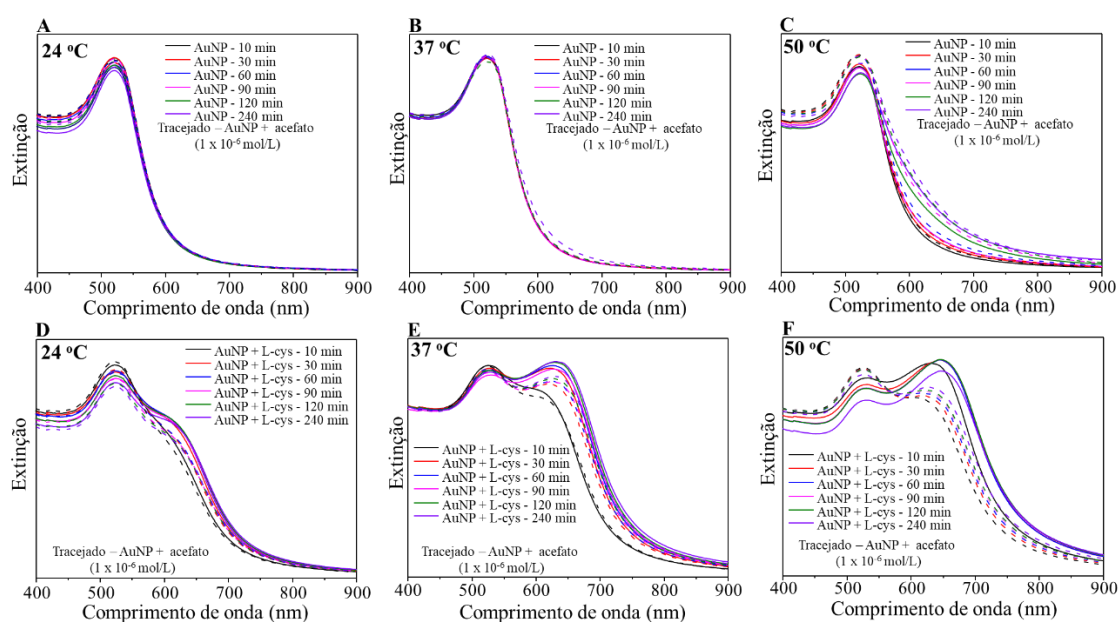
Em temperatura intermediária (37 °C – Figura 49-B), observa-se o mesmo efeito visto para os coloides em 24 °C, no entanto, com maior intensidade. Com exceção do espectro referente às AuNPs + L-cisteína em 10 minutos (linha tracejada preta), todas apresentam duas bandas bem definidas: a primeira em 520 nm e a segunda em 620 nm (30 minutos), 627 nm (60 minutos), 630 nm (90 minutos), ou 633 nm (para 120 e 240 minutos). A variação da posição da segunda banda observada reflete a maior agregação das nanopartículas em função do tempo para a temperatura estudada (37 °C).

Esse efeito se torna mais evidente para a maior temperatura (50°C – Figura 49-C), na qual o aparecimento da banda em 630 nm bem definida e a diminuição da banda em 520 nm já são observadas para o tempo de 10 minutos. Esses resultados sugerem que, quanto maior a temperatura do sistema, mais rápido é o processo de agregação induzido pela L-cisteína e está de acordo com o esperado: a influência da temperatura e do tempo na agregação das AuNPs é discutida por Dutta *et al.*²³⁴ para AuNPs sem modificações em sua superfície. Nesse estudo, os autores removeram o excesso de citrato das nanopartículas e as submeteram a temperaturas de 20, 30, 40, 50 e 60 °C por 35 minutos, observando que há maior grau de agregação em temperaturas mais elevadas. Nesse sentido, o aumento da temperatura aumenta a frequência de colisões entre as nanopartículas, fazendo com que as mesmas se agreguem mais rapidamente. Além disso, Rabbani *et al.*²³³ também observaram, para AuNPs modificadas com L-cisteína, a agregação depende do tempo, se tornando mais intensa para maiores intervalos de tempo.

O mesmo estudo de agregação em função do tempo e da temperatura foi realizado para os sistemas contendo AuNP na presença de acefato e na presença de L-cisteína e acefato. A Figura 50 mostra os gráficos de extinção no UV-Vis para esses sistemas, dispostos da seguinte forma: Figuras 50 A-C – espectros de extinção das AuNPs na ausência e presença de acefato (1×10^{-6} mol/L), nos tempos de 10, 30, 60, 90, 120 e 240

minutos para as temperaturas de 24, 37 e 50 °C; Figuras 50 D-F - espectros de extinção AuNP + L-cisteína na ausência e presença de acefato (1×10^{-6} mol/L), nos tempos de 10, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos para as temperaturas de 24, 37 e 50 °C.

Figura 50 - A-C: espectros de extinção no UV-vis das AuNPs na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de acefato (1×10^{-6} mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C; D-F: espectros de extinção no UV-vis das AuNPs + L-cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) na ausência (linhas contínuas) e presença (linhas tracejadas) de acefato (1×10^{-6} mol/L) nas temperaturas de (A) 24, (B) 37 e (C) 50 °C.



Ao analisar os espectros da Figura 50, observa-se inicialmente que, nas Figuras 50 A-B, o perfil da banda de extinção das AuNPs não apresentou mudanças significativas quando na presença de acefato, possuindo o mesmo pico em 520 nm, observado nos espectros de AuNPs pura. Já nos espectros da Figura 50-C, nota-se uma tendência de deslocamento para maiores comprimentos de onda, sugerindo o começo do processo de agregação das nanopartículas devido ao aumento de temperatura do sistema (50 °C). Entretanto, como não se observou mudança significativa na posição das bandas dos espectros de extinção das AuNPs na presença de acefato (linhas tracejadas), os resultados

sugerem que o pesticida não exerce influência significativa no processo de agregação das AuNPs.

Por outro lado, ao comparar os resultados das Figuras 50 D–F, nas quais as nanopartículas estavam na presença de L-cisteína antes da adição do pesticida, observa-se que a presença de acefato influencia na agregação das mesmas. Embora ainda se observe mudanças na extinção das AuNPs + L-cisteína, principalmente para o sistema em maior temperatura (Figura 50-F), quando adicionado o pesticida (linhas tracejadas), é notada a tendência de inibição da agregação, dada pela menor intensidade das bandas em maiores comprimentos de onda. Esse efeito pode estar relacionado à interação entre o acefato e os grupos NH_3^+ e COO^- da cisteína presente na superfície das nanopartículas, impedindo a agregação das AuNPs. Para analisar essa hipótese, espectros ATR - FT-IR foram obtidos para a L-cisteína, acefato, e para a mistura das duas moléculas, dispostas na Figura 51, com os devidos modos vibracionais explícitos na Tabela 6.

Figura 51 - espectros de FT-IR do acefato (preto), da L-cisteína (vermelho) e da mistura acefato + L-cisteína (azul), registrados na faixa de 3800–650 cm^{-1} .

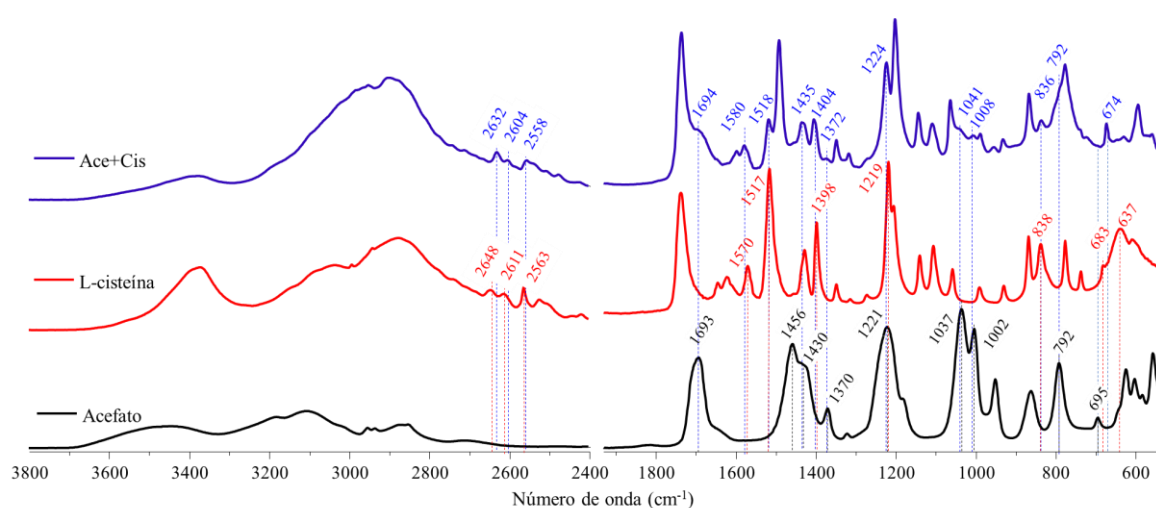


Tabela 6: modos vibracionais dos espectros FT-IR referentes ao acefato, L-cisteína e mistura Ace+Cis

Acefato	L-cisteína	Ace+Cis	Modos vibracionais
-	637	629/647	ν CS
695	-	695	C-S
792	-	792	C-H
-	838	836	δ COO ⁻
1002	-	1008	C=C
1037	-	1041	C-N
-	1219	1224	ν CO, δ OH (COOH)
1221	-	1224	P=O
1370	-	1372	N-C
-	1398	1404	ν_s COO ⁻
1430	-	1435	N-H
1456	-	-	β CH ₃
-	1517	1518	γ NH ₃ ⁺
-	1570	1580	δ NH ₃ ⁺ , ν_{as} COO ⁻
1693	-	1694	C=O
-	2563	2558	ν SH
-	2611	2604	ν CH ₂
-	2648	2632	ν CH ₂

Inicialmente, nota-se que os espectros para o acefato e para a L-cisteína possuem bandas características de ambos os componentes, consistente com os reportados na literatura^{225,232,235-239}. No espectro referente à mistura Ace+Cis, quando comparado ao espectro do aminoácido, são observados deslocamentos em bandas associadas à forma zwitteriônica da L-cisteína. A banda do estiramento simétrico $\nu_s(\text{COO}^-)$ desloca-se de 1398 para 1404 cm⁻¹, enquanto a banda associada ao modo $\delta(\text{NH}_3^+)$, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ desloca-se de 1570 para 1580 cm⁻¹. Além disso, a banda $\gamma(\text{NH}_3^+)$ apresenta diminuição na intensidade. Tais deslocamentos são reportados como consequência de mudanças no

ambiente ao redor dos grupos, bem como interações entre os mesmos. Min'kov *et al.*²⁴⁰, em um estudo envolvendo a interação entre L e D-cisteína, sugere que o deslocamento das bandas referentes ao NH_3^+ para menores comprimentos de onda indicam interações entre os grupos livres da molécula por meio ligações de hidrogênio mais fortes, i.e., menor liberdade de vibração desses grupos. Portanto, os deslocamentos aqui observados indicam o enfraquecimento das interações envolvendo esse grupo.

Esse resultado é coerente com o mecanismo proposto para o sensor colorimétrico, no qual o acefato interage com os grupos NH_3^+ e COO^- da cisteína, inibindo o potencial de agregação das nanopartículas.

A fim de averiguar o diâmetro e a carga superficial da AuNPs, foram realizados experimentos de DLS (espalhamento dinâmico de luz) e potencial zeta para o sistema puro, na presença de L-cisteína e na presença do aminoácido e de acefato (1×10^{-6} mol/L). A Figura 52-A mostra os gráficos de DLS e a Tabela 7 mostra os valores de DLS e potencial zeta. Além disso, imagens de TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão) dos três sistemas estão dispostos na Figura 52-B.

Figura 52 - (A) diâmetros e (B) imagens de TEM das nanopartículas puras (em preto), na presença de L-cisteína (vermelho) e na presença de L-cisteína e acefato (azul). Barras de escala – 200 nm.

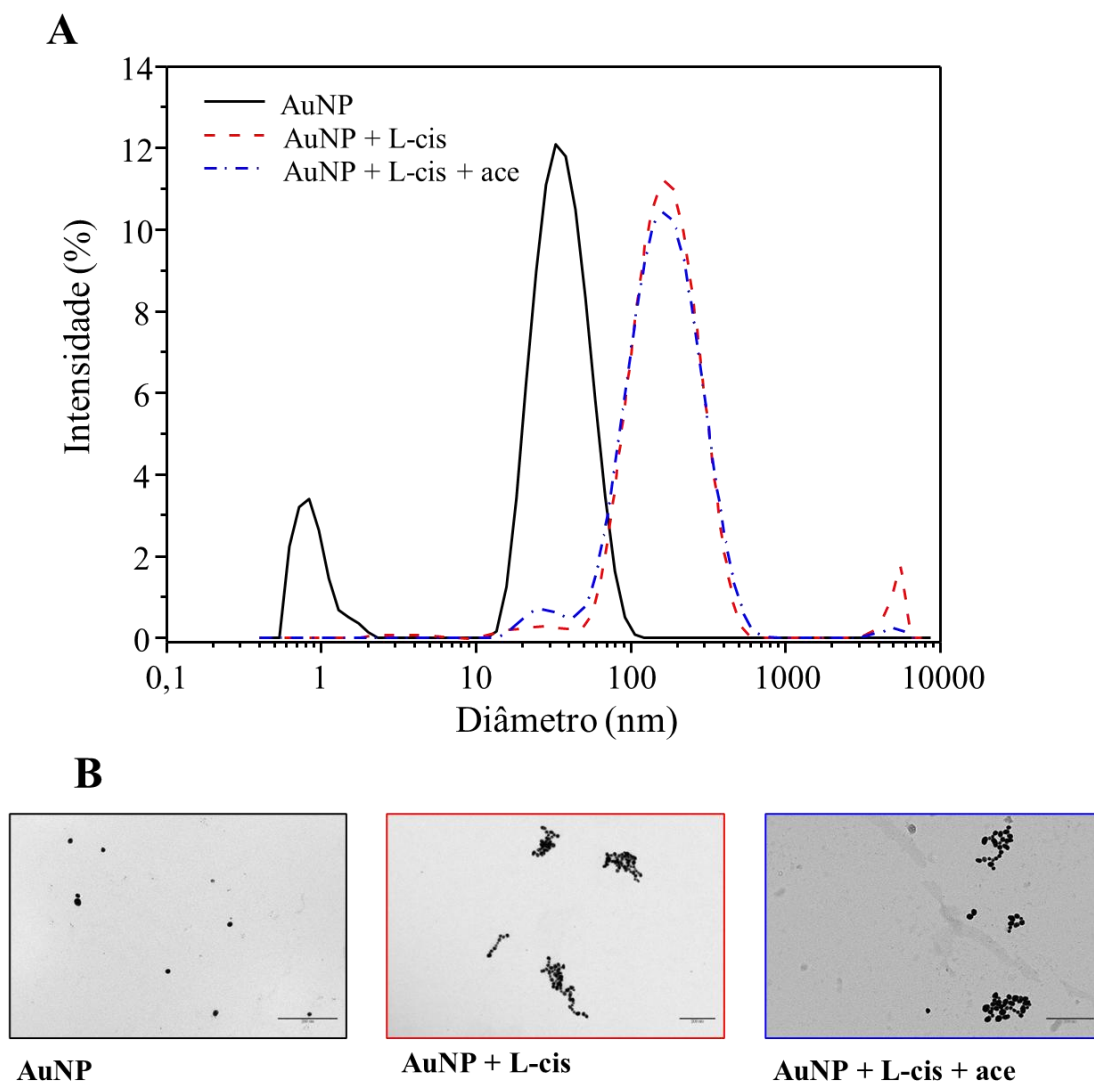


Tabela 7: valores de diâmetro, Pdl e potencial zeta das AuNPs puras, na presença de cisteína e na presença de cisteína+acefato

Sistema	DLS (contribuição em % da intensidade) (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
AuNP pura	37,9 ± 14,9 (85,3%) 0,9 ± 0,3 (14,7 %)	0,677	-16,4 ± 3,7
AuNP+L-cisteína	183,5 ± 83 (94,1 %) 26,4 ± 9,4 (2,1%) 5095 ± 588,1 (3,2 %)	0,455	-33,7 ± 1,5
AuNP+L-cis+acefato	185,3 ± 95,1 (95,2 %) 29,3 ± 8,1 (4,1 %) 4799 ± 725,0 (0,8 %)	0,390	-34,9 ± 1,4

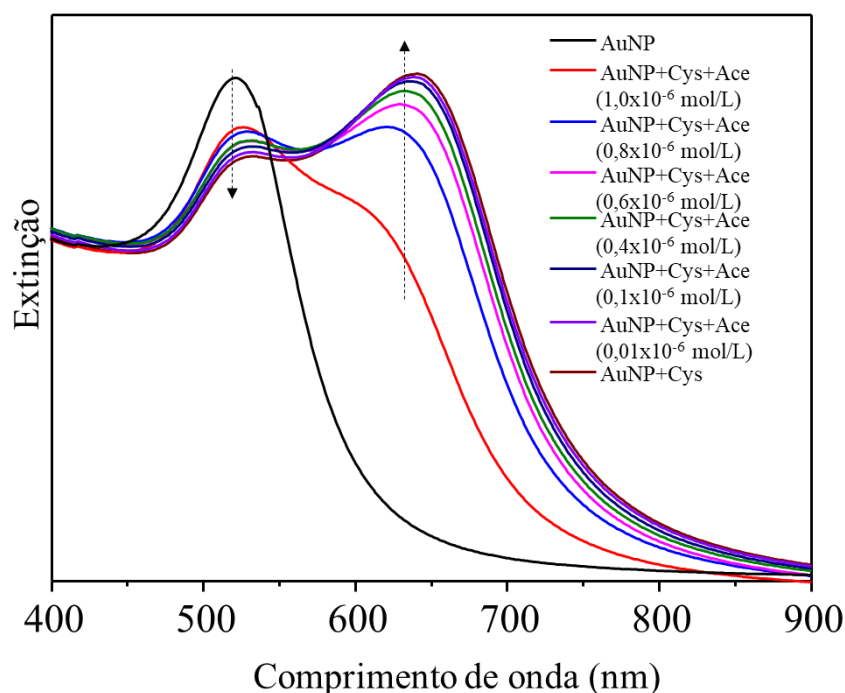
Inicialmente, nota-se pela Figura 52 e pelos valores na Tabela 7 que as AuNPs puras possuem o diâmetro ($37,9 \pm 14,9$ nm) e o valor de potencial zeta ($-16,4 \pm 3,7$ mV) condizentes com trabalhos na literatura^{241,242}. Na presença de L-cisteína, o valor do diâmetro aumenta para $187,5 \pm 10$ nm, com contribuição dominante desse pico (94,1% da intensidade), enquanto o potencial zeta diminui para $-33,7 \pm 1,5$ mV. O aumento do diâmetro das nanopartículas está condizente com o estado de agregação das mesmas, uma vez que *clusters* das nanopartículas são observadas para esse sistema (Figura 52-B)²²⁴. Além disso, há contribuição de mais dois picos presentes na medida ($26,4 \pm 9,4$ nm - 2,1% - e $5095 \pm 588,1$ nm - 3,2 %). Já para as AuNPs+L-cisteína na presença de acefato, o potencial zeta permanece semelhante ($-34,9 \pm 1,4$ mV), porém observa-se aumento da contribuição relativa ao pico correspondente aos menores diâmetros ($29,3 \pm 8,1$ nm - 4,1 %). Esses resultados indicam que o acefato atua inibindo parcialmente a agregação

induzida pela L-cisteína, reduzindo a formação de *clusters* de maior tamanho sem promover alterações significativas na carga superficial das nanopartículas.

De modo geral, os resultados sugerem que a L-cisteína, em conjunto com a temperatura e o tempo, atua como fator que favorece a agregação das nanopartículas, enquanto a presença de acefato inibe a agregação. Portanto, a fim de obter uma detecção rápida do pesticida, foi selecionada a temperatura de 50 °C, no tempo de 10 minutos para a continuação dos experimentos, uma vez que esses parâmetros se mostram adequados para o método colorimétrico.

A fim de averiguar a sensibilidade do sistema ao pesticida, foi realizada a obtenção dos espectros UV-Vis das AuNPs já na presença de L-cisteína (adição do aminoácido seguido por 10 segundos em agitação vórtex), adicionando-se acefato logo em seguida em concentrações diferentes, uma para cada amostra distinta, levando o sistema mais uma vez para a agitação por 10 segundos. Foram escolhidas as concentrações de 1×10^{-6} mol/L, $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,6 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,4 \times 10^{-6}$ mol/L, $0,1 \times 10^{-6}$ mol/L e $0,01 \times 10^{-6}$ mol/L. A Figura 53 mostra tais espectros, em conjunto com os referentes ao coloide puro e ao coloide na presença de L-cisteína.

Figura 53 - espectros de extinção no UV-vis das AuNPs ligadas à cisteína ($1,7 \times 10^{-5}$ mol/L) na presença de acefato em diferentes concentrações. As setas indicam a diminuição e o aumento das bandas plasmônicas.



Os espectros UV-Vis presentes na Figura 53 exibem a banda plasmônica característica das AuNPs centrada em aproximadamente 520 nm, já observada anteriormente. Na presença de L-cisteína (curva roxa), observa-se redução da intensidade dessa banda acompanhada por aumento da absorbância em 640 nm, condizente com a agregação coloidal. Em termos de sensor colorimétrico, essa agregação promove a mudança da coloração vermelho-rubi (partículas dispersas) para tons roxos/azuis (agregados). Nesse sentido, qualquer mudança na coloração e, por consequência, na banda plasmônica, se deve à adição do analito alvo, nesse caso, o acefato. A mudança de extinção em função de maior agregação em sensores colorimétricos é comum na literatura, como o visto por Unabia *et al.*²⁴³ para AuNPs funcionalizadas com dopamina na detecção de histamina, por Iglesias²⁴⁴ para AuNPs na detecção de nucleobases e por

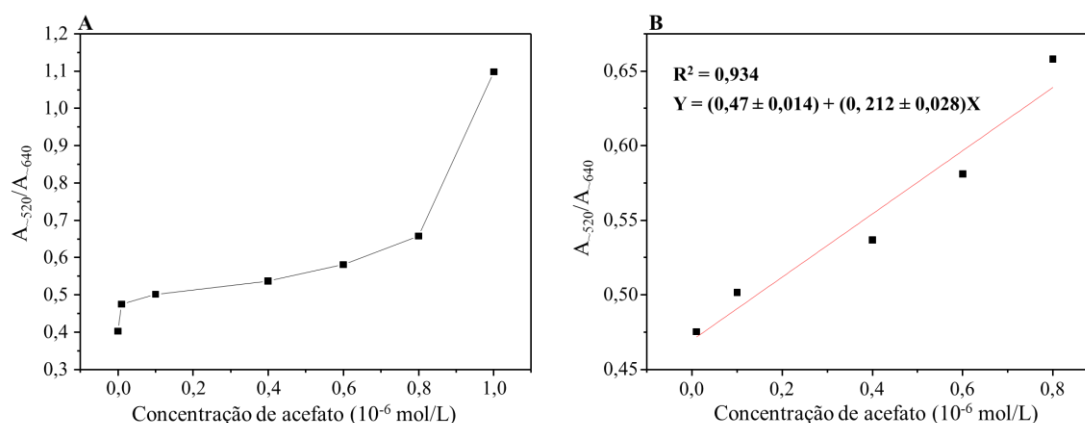
Thongkam *et al.*²⁴⁵ para um sistema híbrido de AuNP, AgNP (nanopartículas de prata) e timina na detecção de íon de cobre.

Entretanto, ao avaliar o efeito do acefato, observa-se um comportamento inverso aos observados em sensores colorimétricos tradicionais. Como verificado anteriormente, a presença do pesticida inibe a agregação das nanopartículas, o que também é notado na Figura 53. Nesse sentido, à medida que a concentração de acefato aumenta, a intensidade da banda acima de 600 nm diminui progressivamente, enquanto a contribuição da banda em 520 nm é aumentada. Esse resultado sugere que o sistema aqui proposto caracteriza um mecanismo de sensor colorimétrico baseado na inibição de agregação. Tal sensor, diferentemente dos colorimétricos tradicionais, avalia a diminuição da banda correspondente à agregação das nanopartículas em função da concentração do analito. Mao *et al.*²⁴⁶, por exemplo, utilizam AgNPs para a detecção de cisteína, utilizando íon de chumbo como agente anti-agregador. Trabalhos utilizando a cisteína como agente agregador também são encontrados para sensores que se baseiam na inibição da agregação. Ding *et al.*²⁴⁷, por exemplo, utilizam o aminoácido como agente agregador de AuNPs na detecção de íons de mercúrio, que inibem tal agregação. Liu *et al.*²⁴⁸, a fim de detectar peróxido de hidrogênio, usam íons de ferro a fim de catalisar a oxidação da cisteína, prevenindo assim, a agregação das AuNPs. Portanto, nota-se que o mecanismo é pertinente na detecção de contaminantes. Tal estudo não foi continuado para o diuron uma vez que os resultados não mostraram a dependência da agregação em função da concentração do pesticida.

A fim de obter os valores do Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ), um gráfico de A_{520}/A_{640} vs concentração do analito foi analisado, onde A_{520} e A_{640} são os valores de absorvância obtido de cada comprimento de onda próximos aos valores de 520 e 640 nm. Os valores variam devido à tendência do

deslocamento das bandas de cada curva. A Figura 54 é composta pelo gráfico descrito acima (A) e pelo regime linear utilizado para posteriores cálculos (B).

Figura 54 - (A) valores da razão $A_{\sim 520}/A_{\sim 640}$ em função da concentração de acefato e (B) aproximação dos valores obtidos no regime linear de $0,01$ à $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L, juntamente com a equação da reta obtida após o *fitting* dos pontos.



Inicialmente, observa-se na Figura 54-A que o aumento da concentração de acefato promove aumento do valor da razão $A_{\sim 520}/A_{\sim 640}$, indicando diminuição da contribuição associada à agregação (intensidades ~ 640 nm). Esse comportamento confirma que a inibição de agregação das AuNPs com L-cisteína pelo acefato é associada à concentração do mesmo, isto é, quanto maior a concentração do pesticida, menos agregado é o coloide. Nota-se também nesta figura que a faixa de concentração do pesticida entre $0,01$ e $0,8 \times 10^{-6}$ mol/L apresenta comportamento aproximadamente linear, enquanto os pontos correspondentes a 0 e $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L desviam da linearidade. Portanto, essa faixa de concentração foi utilizada como regime linear para se obter o LOD e o LOQ do sistema (Figura 54-B).

Nesse sentido, o LOD é o valor referente à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não quantificada, i.e., a medida apresenta um resultado referente

à presença do pesticida, mas sem permitir inferir sua concentração de forma precisa. Já o LOQ revela a mínima concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão no sistema²⁴⁹. Portanto, os limites podem ser obtidos utilizando as seguintes equações: $LOD = 3,3.\sigma/S$ e $LOQ = 10.\sigma/S$, onde σ e S são parâmetros obtidos na própria curva de calibração. Esses valores são representados na equação da reta obtida na Figura 54-B: $Y = (0,47 \pm 0,014) + (0,212 \pm 0,028)X$, onde σ (desvio padrão da resposta) é obtido pelo desvio padrão do coeficiente linear (0,014, neste caso) e S (*slope*) é o coeficiente angular da reta (0,212, neste caso). O valor obtido para o LOD e LOQ para esses valores foram, respectivamente, $2,18 \times 10^{-7}$ mol/L e $6,60 \times 10^{-7}$ mol/L, revelando a sensibilidade do sistema para o acefato na ordem de 10^{-7} .

A fim de comparar o LOD aqui obtido, valores encontrados na literatura para métodos de detecção por calorimetria estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8: valores de LOD para diferentes sensores colorimétricos na detecção de acefato

Tipo de medida	Substrato	Método/Mecanismo	LOD	Ano	Ref.
Absorbância	<i>Nanopartículas magnéticas de ferro (MNP)</i>	Inibição de peroxidase promovida pelas MNP na presença de Acetilcolinesterase	5×10^{-6} mol/L	2013	250
Fluorescência	<i>Sonda de 1,8-naftalimida</i>	Produção de H_2O_2 por meio de ação enzimática	$1,16 \times 10^{-9}$ g/L ($\sim 6,3 \times 10^{-12}$ mol/L)	2016	251
Extinção	<i>AuNPs reduzida com citrato</i>	Vórtex (5 minutos)	$3,46 \times 10^{-7}$ mol/L	2018	252
Fluorescência e extinção	Compósitos de MnO_2 -AuNCs- SiO_2	Inibição da decomposição dos compósitos	$0,4 \times 10^{-6}$ g/L ($2,2 \times 10^{-9}$ mol/L - fluorescência) e $0,09 \times 10^{-6}$ g/L ($4,9 \times 10^{-10}$ mol/L - absorbância)	2020	253
Fluorescência e aplicativo Sensor Photo (fotos)	<i>AuNCs@ZIF-8</i>	Inibição de Acetilcolinesterase	$0,4 \times 10^{-6}$ g/L ($2,2 \times 10^{-9}$ mol/L)	2021	254
Imageamento	<i>AuNP modificada com aptâmeros</i>	Agregação com sulfato de magnésio	6×10^{-8} mol/L	2021	255
Extinção	<i>imidazolato zeolítico em forma de flor com enzimas (AChE/CHO/HRP @ZIF-8)</i>	Inibição de Acetilcolinesterase	$2,3 \times 10^{-10}$ mol/L	2022	256
Fluorescência	<i>Quantum dots de carbono</i>	Inibição de Acetilcolinesterase	0,052 ppb ($2,8 \times 10^{-10}$ mol/L)	2022	257
Sinal triplo (extinção, espalhamento e fluorescência)	Solução-Sensor (AuNP+quantum dots+nitrato de prata)	Modulação do sinal pela adição de ácido ascórbico	21×10^{-9} g/mL ($1,14 \times 10^{-7}$ mol/L – extinção); 16×10^{-9} g/mL ($8,7 \times 10^{-8}$ mol/L – fluorescência); e 10×10^{-9} g/mL ($5,5 \times 10^{-8}$ mol/L – espalhamento)	2022	258
Extinção	Compósitos de <i>AuPtPd@COFs</i>	Inibição da degradação de ácido ascórbico/ ação antioxidante do ácido arcórbico	$2,3 \times 10^{-9}$ g/mL ($1,25 \times 10^{-8}$ mol/L)	2026	259

Quando comparado aos valores reportados na literatura para sensores colorimétricos de acefato (Tabela 8), observa-se que o valor obtido no sistema desenvolvido para este trabalho se situa na mesma ordem de grandeza daqueles baseados em espectroscopia de extinção ($\sim 10^{-7}$ mol/L). Dentre os LODs disponíveis na literatura, encontram-se valores que variam entre $3,46 \times 10^{-7}$ mol/L, $1,25 \times 10^{-8}$ mol/L e $1,14 \times 10^{-7}$ mol/L para sistemas medidos por extinção, semelhantes ao observado neste trabalho. Embora haja limites da ordem de grandeza de 10^{-9} e 10^{-10} mol/L, esses valores geralmente estão associados a estratégias que envolvem etapas adicionais de amplificação de sinal, como funcionalizações mais complexas do substrato ou técnicas instrumentais de maior sensibilidade. Nesse contexto, embora o sensor aqui desenvolvido não atinja esses limites, seu desempenho é comparável a abordagens colorimétricas convencionais, apresentando simplicidade operacional e ausência de etapas adicionais ou funcionalizações complexas para a aplicação. Assim, o sistema proposto demonstra sensibilidade adequada para aplicações preliminares.

Capítulo 8

Conclusão

Conclusão

Interação entre pesticidas e sistemas miméticos da membrana celular: os resultados indicam que os pesticidas acefato e diuron, assim como sua mistura, apresentam uma interação preferencial com os grupos polares das cabeças da monocamada lipídica ternária. O POPC desempenha o papel principal nessa interação, uma vez que apresenta um efeito semelhante nas isotermas π -A em comparação com o sistema POPC/Col/SM e está presente em maior proporção na mistura lipídica (70% em molar). A partir dos dados de PM-IRRAS, verificou-se que o acefato, o diuron e sua mistura são atraídos pelo grupo colina no POPC e na esfingomielina na monocamada ternária, além de causar perturbações na cauda hidrofóbica. Esses resultados são consistentes com a modelagem molecular do POPC na presença de acefato e diuron, que indicou uma interação íon-dipolo entre os grupos polares das cabeças do POPC e da SM com os pesticidas. No entanto, observou-se uma interação mais forte com os grupos polares das cabeças na subfase contendo o coquetel, já que a mistura de pesticidas induz mudanças na orientação e conformação da estrutura O-C-C-N presente no grupo colina (de *trans* para *gauche*) e promove um maior desordenamento das cadeias de hidrocarbonetos. Isso indica uma interação sinérgica do coquetel com as monocamadas de POPC/Col/SM, que também são associadas às mudanças morfológicas observadas nas imagens de BAM.

Com relação às bicamadas, nem a morfologia nem a permeabilidade das GUVs foram afetadas pela adição de acefato, diuron ou sua combinação. No entanto, o número total de vesículas contadas após 30 minutos de exposição à mistura de pesticidas foi reduzido significativamente (40%). Para as vesículas expostas durante a formação, o número total de vesículas foi 24% menor do que no controle, indicando que a mistura de pesticidas interfere negativamente na formação das GUVs. Além disso, 27 % das

vesículas formadas na presença de coquetel apresentaram formato prolato. Os resultados de ITC mostram baixos valores de constantes de partição para o diuron em bicamadas de POPC e SM, enquanto não foi indicada interação significativa entre o acefato com as LUVs. Resultados complementares de dinâmica molecular indicaram que os pesticidas interagem preferencialmente com a região superficial da bicamada, permanecendo próximos aos grupos polares lipídicos, corroborando os resultados de PM-IRRAS. Essa localização pode estar associada aos baixos valores de partição entre os pesticidas e as LUVs observados experimentalmente para o ITC e à falta de mudanças morfológicas significativas para as GUVs no tempo de exposição de 30 minutos. Já para os experimentos *in vitro*, uma menor viabilidade celular é observada nas células expostas ao diuron e ao coquetel para tempos de exposição maiores que 24h, sugerindo que o efeito citotóxico requer tempo de exposição superior àquele investigado para as GUVs (30 minutos). Tal resultado pode estar ligado ao fato do diuron possuir maior afinidade com a bicamada/membrana celular, interagindo de forma mais significativa com a mesma e, assim, possuindo maior toxicidade. Já com relação ao coquetel, um efeito mais pronunciado é observado na exposição da mistura ao comparar com o valor da média dos pesticidas isolados, indicando que a mistura ace/diu pode afetar sinergicamente as células.

Deteção do pesticida acefato via sensor colorimétrico: com relação à detecção do pesticida acefato, é importante frisar que estava previsto a detecção dos pesticidas via SERS utilizando AuNPs funcionalizadas com CTAB. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios para esse sistema. A tentativa de agregar as AuNPs na presença do pesticida com L-cisteína também foi realizada, e, novamente, não foi obtido sucesso na detecção via SERS. Portanto, uma técnica colorimétrica utilizando AuNPs e L-cisteína sugerida na realização do estágio no exterior foi empregada para este trabalho. Tais resultados mostraram que o acefato atua no sistema AuNP+L-cisteína inibindo a

agregação estimulada pelo aminoácido. Essa característica aponta para um sensor colorimétrico baseado na inibição de agregação, diferente de sistemas já estabelecidos. Nesse sentido, o sensor aqui proposto revela a dependência da inibição com a concentração do pesticida, permitindo assim a construção de uma curva analítica. O LOD e o LOQ calculados ($2,18 \times 10^{-7}$ mol/L e $6,60 \times 10^{-7}$ mol/L, respectivamente) se encontram na ordem de grandeza de outros sistemas já reportados, demonstrando a sensibilidade adequada do sensor para usos preliminares.

Em resumo, um efeito sinérgico foi observado para a mistura de acefato e diuron nos modelos de biomembranas compostos por POPC/Col/SM, conforme sugerem os resultados de monocamadas e bicamadas lipídicas, bem como pelos estudos *in vitro*. Esses resultados revelam que um impacto mais pronunciado pode ser esperado quando a membrana celular é exposta ao coquetel, levando a consequências mais graves para a saúde humana. Além disso, o sistema de detecção proposto mostrou-se eficiente na identificação de acefato, com sensibilidade para concentrações da ordem de 10^{-7} mol/L, demonstrando que a inibição da agregação de nanopartículas de ouro pode ser explorada no desenvolvimento de sensores colorimétricos.

Referências

1. Santana Junior, J. P. de, Oliveira, F. S. de, Rosa, L. D. J., Figueiredo Neto, A. & Oliveira, F. J. V. de. Tecnologia de drones na agricultura: um estudo sobre a pulverização e suas aplicações. *Sci. Electron. Arch.* **18**, 1–4 (2024).
2. Menechini, W., Maggi, M. F., Jadoski, S. O., Leite, C. D. & Camicia, R. da M. Aerial and ground application of fungicide in corn second crop on diseases control. *Eng. Agric.* **37**, 116–127 (2017).
3. Kolln, A. M., Kolln, F. T. & Veloso, W. R. EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM ATIVIDADES AGRÍCOLAS DA AMAZÔNIA SUL OCIDENTAL. **10**, 112–119 (2023).
4. Quandahor, P. *et al.* Effects of Agricultural Pesticides on Decline in Insect Species and Individual Numbers. *Environments* **11**, 182 (2024).
5. Vasconcelos, Y. Agrotóxicos na berlinda. in *Pesquisa Fapesp* vol. 27 18–19 (2018).
6. Parente, T. C., Queiroz, S. C. do N. & Filho, J. T. A aplicação manual de atrazina em parcelas experimentais e suas perdas por escoamento superficial de água. *Bol. Campineiro Geogr.* **12**, 321–338 (2022).
7. Pereira, B. de F. M., Alves, B. M., Medeiros, M. P. & Pereira, R. M. Contaminação No Lençol Freático, Rios, Lagos E Lagoas Do Brasil Por Agrotóxicos. *Rev. Ibero-Americana Humanidades, Ciências e Educ.* **8**, 863–874 (2022).
8. Pereira, A. K. S. *et al.* The Socio-Environmental and Human Health Problems Related to the Use of Pesticides and the Use of Advanced Oxidative Processes for Their Degradation: Brazil. *Water* **15**, 1608 (2023).

9. Basso, C., Siqueira, A. C. F. & Richards, N. S. P. dos S. Impactos na saúde humana e no meio ambiente relacionados ao uso de agrotóxicos: Uma revisão integrativa. *Res. Soc. Dev.* **10**, e43110817529 (2021).
10. Faria, N. M. X., Fassa, A. G. & Facchini, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Cien. Saude Colet.* **12**, 25–38 (2007).
11. Heinrich Boll Stiftung. Atlas dos Agrotóxicos - Fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura. 68 (2024).
12. Sood, P. Pesticides Usage and Its Toxic Effects—a Review. *Indian J. Entomol.* **86**, 339–347 (2024).
13. Ascom/ANVISA. Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US (2019).
14. ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. *Agência Nac. Vigilância Sanitária* 136 (2019) doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
15. ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório dos resultados das análises de amostras monitoradas nos ciclos 2018-2019 e 2022. *Agência Nac. Vigilância Sanitária* (2023).
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Índice Monográfico A2 -*

- Acefato*. (2025).
17. S.A., C. A. *ACEFATO CCAB 750 SP – Bula do produto*. (2024).
 18. Ltda., A. I. e C. *ACEFATO FERSOL 750 SP – Bula do produto*. (2024).
 19. Palkhade, R., Yadav, S., Mishra, S. & Muhamed, J. Acute oral toxicity of pesticide combination (acephate 50% and imidacloprid 1.8% as active ingredients) in Sprague-Dawley rats. *Vet. World* **11**, 1291–1297 (2018).
 20. Gholivand, K., Ebrahimi Valmoozi, A. A., Mahzouni, H. R., Ghadimi, S. & Rahimi, R. Molecular Docking and QSAR Studies: Noncovalent Interaction between Acephate Analogous and the Receptor Site of Human Acetylcholinesterase. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6776–6785 (2013).
 21. Caballero, L. Acefato: conheça os perigos desse inseticida. <https://www.ecycle.com.br/acefato/> (2022).
 22. Mufti, A. *et al.* Maternal Exposure to Acephate Caused Nephrotoxicity in Adult Offspring Rats Mediated by Excessive Autophagy Activation, Oxidative Stress Induction, and Altered Epithelial Sodium Channel and Na⁺/K⁺-ATPase Gene Expression. *Biology (Basel)*. **12**, 162 (2023).
 23. PETTER, F. A. *et al.* Biochar Increases Diuron Sorption and Reduces the Potential Contamination of Subsurface Water with Diuron in a Sandy Soil. *Pedosphere* **29**, 801–809 (2019).
 24. ANVISA. *Índice Monográfico D25 - Diurom*. (2024).
 25. S/A, N. *DIURON NORTOX 500 SC – Bula do produto*. (2020).
 26. Ltda, R. D. A. *DIURON 500 SC RAINBOW – Bula do produto*. (2023).

27. Trudeau, V. L. *et al.* Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Mol. Cell. Endocrinol.* **513**, 110861 (2020).
28. Huovinen, M., Loikkanen, J., Naarala, J. & Vähäkangas, K. Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicol. Vitro.* **29**, 1577–1586 (2015).
29. Lima, T. R. R., Martins, A. C., Pereira, L. C. & Aschner, M. Toxic Effects Induced by Diuron and Its Metabolites in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotox. Res.* **40**, 1812–1823 (2022).
30. Singh, A. K., White, T., Spassova, D. & Jiang, Y. Physicochemical, Molecular-Orbital and Electronic Properties of Acephate and Methamidophos. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **119**, 107–117 (1998).
31. Spassova, D., White, T. & Singh, A. K. Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **126**, 79–89 (2000).
32. Santos, R. R. dos. Predição de coeficiente de partição octanol-água por deep learning a partir de descritores físico-químicos, de fragmentos e topológicos. (Universidade Federal de Santa Maria, 2026).
33. Librando, V., Sarpietro, M. G., Cascone, C., Minniti, Z. & Castelli, F. Time-Dependent Absorption Evidence of Phenylurea-Derived Herbicides on Model Biomembranes: A DSC Study. *Environ. Chem.* **2**, 63 (2005).
34. Shaw, I. C. Chemical residues, food additives and natural toxicants in food – the cocktail effect. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 2149–2157 (2014).
35. Połec, K., Wyżga, B., Olechowska, K. & Hąc-Wydro, K. On the

- synergy/antagonism of selected terpenes in the effect on lipid membranes studied in model systems. *J. Mol. Liq.* **349**, 118473 (2022).
36. Pal, E. *et al.* Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. *Toxics* **10**, 104 (2022).
 37. Sol Dourdin, T. *et al.* Molecular and phenotypic effects of early exposure to an environmentally relevant pesticide mixture in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* **326**, 121472 (2023).
 38. Diepens, N. J. *et al.* Toxicity effects of an environmental realistic herbicide mixture on the seagrass *Zostera noltei*. *Environ. Pollut.* **222**, 393–403 (2017).
 39. Zee, S. *et al.* Cocktail effects of clothianidin and imidacloprid in zebrafish embryonic development, with high and low concentrations of mixtures. *Front. Toxicol.* **6**, 1–10 (2024).
 40. Karp, G. The Structure and Function of the Plasma Membrane. in *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* 120–177 (Wiley, 2013).
 41. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-.)*. **175**, 720–731 (1972).
 42. Nicolson, G. L. & Ferreira de Mattos, G. The Fluid–Mosaic model of cell membranes: A brief introduction, historical features, some general principles, and its adaptation to current information. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1865**, 184135 (2023).
 43. Simons, K. & Van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202 (1988).

44. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
45. Levental, I., Levental, K. R. & Heberle, F. A. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol.* **30**, 341–353 (2020).
46. Lorent, J. H. *et al.* Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 644–652 (2020).
47. Ingólfsson, H. I. *et al.* Lipid Organization of the Plasma Membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14554–14559 (2014).
48. Alberts, B. *et al.* *Biologia molecular da célula. Biologia Molecular da Célula* (Artmed, 2017).
49. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
50. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).
51. Bezlyepkina, N., Gracià, R. S., Shchelokovskyy, P., Lipowsky, R. & Dimova, R. Phase Diagram and Tie-Line Determination for the Ternary Mixture DOPC/eSM/Cholesterol. *Biophys. J.* **104**, 1456–1464 (2013).
52. Cavalcanti, R. R. M., Lira, R. B., Ewins, E. J., Dimova, R. & Riske, K. A. Efficient liposome fusion to phase-separated giant vesicles. *Biophys. J.* **122**, 2099–2111 (2023).
53. Sapon, K., Manka, R., Janas, T. & Janas, T. The role of lipid rafts in vesicle formation. *J. Cell Sci.* **136**, (2023).

54. Dynarowicz-Latka, P., Wnętrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A. & Maliugin, V. Mimicking nature: Models of lipid membranes created with the Langmuir monolayer technique: A review of lipid membrane composition. *Biointerphases* **21**, (2026).
55. Elderdfi, M. & Sikorski, A. F. Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions. *Chem. Phys. Lipids* **212**, 61–72 (2018).
56. Miele, Y., Holló, G., Lagzi, I. & Rossi, F. Shape Deformation, Budding and Division of Giant Vesicles and Artificial Cells: A Review. *Life* **12**, 841 (2022).
57. Broniatowski, M. *et al.* Interactions of polychlorinated cyclodiene pesticides with model fungal membranes – Langmuir monolayer and liposome studies. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **702**, 134970 (2024).
58. Połec, K., Olechowska, K., Masłowiec, D., Wójcik, K. & Hąc-Wydro, K. The effect of major terpenes of the hop essential oil on the mixed monolayers and bilayers imitating bacteria membranes. In search of the natural pesticides. *J. Mol. Liq.* **327**, 114903 (2021).
59. Lemma, T., Ruiz, G. C. M., Oliveira, O. N. & Constantino, C. J. L. Disruption of giant unilamellar vesicles mimicking cell membranes induced by the pesticides glyphosate and picloram. *Biophys. Chem.* **250**, 106176 (2019).
60. Lemma, T., Marques Ruiz, G. C., Oliveira, O. N. & Constantino, C. J. L. The pesticide picloram affects biomembrane models made with Langmuir monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerphases* **181**, 953–958 (2019).
61. Rubira, R. J. G. *et al.* Biological responses to imazapic and methyl parathion pesticides in bioinspired lipid membranes and Tilapia fish. *J. Hazard. Mater.* **458**,

- 131943 (2023).
62. Cho, H. H. *et al.* Gold Nanoparticles as Exquisite Colorimetric Transducers for Water Pollutant Detection. *Appl. Mater. Interfaces* **15**, 19785–19806 (2023).
 63. Wu, Y., Feng, J., Hu, G., Zhang, E. & Yu, H.-H. Colorimetric Sensors for Chemical and Biological Sensing Applications. *Sensors* **23**, 26 (2023).
 64. Liu, Y. *et al.* A simple AuNPs-based colorimetric aptasensor for chlorpyrifos detection. *Chinese Chem. Lett.* **33**, 1913–1916 (2022).
 65. Zhu, J., Yang, B., Hao, H., Peng, L. & Lou, S. Gold nanoparticles-based colorimetric assay of pesticides: A critical study on aptamer's role and another alternative sensor array strategy. *Sensors Actuators B. Chem.* **381**, 133439 (2023).
 66. Zhao, T. *et al.* Smartphone-based colorimetric sensor array using gold nanoparticles for rapid distinguishment of multiple pesticides in real samples. *Food Chem.* **404**, 134768 (2023).
 67. Zhang, S. *et al.* L-cysteine-modified chiral gold nanoparticles promote periodontal tissue regeneration. *Bioact. Mater.* **6**, 3288–3299 (2021).
 68. Soto, K. M. *et al.* Cysteine Surface Engineering of Green-Synthesized Gold Nanoparticles for Enhanced Antimicrobial and Antifungal Activity Karen. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, 1–16 (2025).
 69. Acres, R. G., Feyer, V., Tsud, N., Carlino, E. & Prince, K. C. Mechanisms of aggregation of cysteine functionalized gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **118**, 10481–10487 (2014).
 70. Ham, S.-H., Han, M. J. & Kim, M. Chiral Materials for Optics and Electronics: Ready to Rise ? *Micromachines* **15**, 20 (2024).

71. Niu, X. *et al.* Chiral Materials: Progress, Applications, and Prospects. *Small* **19**, 50 (2023).
72. Pockels, A. On the relative contamination of the water-surface by equal quantities of different substances. *Nature* **46**, 418–419 (1892).
73. Langmuir, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2221–2295 (1916).
74. Langmuir, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. 1. *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1848–1906 (1917).
75. Petty, M. C. *Langmuir-Blodgett films: an introduction*. (Press Syndicate of the University of Cambridge, 1996).
76. Davies, J. T. & Rideal, E. K. Interfacial Phenomena. in *Interfacial Phenomena* 265 (Elsevier, 1961). doi:10.1016/B978-0-12-395609-5.50015-4.
77. Gew, L. T. & Misran, M. Albumin-fatty acid interactions at monolayer interface. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 1–6 (2014).
78. Zheng, J. & Leblanc, R. M. Chapter 10 Infrared Reflection Absorption Spectroscopy of Monolayers at the Air–Water Interface. in *Interface Science and Technology* vol. 14 247–276 (2007).
79. Blaudez, D. *et al.* Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Appl. Spectrosc.* **47**, 869–874 (1993).
80. Boujday, S., Chapelle, M., Srajer, J. & Knoll, W. Enhanced Vibrational Spectroscopies as Tools for Small Molecule Biosensing. *Sensors* **15**, 21239–21264

- (2015).
81. Zaborowska, M., Broniatowski, M., Fontaine, P., Bilewicz, R. & Matyszevska, D. Statin Action Targets Lipid Rafts of Cell Membranes: GIXD/PM-IRRAS Investigation of Langmuir Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **127**, 7135–7147 (2023).
 82. Pereira, M. S. *et al.* Lipid-matrix effects on tyrosinase immobilization in Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *An. Acad. Bras. Cienc.* **93**, 1–13 (2021).
 83. Snyder, R. G., Hsu, S. L. & Krimm, S. Vibrational spectra in the C–H stretching region and the structure of the polymethylene chain. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **34**, 395–406 (1978).
 84. Geraldo, V. P. N., Pavinatto, F. J., Nobre, T. M., Caseli, L. & Oliveira, O. N. Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids. *Chem. Phys. Lett.* **559**, 99–106 (2013).
 85. Daear, W., Mahadeo, M. & Prenner, E. J. Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 1749–1766 (2017).
 86. Walde, P., Cosentino, K., Engel, H. & Stano, P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* **11**, 848–865 (2010).
 87. Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R. Mozafari, M., Gaiani, C. & Linder, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Curr. Nanosci.* **7**, 436–452 (2011).
 88. Eugster, R. & Luciani, P. Liposomes: Bridging the gap from lab to pharmaceuticals. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **75**, 101875 (2025).
 89. Dolder, N., Müller, P. & von Ballmoos, C. Experimental platform for the

- functional investigation of membrane proteins in giant unilamellar vesicles. *Soft Matter* **18**, 5877–5893 (2022).
90. Dutt, S., Siril, P. F. & Remita, S. Swollen liquid crystals (SLCs): a versatile template for the synthesis of nano structured materials. *RSC Adv.* **7**, 5733–5750 (2017).
 91. Astray Dopazo, G., Martínez-Castillo, C., Alonso-Ferrer, M. & Carlos Mejuto, J. Modeling the Behavior of Amphiphilic Aqueous Solutions. in *Deep Learning Applications* (IntechOpen, 2021). doi:10.5772/intechopen.95613.
 92. Patil, Y. P. & Jadhav, S. Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids* **177**, 8–18 (2014).
 93. Andra, V. V. S. N. L., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L. V. K. P. & Ruddaraju, L. K. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience* **12**, 274–291 (2022).
 94. Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303 (1986).
 95. Weinberger, A. *et al.* Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **105**, 154–164 (2013).
 96. Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **14**, 719–736 (2010).
 97. Schachter, I., Paananen, R. O., Fábíán, B., Jurkiewicz, P. & Javanainen, M. The Two Faces of the Liquid Ordered Phase. *J. Phys. Chem. Lett.* **13**, 1307–1313 (2022).
 98. Hjort Ipsen, J., Karlström, G., Mourtisen, O. G., Wennerström, H. & Zuckermann,

- M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **905**, 162–172 (1987).
99. Heerklotz, H. & Seelig, J. Titration calorimetry of surfactant - membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 69–85 (2000).
 100. Ferreira, A. S. Fotossensibilização de sistemas modelos de carcinoma colorretal mediada pelo xantênico Rosa de Bengala. (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Faculdade de Ciências e Letras de Assis, 2024).
 101. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).
 102. Hammady, M. *Cell Culture Drug Testing : A Comprehensive Overview*. (2025).
 103. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 30 (2021).
 104. Marinov, L. *et al.* Cytotoxic and antiproliferative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac in human tumour cell lines. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **35**, 1118–1126 (2021).
 105. Engelbrecht, I., Horn, S. R., Giesy, J. P. & Pieters, R. Quantification of Pesticides and In Vitro Effects of Water-Soluble Fractions of Agricultural Soils in South Africa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **88**, 230–250 (2025).
 106. Sadrabad, Z. K., Habibvand, E., Samiei, M., Shadkar, M. M. & Farzi, S. Comparative evaluation of cytotoxic effects of a new biomaterial

- nanohydroxyapatite-lactoferrin, nanohydroxyapatite, mineral trioxide aggregate, and calcium-enriched mixture on human dental pulp stem cells. *J. Conserv. Dent. Endod.* **28**, 57–62 (2025).
107. Felsztyna, I., Sánchez-Borzone, M. E., Miguel, V. & García, D. A. The insecticide fipronil affects the physical properties of model membranes: A combined experimental and molecular dynamics simulations study in Langmuir monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183378 (2020).
 108. Paulovich, F. V., Oliveira, M. C. F. & Minghim, R. The Projection Explorer: A Flexible Tool for Projection-based Multidimensional Visualization. in *XX Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing (SIBGRAPI 2007)* 27–36 (IEEE, 2007). doi:10.1109/SIBGRAPI.2007.21.
 109. Paulovich, F. V., Pinho, R., Botha, C. P., Heijs, A. & Minghim, R. PEx-WEB: Content-based Visualization of Web Search Results. in *2008 12th International Conference Information Visualisation* 208–214 (IEEE, 2008). doi:10.1109/IV.2008.94.
 110. Furini, L. N. *et al.* Combining Impedance Spectroscopy and Information Visualization Methods to Optimize the Detection of Carbendazim Using Layer-by-Layer Films. *Chemosensors* **11**, (2023).
 111. Soares, J. C. *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in milk samples using impedance spectroscopy and data processing with information visualization techniques and multidimensional calibration space. *Sensors and Actuators Reports* **4**, 100083 (2022).
 112. Daikuzono, C. M. *et al.* Paper based electronic tongue-a low-cost solution for the distinction of sugar type and apple juice brand. *Analyst* **144**, 2827–2832 (2019).

113. Graboski, A. M. *et al.* Electronic Nose Based on Carbon Nanocomposite Sensors for Clove Essential Oil Detection. *ACS Sensors* **5**, 1814–1821 (2020).
114. Barreiro, E. J., Rodrigues, C. R., Albuquerque, M. G., Sant’Anna, C. M. R. de & Alencastro, R. B. de. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Quim. Nova* **20**, 300–310 (1997).
115. Cohen, A. J., Mori-Sánchez, P. & Yang, W. Challenges for Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **112**, 289–320 (2012).
116. Kushwaha, A. K. A Brief Review of Density Functional Theory and Solvation Model. *Theor. Comput. Chem. Comput. Chem.* 0–37 (2022).
117. Lewars, E. G. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics. Angewandte Chemie International Edition* vol. 43 (Springer International Publishing, 2016).
118. Vetrivela, R. *et al.* Studies on the molecular electrostatic potential inside the microporous material and its relevance to their catalytic activity. *Theor. Comput. Chem.* **3**, 509–541 (1996).
119. Hollingsworth, S. A. & Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **99**, 1129–1143 (2018).
120. Karplus, M. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 646–652 (2002).
121. Namba, A. M., Da Silva, V. B. & Da Silva, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclet. Quim.* **33**, 13–24 (2008).
122. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*

- 26**, 1668–1688 (2005).
123. Gong, K., Feng, S.-S., Go, M. L. & Soew, P. H. Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air–water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **207**, 113–125 (2002).
 124. Tsanova, A. *et al.* Interaction of methionine–enkephalins with raft-forming lipids: monolayers and BAM experiments. *Amino Acids* **46**, 1159–1168 (2014).
 125. Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1286**, 183–223 (1996).
 126. Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. & Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.* **98**, 11623–11627 (1994).
 127. Vosko, S. H., Wilk, L. & Nusair, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.* **58**, 1200–1211 (1980).
 128. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993).
 129. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988).
 130. Yanai, T., Tew, D. P. & Handy, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).
 131. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum

- Solvation Models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3094 (2005).
132. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 16, Revision C.01. <http://gaussian.com/> (2016).
133. Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2**, 73–78 (2012).
134. Geerlings, P., De Proft, F. & Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **103**, 1793–1874 (2003).
135. Yang, W. & Mortier, W. J. The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5708–5711 (1986).
136. Gomes, O. P., Batagin-Neto, A. & Lisboa-Filho, P. N. The evaluation of anchoring processes and chemical stability of zwitterionic molecules via local reactivity indexes. *Comput. Mater. Sci.* **193**, 110418 (2021).
137. Maia, R. A., Ventrone, G. & Batagin-Neto, A. Reactivity of lignin subunits: the influence of dehydrogenation and formation of dimeric structures. *J. Mol. Model.* **25**, 228 (2019).
138. Alves, G. G. B., Lavarda, F. C., Graeff, C. F. O. & Batagin-Neto, A. Reactivity of eumelanin building blocks: A DFT study of monomers and dimers. *J. Mol. Graph. Model.* **98**, 107609 (2020).
139. De Proft, F., Van Alsenoy, C., Peeters, A., Langenaeker, W. & Geerlings, P. Atomic charges, dipole moments, and Fukui functions using the Hirshfeld partitioning of the electron density. *J. Comput. Chem.* **23**, 1198–1209 (2002).
140. Roy, R. K., Pal, S. & Hirao, K. On non-negativity of Fukui function indices. *J. Chem. Phys.* **110**, 8236–8245 (1999).

141. Chirlian, L. E. & Francel, M. M. Atomic charges derived from electrostatic potentials: A detailed study. *J. Comput. Chem.* **8**, 894–905 (1987).
142. Boys, S. F. & Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **19**, 553–566 (1970).
143. Levin, I. W., Thompson, T. E., Barenholz, Y. & Huang, C. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. *Biochemistry* **24**, 6282–6286 (1985).
144. Dickson, C. J., Walker, R. C. & Gould, I. R. Lipid21: Complex Lipid Membrane Simulations with AMBER. *J. Chem. Theory Comput.* **18**, 1726–1736 (2022).
145. Tian, C. *et al.* ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **16**, 528–552 (2020).
146. Lee, J. *et al.* CHARMM-GUI supports the Amber force fields. *J. Chem. Phys.* **153**, 035103 (2020).
147. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 16. Revision C.01. at (2016).
148. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
149. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
150. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).

151. Andrioli, N. B., Chaufan, G., Coalova, I., Ríos de Molina, M. C. & Mudry, M. D. HEP-2 CELL LINE AS AN EXPERIMENTAL MODEL TO EVALUATE GENOTOXIC EFFECTS OF PENTAVALENT INORGANIC ARSENIC. *J. Basic Appl. Genet.* **XXVIII**, 15–24 (2017).
152. Love, J. *et al.* The jamovi project. <https://www.jamovi.org/about.html> (2025).
153. Miot, H. A. Análise de dados com medidas dependentes em estudos clínicos e experimentais. *J. Vasc.* **22**, 1–6 (2023).
154. Dutt-Ross, S. *Manual de Análise de Dados.* (2020).
155. Júnior, P. D. M., Paglia, A. P., Lima, F. P., Juen, L. & Júnior, P. D. M. *Material de Apoio para Análises Estatísticas.* (2009).
156. Silveira, F. L. da. PANORAMA DO PRONAF NAS MESORREGIÕES DO RIO GRANDE DO SUL: ANÁLISE NO PERÍODO DE 2005 A 2015. (Universidade Federal de Santa Maria, 2019).
157. Wasserstein, R. L. & Lazar, N. A. The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *Am. Stat.* **70**, 129–133 (2016).
158. Ferreira, J. C. & Patino, C. M. O que realmente significa o valor-p ? *J. Bras. Pneumol.* **41**, (2015).
159. Filho, D. B. F. & Silva, L. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA E O USO DO P-VALOR EM PESQUISAS NA SAÚDE: RECOMENDAÇÕES PRÁTICAS. *Interfaces Científicas* **9**, 230–239 (2022).
160. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).

161. Wydro, P. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers - analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **93**, 174–179 (2012).
162. Stottrup, B. L., Stevens, D. S. & Keller, S. L. Miscibility of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol in monolayers, and application to bilayer systems. *Biophys. J.* **88**, 269–276 (2005).
163. Dynarowicz-Łątka, P. & Kita, K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **79**, 1–17 (1999).
164. Minghim, R., Paulovich, F. V. & de Andrade Lopes, A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. in *Visualization and Data Analysis 2006* (eds. Erbacher, R. F., Roberts, J. C., Gröhn, M. T. & Börner, K.) vol. 6060 60600S (2006).
165. Materon, E. M. *et al.* Role of sphingomyelin on the interaction of the anticancer drug gemcitabine hydrochloride with cell membrane models. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **196**, 111357 (2020).
166. Pereira, A. R., Shimizu, F. M. & Oliveira, O. N. Cholesterol modulates the interaction between paclitaxel and Langmuir monolayers simulating cell membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **205**, 111889 (2021).
167. Rubira, R. J. G. *et al.* Biological responses to imazapic and methyl parathion pesticides in bioinspired lipid membranes and Tilapia fish. *J. Hazard. Mater.* **458**, 131943 (2023).
168. Shaw, I. C. Chemical residues, food additives and natural toxicants in food - the cocktail effect. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 2149–2157 (2014).

169. Maximino, M. D., Constantino, C. J. L., Oliveira, O. N. & Alessio, P. Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. *Appl. Surf. Sci.* **476**, 493–500 (2019).
170. Wnętrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A., Janikowska-Sagan, M. & Dynarowicz-Latka, P. Influence of 7 α -hydroxycholesterol on sphingomyelin and sphingomyelin/phosphatidylcholine films - The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1861**, 861–870 (2019).
171. Węder, K., Mach, M., Hąc-Wydro, K. & Wydro, P. Studies on the interactions of anticancer drug - Minerval - with membrane lipids in binary and ternary Langmuir monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 2329–2336 (2018).
172. Fidalgo Rodriguez, J. L., Caseli, L., Torres Rodrigues, R., Miñones Conde, J. & Dynarowicz-Latka, P. Phase transition beyond the monolayer collapse – The case of stearic acid spread at the air/water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **623**, 126781 (2021).
173. Geng, Y. *et al.* A Deeper Insight into the Interfacial Behavior and Structural Properties of Mixed DPPC/POPC Monolayers: Implications for Respiratory Health. *Membranes (Basel)*. **13**, 33 (2022).
174. Jaroque, G. N., Sartorelli, P. & Caseli, L. The effect of the monocyclic monoterpene tertiary alcohol γ -terpineol on biointerfaces containing cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **230**, 104915 (2020).
175. Gonçalves, G. E. G., Morais, T. R., Lago, J. H. G. & Caseli, L. Incorporation of polygodial in Langmuir films of selected lipids. *Thin Solid Films* **669**, 19–28 (2019).

176. Zawisza, I. *et al.* Electrochemical and Photon Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Study of the Electric Field Driven Transformations of a Phospholipid Bilayer Supported at a Gold Electrode Surface. *Biophys. J.* **85**, 4055–4075 (2003).
177. Zawisza, I., Bin, X. & Lipkowski, J. Potential-Driven Structural Changes in Langmuir–Blodgett DMPC Bilayers Determined by in situ Spectroelectrochemical PM IRRAS. *Langmuir* **23**, 5180–5194 (2007).
178. Camacho, S. A. *et al.* Molecular-level effects on cell membrane models to explain the phototoxicity of gold shell-isolated nanoparticles to cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **194**, 111189 (2020).
179. Morato, L. F. C. *et al.* Effects of insecticide acephate on membrane mimetic systems: The role played by electrostatic interactions with lipid polar headgroups. *J. Mol. Liq.* **332**, 115868 (2021).
180. Zaborowska, M., Broniatowski, M., Wydro, P., Matyszewska, D. & Bilewicz, R. Structural modifications of lipid membranes exposed to statins – Langmuir monolayer and PM-IRRAS study. *J. Mol. Liq.* **313**, 113570 (2020).
181. Ruiz, G. C. M. *et al.* Chemical and morphological effects of the contraceptive hormone 17 α -ethynylestradiol on fluid lipid membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **204**, (2021).
182. Rujoi, M., Borchman, D., DuPré, D. B. & Cecilia Yappert, M. Interactions of Ca^{2+} with sphingomyelin and dihydrosphingomyelin. *Biophys. J.* **82**, 3096–3104 (2002).
183. Ceridório, L. F., Caseli, L. & Oliveira, O. N. Chondroitin sulfate interacts mainly

- with headgroups in phospholipid monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **141**, 595–601 (2016).
184. Ruiz, G. C. M., do Carmo Morato, L. F., Pazin, W. M., Oliveira Jr, O. N. & Constantino, C. J. L. In situ interaction between the hormone 17 α -ethynylestradiol and the liquid-ordered phase composed of the lipid rafts sphingomyelin and cholesterol. *Bioorg. Chem.* **143**, 107002 (2024).
 185. de Souza, M. L., Machado, A. C., Barbosa, H., Lago, J. H. G. & Caseli, L. Interaction of sakuranetin with unsaturated lipids forming Langmuir monolayers at the air-water interface: A biomembrane model. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **234**, 113747 (2024).
 186. Mendelsohn, R., Mao, G. & Flach, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1798**, 788–800 (2010).
 187. Arima, A. A., Pavinatto, F. J., Oliveira, O. N. & Gonzales, E. R. P. The negligible effects of the antifungal natamycin on cholesterol-dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers may explain its low oral and topical toxicity for mammals. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **122**, 202–208 (2014).
 188. Vázquez, R. F. *et al.* Impact of sphingomyelin acyl chain (16:0 vs 24:1) on the interfacial properties of Langmuir monolayers: A PM-IRRAS study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **173**, 549–556 (2019).
 189. Wyżga, B., Połec, K., Olechowska, K. & Hąc-Wydro, K. The impact of toxic bisphenols on model human erythrocyte membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **186**, (2020).

190. Olechowska, K., Mielniczek, N. & Hąc-Wydro, K. The effect of selected bisphenols on model erythrocyte membranes of different cholesterol content. *Chem. Phys. Lipids* **247**, 105224 (2022).
191. Chulkov, E. G., Efimova, S. S., Schagina, L. V. & Ostroumova, O. S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **183**, 204–207 (2014).
192. Bunge, A., Müller, P., Stöckl, M., Herrmann, A. & Huster, D. Characterization of the Ternary Mixture of Sphingomyelin, POPC, and Cholesterol: Support for an Inhomogeneous Lipid Distribution at High Temperatures. *Biophys. J.* **94**, 2680–2690 (2008).
193. dos Santos Cabrera, M. P. *et al.* New Insight into the Mechanism of Action of Wasp Mastoparan Peptides: Lytic Activity and Clustering Observed with Giant Vesicles. *Langmuir* **27**, 10805–10813 (2011).
194. Dhanawat, G., Dey, M., Singh, A. & Parveen, N. Invagination of Giant Unilamellar Vesicles upon Membrane Mixing with Native Vesicles. *ACS Omega* **9**, 46615–46626 (2024).
195. Praper, T. *et al.* Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21016–21021 (2011).
196. Kralj-Iglič, V., Gomišček, G., Majhenc, J., Arrigler, V. & Svetina, S. Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **181**, 315–318 (2001).
197. Peterlin, P., Arrigler, V., Kogej, K., Svetina, S. & Walde, P. Growth and shape transformations of giant phospholipid vesicles upon interaction with an aqueous

- oleic acid suspension. *Chem. Phys. Lipids* **159**, 67–76 (2009).
198. Takiue, T. Heterogeneity and deformation behavior of lipid vesicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **62**, 101646 (2022).
 199. Riske, K. A. *et al.* Giant Vesicles under Oxidative Stress Induced by a Membrane-Anchored Photosensitizer. *Biophys. J.* **97**, 1362–1370 (2009).
 200. ImageJ. Analyze menu commands. <https://imagej.net/ij/docs/menus/analyze.html>.
 201. Patrícia Leme Goto. Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos
Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos process. (Universidade de São Paulo, 2016).
 202. Mohajeri, S., Dashti, S., Noruzpour, M., Bourang, S. & Yaghoubi, H. Design and preparation of PLA-chitosan-PEG- glucose copolymer for combined delivery of Paclitaxel and siRNA. *Discov. Appl. Sci.* **7**, 26 (2025).
 203. Seifert, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys.* **46**, 13–137 (1997).
 204. Miao, L., Seifert, U., Wortis, M. & Döbereiner, H.-G. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E* **49**, 5389–5407 (1994).
 205. Valkova, I., Todorov, P. & Vitkova, V. VV-hemorphin-5 association to lipid bilayers and alterations of membrane bending rigidity. *AIMS Biophys.* **9**, 294–307 (2022).
 206. Arnulphi, C. *et al.* Triton X-100 Partitioning into Sphingomyelin Bilayers at Subsolubilizing Detergent Concentrations: Effect of Lipid Phase and a

- Comparison with Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* **93**, 3504–3514 (2007).
207. Zou, Y. *et al.* Interaction of Soybean 7S Globulin Peptide with Cell Membrane Model via Isothermal Titration Calorimetry, Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, and Langmuir Monolayer Study. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 4913–4922 (2018).
 208. Moreno, M. J., Loura, L. M. S., Martins, J., Salvador, A. & Velazquez-Campoy, A. Analysis of the Equilibrium Distribution of Ligands in Heterogeneous Media—Approaches and Pitfalls. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 35 (2022).
 209. Samelo, J., Mora, M. J., Granero, G. E. & Moreno, M. J. Partition of Amphiphilic Molecules to Lipid Bilayers by ITC: Low-Affinity Solutes. *ACS Omega* **2**, 6863–6869 (2017).
 210. Shahane, G., Ding, W., Palaiokostas, M. & Orsi, M. Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-atom molecular dynamics simulations. *J. Mol. Model.* **25**, 1–13 (2019).
 211. Goodyear, D. J., Sharpe, S., Grant, C. W. M. & Morrow, M. R. Molecular dynamics simulation of transmembrane polypeptide orientational fluctuations. *Biophys. J.* **88**, 105–117 (2005).
 212. Colaço, M., Roquito, T., Cruz, M. T. & Borges, O. The Effect of Curcumin-Loaded Glucan Nanoparticles on Immune Cells: Size as a Critical Quality Attribute. *Pharmaceutics* **15**, 26 (2023).
 213. Ghaemi, S., Abedini, F., Mousavi, A. & Ahangari, G. Impact of pesticide diazinon on gastric cancer cell lines and the alteration of cholinergic and serotonergic

- pathway genes affecting cell proliferation. *Nat. Sci. Reports* **15**, 1–14 (2025).
214. Kim, S., Lee, Y., Choi, J., Jr, D. R. J. & Lee, D. Evolutionarily adapted hormesis-inducing stressors can be a practical solution to mitigate harmful effects of chronic exposure to low dose chemical mixtures. *Environ. Pollut.* **233**, 725–734 (2018).
 215. Taroncher, M. *et al.* Cytoprotective Effects of Fish Protein Hydrolysates against H₂O₂-Induced Oxidative Stress and Mycotoxins in Caco-2/TC7 Cells. *Antioxidants* **10**, 23 (2021).
 216. Komissarova, E. V, Saha, S. K. & Rossman, T. G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202**, 99–107 (2005).
 217. Kao, C. M. *et al.* Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **172**, 432–438 (2019).
 218. Duarte, D. & Vale, N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology Diana. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **3**, 100110 (2022).
 219. Oliveira, A. E. F., Arnaldo, C. P., Resende, M. A. C. & Ferreira, L. F. Gold Nanoparticles: A Didactic Step-by-Step of the Synthesis Using the Turkevich Method, Mechanisms, and Characterizations. *Analytica* **4**, 250–263 (2023).
 220. Humbert, C., Pluchery, O., Lacaze, E. & Tadjeddine, A. Optical spectroscopy of functionalized gold nanoparticles assemblies as a function of the surface coverage. *Gold Bull* **46**, 299–309 (2013).
 221. Ngumbi, P. K., Mugo, S. W., Ngaruiya, J. M. & King, C. K. Multiple plasmon resonances in small-sized citrate reduced gold nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*

- 233**, 263–266 (2019).
222. Chen, H., Zhang, J., Wu, H., Koh, K. & Yin, Y. Sensitive colorimetric assays for α -glucosidase activity and inhibitor screening based on unmodified gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **875**, 92–98 (2015).
 223. Gopale, R. D. & Diggikar, R. S. Relative Study of Gold Nanoparticle; A Development of Green Biosensor for Detection of L-Cysteine in Urine Sample. *Orient. J. Chem.* **41**, 231–238 (2025).
 224. Rujiralai, T., Leelaharat, N. & Cheewasedtham, W. Highly specific colorimetric detection based on aggregation of l-cysteine functionalized gold nanoparticles for cypermethrin in water samples. *RSC Adv.* **14**, 9175–9183 (2024).
 225. Parsons, J. G., Dokken, K. M., McClure, J. & Gardea-torresdey, J. L. FTIR , XAS , and XRD study of cadmium complexes with L -cysteine. *Polyhedron* **56**, 237–242 (2013).
 226. Ranaszek-soliwoda, K. *et al.* The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **19**, (2017).
 227. Sakellari, G. I., Hondow, N. & Gardiner, P. H. E. Factors Influencing the Surface Functionalization of Citrate Stabilized Gold Nanoparticles with Cysteamine, 3-Mercaptopropionic Acid or l-Selenocystine for Sensor Applications. *Chemosensors* **8**, 16 (2020).
 228. Pierre, L., Bugueño, J. E. B., Bongiorno, P. A. L., Mediano, A. T. & Rodríguez-Mercado, F. J. Colorimetric Indicator Based on Gold Nanoparticles and Sodium Alginate for Monitoring Fish Spoilage. *Polymers (Basel)*. **16**, 21 (2024).
 229. Cheng, Y. mei *et al.* A sensitive electrochemical sensor for lead based on gold

- nanoparticles/nitrogen-doped graphene composites functionalized with l-cysteine-modified electrode. *J. Solid State Electrochem.* **20**, 327–335 (2016).
230. Petean, I., Tomoaia, G., Horovitz, O., Mocanu, A. & Tomoaia-Cotisel, M. Cysteine mediated assembly of gold nanoparticles. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **10**, 2289–2292 (2008).
 231. Argyropoulos, V. *et al.* Preliminary investigation of L-cysteine as a corrosion inhibitor for marine composite artefacts containing copper or iron alloys. in *Wet Organic Archaeological Materials 2016* (ICOM-CC, 2016).
 232. Matos, M. R. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and their application for colorimetric detection of L-cysteine: a spectroscopic investigation Mateus. *Inorg. Chem. Commun.* **167**, (2024).
 233. Rabbani, F., Nezhad, M. R. H. & Abdollahi, H. Useful multivariate kinetic analysis: Size determination based on cystein-induced aggregation of gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **115**, 588–594 (2013).
 234. Dutta, A., Paul, A. & Chattopadhyay, A. The effect of temperature on the aggregation kinetics of partially bare gold nanoparticles. *RSC Adv.* **6**, 82138–82149 (2016).
 235. Singh, S. *et al.* Kinetic Study of the Biodegradation of Acephate by Indigenous Soil Bacterial Isolates in the Presence of Humic Acid and Metal Ions. *Biomolecules* **10**, 11 (2020).
 236. Mohamed, B. A. & Janaki, P. Determination of active ingredients in commercial insecticides using spectral characteristics of Fourier transform infrared

- spectroscopy (FTIR). *J. Appl. Nat. Sci.* 110–123 (2021).
237. Goswami, J., Kumar, M., Kumar, R., Rai, J. K. & Rai, M. K. Extraction of acephate pesticide in environmental and agricultural samples by spectrophotometric method. *J. Indian Chem. Soc.* **98**, 100138 (2021).
 238. Asghar, H. M. A. *et al.* An efficient approach for separation of acephate from aqueous solution using a novel surface modified adsorbent and its electrochemical regeneration. *Sep. Sci. Technol.* **56**, 3011–3021 (2021).
 239. López-benítez, A. *et al.* Detection of Organophosphorus, Pyrethroid, and Carbamate Pesticides in Tomato Peels: A Spectroscopic Study. *Foods* **14**, 25 (2025).
 240. Min'kov, V. S., Chesalov, Y. A. & Boldyreva, E. V. STUDY OF THE TEMPERATURE EFFECT ON IR SPECTRA OF CRYSTALLINE AMINO ACIDS, DIPEPTIDES, AND POLYAMINO ACIDS. IV. L-CYSTEINE AND DL-CYSTEINE. *J. Struct. Chem.* **49**, 1061–1073 (2008).
 241. Marcelo, G. A., Duarte, M. P. & Oliveira, E. Gold@mesoporous silica nanocarriers for the effective delivery of antibiotics and by-passing of β -lactam resistance. *SN Appl. Sci.* **2**, (2020).
 242. Memon, A. G. *et al.* Citrate-Capped AuNP Fabrication, Characterization and Comparison with Commercially Produced Nanoparticles. *Crystals* **12**, 12 (2022).
 243. Unabia, R. B. *et al.* Dopamine-Functionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Detection of Histamine Romnick. *ACS Omega* **9**, 17238–17246 (2024).
 244. Iglesias, E. Gold Nanoparticles as Colorimetric Sensors for the Detection of DNA Bases and Related Compounds. *Molecules* **25**, 12 (2020).

245. Thongkam, T., Apilux, A., Tusai, T., Parnklang, T. & Kladsomboon, S. Thy-AuNP-AgNP Hybrid Systems for Colorimetric Determination of Copper (II) Ions Using UV-Vis Spectroscopy and Smartphone-Based Detection. *Nanomaterials* **12**, 14 (2022).
246. Mao, L., Zhang, Y., Zhang, H., Liu, H. & Gao, Y. Anti-aggregation colorimetric sensing of cysteine using silver nanoparticles in the presence of Pb²⁺. *Anal. Methods* **16**, 2378–2385 (2024).
247. Ding, N. *et al.* A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg²⁺ detection. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **395**, 161–167 (2012).
248. Liu, Y. *et al.* A novel colorimetric method for H₂O₂ sensing and its application: Fe²⁺-catalyzed H₂O₂ prevents aggregation of AuNPs by oxidizing cysteine (FeHOAuC). *Anal. Chim. Acta* **1207**, 339840 (2022).
249. Shrivastava, A. & Gupta, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, (2011).
250. Liang, M. *et al.* Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticle Peroxidase Mimetic-Based Colorimetric Assay for the Rapid Detection of Organophosphorus Pesticide and Nerve Agent. *Anal. Chem.* **85**, 308–312 (2013).
251. Shen, Y. *et al.* A new water-soluble and colorimetric fluorescent probe for highly sensitive detection of organophosphorus pesticides. *RSC Adv.* **6**, 88096–88103 (2016).
252. Rana, K., Bhamore, J. R., Rohit, J. V, Park, T. & Kailasa, S. K. Ligand exchange

- reactions on citrate-gold nanoparticles for a parallel colorimetric assay of six pesticides. *New J. Chem.* **42**, 9080–9090 (2018).
253. Cai, Y. *et al.* Self-assembled nanomaterials based on aggregation-induced emission of AuNCs: Fluorescence and colorimetric dual-mode biosensing of organophosphorus pesticides. *Sensors Actuators B. Chem.* **321**, 128481 (2020).
254. Cai, Y. *et al.* Capsulation of AuNCs with AIE Effect into Metal–Organic Framework for the Marriage of a Fluorescence and Colorimetric Biosensor to Detect Organophosphorus Pesticides. *Anal. Chem.* **93**, 7275–7582 (2021).
255. Osman, M. J. *et al.* Optimisation of a gold nanoparticle-based aptasensor integrated with image processing for the colorimetric detection of acephate using response surface methodology. *RSC Adv.* **11**, 25933–25942 (2021).
256. Cao, X. *et al.* An efficient multi-enzyme cascade platform based on mesoporous metal-organic frameworks for the detection of organophosphorus and glucose. *Food Chem.* **381**, (2022).
257. Li, H., Deng, R., Tavakoli, H., Li, X. & Li, X. Ultrasensitive detection of acephate based on carbon quantum dot-mediated fluorescence inner filter effect. *Analyst* **147**, 5462–5469 (2022).
258. Liu, S. *et al.* Detection of Organophosphorus Pesticides Using Silver-Coated Gold Nanoparticles. *Appl. Nano Mater.* **5**, 16402–16412 (2022).
259. Cai, T. *et al.* Smartphone-assisted sensing array based on covalent organic framework-enhanced AuPtPd hybrid oxidase-mimic nanozyme for controllable quantitative detection of acephate residue and bioaccumulation in wheat. *Chem. Eng. J.* **527**, 171760 (2026).

260. Rojewska, M., Smulek, W., Kaczorek, E. & Prochaska, K. Langmuir monolayer techniques for the investigation of model bacterial membranes and antibiotic biodegradation mechanisms. *Membranes (Basel)*. **11**, (2021).
261. De Keyser, P. & Joos, P. Desorption at constant surface pressure from slightly soluble monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **91**, 131–137 (1983).
262. Qiao, L., Ge, A., Liang, Y. & Ye, S. Oxidative Degradation of the Monolayer of 1-Palmitoyl-2-Oleoyl- sn -Glycero-3-Phosphocholine (POPC) in Low-Level Ozone. *J. Phys. Chem. B* **119**, 14188–14199 (2015).

Apêndice A

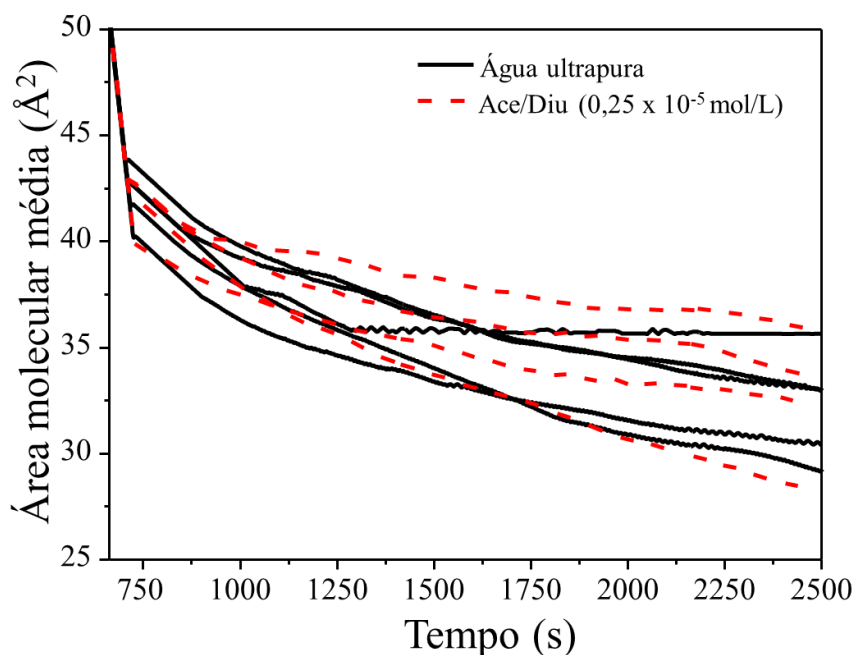


Figura A1: medida de estabilidade da monocamada ternária na ausência (linhas contínuas pretas) e presença do coquetel (linhas tracejadas vermelhas).

As medidas de estabilidade foram realizadas mantendo a pressão das barreiras constante em 30 mN/m e monitorando a área molecular média em função do tempo^{260,261}. Nesse sentido, caso haja diminuição da área molecular média, assume-se que os lipídios presentes na monocamada podem estar formando agregados ou sendo diluídos na subfase, diminuindo a estabilidade do filme. Porém, em se tratando de moléculas anfífilas como os lipídios, ambas as possibilidades são pouco prováveis. Outra possível razão da diminuição da área é a oxidação lipídica, causada pelo oxigênio presente no ambiente²⁶². Como pode se observar na Figura A1, os gráficos não possuem reprodutibilidade clara, dificultando assim a análise dos dados. Estamos em processo de entender esta irreprodutibilidade.