

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia

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



Carla Yasmim da Silva

**Preparação de membrana comercial funcionalizada com Anfotericina
B e colesterol para remoção de Bisfenol A da água**

Presidente Prudente / SP

2023

Carla Yasmim da Silva

Preparação de membrana comercial funcionalizada com Anfotericina B e colesterol para remoção de Bisfenol A da água

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” sob orientação da Profa. Dra. Priscila Alessio Constantino.

ORIENTADORA: Profa . Dra . Priscila Alessio Constantino

Presidente Prudente

2023

S586p	Silva, Carla Yasmim Preparação de membrana comercial funcionalizada com Anfotericina B e colesterol para remoção de Bisfenol A da água / Carla Yasmim Silva. -- Presidente Prudente, 2023 70 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente Orientador: Priscila Alessio 1. Filtração. 2. Caracterização de membranas. 3. Filmes de Langmuir. 4. Poluentes emergentes. 5. Bisfenol A. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CARLA YASMIM DA SILVA,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 03 dias do mês de maio do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CARLA YASMIM DA SILVA, intitulada **“Preparação de membrana comercialfuncionalizada com Anfotericina B e colesterol para remoção de Bisfenol A da água”**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Dr.a ISABEL CRISTINA TESSARO (Participação Virtual) do(a) Engenharia Química / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dr.a ANDREIA FONSECA DE FARIA (Participação Virtual) do(a) Environmental Engineering Sciences / University of Florida. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha mãe Eli Cristina e a minha irmã Camilla, que sempre me apoiaram nessa jornada e tiveram orgulho de mim. Em especial, agradeço a minha avó Geni Honório, que não está mais entre nós, mas que era a minha maior apoiadora. Dona Geni, dedico-te este trabalho.

Agradeço à minha orientadora e professora Priscila Alessio, por todo apoio e orientação que tive até agora. Não há palavras para expressar a gratidão por todo conhecimento e companheirismo que recebi ao longo desses anos.

Agradeço ao professor Dr. Guilherme Dognani, que nos ajudou e nos forneceu as primeiras membranas utilizadas neste trabalho. Sem sua ajuda, este trabalho não seria possível.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório por todos os auxílios e momentos vividos, que foram essenciais para o meu aprendizado e para a conclusão deste trabalho. Em especial, um agradecimento ao Marcelo, Mzão, Mzinho, Henry e Luís por toda ajuda e boas risadas.

Agradeço todos os meus amigos de turma que se formaram comigo no curso de Licenciatura em Física, junto a Pri e ao professor Casé, por terem me incentivado a continuar nas vezes que pensei em desistir. Se não fosse por vocês, eu não continuaria.

Agradeço aos meus amigos próximos no geral, que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim. O apoio de vocês sempre foi importante.

Agradeço ao programa de pós-graduação POSMAT e a UNESP. A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro, que foram cruciais para a realização deste trabalho.

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

O presente trabalho foi realizado com financiamento de bolsa de estudos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 422163/2018-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2016/06288-4, nº 2021/14235-6 e nº 2018/22214-6.

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

*“Em algum lugar, algo incrível está
esperando para ser descoberto.”*

Carl Sagan

RESUMO

A contaminação da água vem gerando cada vez mais preocupação na sociedade atual, uma vez que a presença de contaminantes que não são devidamente monitorados vem crescendo exponencialmente nos corpos d'água, e pela baixa disponibilidade de água doce e potável. A escassez de água potável afeta hoje mais de 40% da população mundial, um número que pode aumentar nos próximos anos. Dentre os poluentes, destaca-se o desregulador endócrino Bisfenol A (BPA). Devido às baixas concentrações nas quais o BPA é encontrado na natureza, torna-se difícil detectá-lo e removê-lo da água utilizando técnicas convencionais de tratamento. Membranas de filtração têm sido estudadas no sentido de conter a disponibilidade deste contaminante. A anfotericina B (AmB) é um antifúngico que biomimetiza canais iônicos, quando em modelos miméticos de biomembranas compostas por fosfolipídios e esteróis. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os canais iônicos formados pela interação entre o lipídio DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), colesterol e a AmB em biomembranas para funcionalização de membranas de filtração para remoção do BPA. As membranas nanoporosas foram funcionalizadas utilizando a técnica de Langmuir-Schaefer (LS) e caracterizadas utilizando análises de microscopia como MEV, AFM, BAM e UV-Vis. Por fim, as análises foram realizadas em um sistema de ultrafiltração. Através das isotermas, foi possível notar uma compactação da monocamada, que pode estar sendo causada por uma interação atrativa entre as componentes. As medidas de caracterização também reforçam possíveis interações entre os grupos moleculares do DOPC, Chol e AmB. Foi possível observar a morfologia do filme depositado pelas técnicas de BAM, MEV e AFM e notar a presença de agregados, que diminui conforme aumenta-se o número de substâncias componentes no filme. Por fim, as análises colorimétricas realizadas com a solução permeada pós filtração revelaram que as membranas reteram uma ordem de grandeza.

Palavras-chave: Poluentes emergentes, Bisfenol A, Filtração.

Abstract

Water contamination has been raising more and more concern in today's society, since the presence of contaminants that are not properly monitored has been growing exponentially in water bodies, and due to the low availability of fresh and potable water. The scarcity of drinking water currently affects more than 40% of the world's population, a number that could increase in the coming years. Among the pollutants, the endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) stands out. Due to the low concentrations at which BPA is found in nature, it is difficult to detect and remove from water using conventional treatment techniques. Filtration membranes have been studied in order to contain the availability of this contaminant. Amphotericin B (AmB) is an antifungal that biomimics ion channels, when in mimetic models of biomembranes composed of phospholipids and sterols. Thus, the objective of this work was to investigate the ion channels formed by the interaction between the lipid DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), cholesterol and AmB in biomembranes for functionalization of filtration membranes to remove BPA. Nanoporous membranes were functionalized using the Langmuir-Schaefer (LS) technique and characterized using microscopy analyzes such as SEM, AFM, BAM and UV-Vis. Finally, the analyzes were carried out in an ultrafiltration system. Through the isotherms, it was possible to notice a compaction of the monolayer, which may be caused by an attractive interaction between the components. The characterization measures also reinforce possible interactions between molecular groups of DOPC, Chol and AmB. It was possible to observe the morphology of the film deposited by the BAM, SEM and AFM techniques and to note the presence of aggregates, which decreases as the number of component substances in the film increases. Finally, the colorimetric analyzes carried out with the permeated solution after filtration revealed that the membranes retained an order of magnitude.

Keywords: Emerging pollutants, Bisphenol A, Filtration.

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo do canal no qual AmB (estrutura oval cinza) se combina com esterol (retângulo verde) para formar poros em uma bicamada lipídica.....	20
Figura 2: Diagrama esquemático de uma cuba comercial com os dispositivos para compressão (barreiras móveis) e caracterização da monocamada (balança de pressão).21	
Figura 3: Isoterma $\pi \times A$ evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.....	22
Figura 4: Diagrama da teoria do ângulo de Brewster para um feixe p-polarizado incidindo sobre a interface ar-água e um feixe p-polarizado incidindo sobre um filme.[.....	23
Figura 5: diagrama esquemático do funcionamento de um sistema de PM-IRRAS em uma cuba de Langmuir.	25
Figura 6: ilustração do processo de absorção de energia na região do UV-Vis (transição eletrônica) em um diagrama de energias.	26
Figura 7: Representação da estrutura molecular do fosfolipídio DOPC, colesterol e das substâncias Anfotericina B e Bisfenol A.....	28
Figura 8: diagrama esquemático representando (a) a formação do filme de Langmuir formado pela compressão dos lipídeos junto aos canais iônicos formados pela AmB e colesterol e (b) o filme LS depositado na superfície da membrana nanoporosa.	32
Figura 9: Sistema de filtração Millipore Amicon® Stirrer Cell, modelo 8050.	33
Figura 10: Isotermas π -A de DOPC, Chol, DOPC/Chol (7:3) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: indicação da área extrapolada da fase condensada.....	35
Figura 11: Módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC, DOPC/Chol 1:1 e Chol em subfase aquosa.	36
Figura 12: Isotermas π -A de DOPC, AmB, DOPC/AmB (1:1) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: área extrapolada.....	37
Figura 13: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC, DOPC/AmB 1:1 e AmB em subfase aquosa.	39
Figura 14: Isotermas π -A de DOPC/Chol (7:3), DOPC/AmB (1:1) Chol/AmB (1:1) e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: área extrapolada.....	40
Figura 15: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície das misturas DOPC/Chol/AmB, DOPC/AmB, DOPC/Chol e Chol/AmB em subfase aquosa.	42
Figura 16: Isotermas π -A de DOPC/AmB (1:1) Chol/AmB (1:1) e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em subfase salina de NaCl 3M. Linha tracejada: área extrapolada.	43

Figura 17: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC, AmB e DOPC/AmB e (b) AmB, DOPC/Chol e DOPC/Chol/AmB em subfase salina NaCl 3M, na região da cabeça do fosfolípido. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.	45
Figura 18: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC, DOPC/AmB e AmB e (b) DOPC/Chol, DOPC/Chol/AmB e AmB em subfase salina NaCl 3M, na região da cauda do fosfolípido obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.	47
Figura 19: Espectros de absorção no UV-Vis para (a) solução de anfotericina B em DMF/HCl 3:1, em uma concentração de $2,7 \times 10^{-5}$ M e (b) filme de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) depositado por LS (2 camadas) em quartzo.....	49
Figura 20: Imagens de BAM para a AmB, DOPC/Chol 7:3, DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 em subfase contendo BPA 1×10^{-5} M.....	51
Figura 21: Imagens de AFM obtidas para (a) substrato de mica; e mica contendo duas camadas de filmes depositados por LS de b) DOPC e c) DOPC/Chol/AmB.....	56
Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de a) mica, b) e c) DOPC depositado na mica d) e e) DOPC/Chol/AmB depositados na mica.....	59
Figura 23: Curva de calibração para determinação do BPA elaborada através do estudo da relação entre absorbância e concentração da substância, realizada para uma faixa de concentração de 8×10^{-5} M a 8×10^{-7} M.....	61

Lista de tabelas

Tabela 1: Diluições de BPA para a curva de calibração realizada por espectrofotometria UV-VIS.....	60
Tabela 2: Dados da filtração realizada em triplicata para três membranas de PVDF-HFP (Não modificadas) diferentes, para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente).	62
Tabela 3: Dados da filtração realizada em triplicata para três membranas de PVDF-HFP (modificadas com duas camadas de DOPC/Chol/AmB em proporção 4,2:1,8:4) diferentes para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente).	62
Tabela 4: dados referente as análises de filtração realizadas com a membrana de celulose regenerada não modificada para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.	63
Tabela 5: dados referente as análises de filtração realizadas com a membrana de celulose regenerada modificada com diferentes quantidades de camadas, para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.	64
Tabela 6: dados referente as análises de filtração realizadas com as membranas de PVDF hidrofílico e PTFE para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.	65

Lista de abreviações

DOPC	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina
AmB	Anfotericina B
Chol	Colesterol
BPA	Bisfenol A
LS	Langmuir-Schaefer
AFM	Microscopia de força atômica
PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
BAM	Microscopia de ângulo de Brewster

Sumário

1. Introdução e justificativa	16
1.1 Poluentes Emergentes: Bisfenol A	16
1.2 Tecnologia de membranas	17
1.3 Filmes finos nanoestruturados	18
1.4 Modelos biomiméticos e Anfotericina B	18
2. Conceitos teóricos	20
2.1 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)	20
2.2 Isotermas π -A	21
2.3 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	23
2.4 PM-IRRAS	24
Fonte: (PEREIRA, 2019)	25
2.5 Espectroscopia UV-Vis	25
2.6 Microscopia de força atômica (AFM)	26
2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
3. Objetivos	27
4. Experimental	27
4.1 Materiais e Reagentes	27
4.2 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaeffer	28
4.3 Módulo compressional	29
4.4. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)	29
4.5 PM-IRRAS	30
4.6 Espectroscopia UV-Vis	30
4.7 Imagens de microscopia de força atômica (AFM)	30
4.8 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
4.9 Funcionalização da membrana	31
4.10 Caracterização da membrana funcionalizada	32
4.11 Processo de filtração	33

4.12 Análises de fluxo de permeado e retenção.....	33
5. Resultados e Discussão	34
5.1 Filmes de Langmuir	34
5.2 PM-IRRAS.....	44
5.3 UV-Vis.....	48
5.4 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM).....	51
5.5 Microscopia de força atômica (AFM)	55
5.6 Microscopia Eletrônica de varredura	58
5.7 Determinação da concentração das amostras de BPA	60
5.8 Filtração de BPA.....	62
6. Conclusão	65
Referências	66

1. Introdução e justificativa

1.1 Poluentes Emergentes: Bisfenol A

Atualmente, a poluição da água vem gerando uma crescente preocupação a nível global. Uma água aparentemente potável pode conter micro e nanopoluentes que, mesmo em baixas concentrações, possuem o potencial de causar danos na saúde humana e ambiental (SOARES; SOUZA E SOUZA, 2020). Esses contaminantes são denominados contaminantes emergentes, e englobam uma enorme classe de substâncias. Devido ao crescimento exponencial dessas substâncias nos corpos d'água, alguns destes contaminantes vêm exigindo uma atenção especial da sociedade, como os fármacos, plastificantes, agrotóxicos, hormônios naturais e sintéticos e outros poluentes orgânicos (CARDOSO et al., 2019).

O poluente escolhido para este trabalho foi o Bisfenol A (BPA), uma substância criada inicialmente como estrogênio sintético, mas que posteriormente foi utilizada em produtos de consumo como plásticos, embalagens de alimento e resinas dentárias (ROCHESTER, 2013) por ser precursor de materiais leves e de maior durabilidade (BESERRA et al., 2012). Por outro lado, por possuir a capacidade de causar alterações no sistema endócrino causando diversos efeitos na saúde humana e animal, o Bisfenol A é também classificado como desregulador endócrino (MAIA; DEZOTTI, 2007). Estudos relatam que o BPA inibe canais iônicos em faixa micromolecular, podendo possuir efeitos tóxicos no sistema nervoso (O'REILLY et al., 2012). Além disso, o BPA é também conhecido como contaminante de bebidas e alimentos industrializados, que são geralmente embalados por materiais que ao sofrerem hidrólise, podem liberar moléculas ou metabólitos de BPA (BACHEGA et al., 2011). No entanto, ainda não há uma completa compreensão e clareza sobre seus mecanismos de ação e seus impactos no organismo, o que dificulta a avaliação e as recomendações por parte das agências reguladoras (WETHERILL et al., 2007).

Apesar de seus impactos no organismo e no meio-ambiente já serem relatados e causarem preocupação mesmo em concentrações da ordem de nanomolar, os estudos relacionados à filtração do BPA da água são afetados pelas baixas concentrações na qual o poluente é encontrado na natureza, além das dificuldades encontradas na realização de análises (ZHANG et al., 2006). Desta forma, é necessário que se trabalhe no

desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem a remoção de BPA da água, similar a processos utilizados em membranas de dessalinização.

1.2 Tecnologia de membranas

No que diz respeito à remoção de sais e poluentes da água, a tecnologia de membrana vem sendo bastante utilizada, devido à sua eficácia e baixos custos empregados (DRIOLI; CRISCUOLI; CURCIO, 2002). Nessa categoria se classificam a microfiltração (MF), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e osmose inversa (OR), apesar da técnica de OR não ser uma das mais favoráveis energeticamente. Essas técnicas se diferenciam por tamanho de poro das membranas utilizadas e pressão aplicada no processo de filtração. Na osmose inversa e nanofiltração, são empregadas membranas cujo os poros possuem dimensões até 2 nm e pressões de 10 – 100 bar (RO) e 5 – 20 bar (NF), respectivamente (MARCEL MULDER, 1996), (BAKER, 2004). Nos processos de ultrafiltração e microfiltração, a separação geralmente ocorre para substâncias que possuem peso molecular maior do que o peso molecular de corte da membrana, ou partículas com dimensões na casa dos micrometros. No caso da ultrafiltração, utilizam-se pressões até 5 bar, enquanto a microfiltração utiliza pressões mais baixas, de 1 a 2 bar (ORGANIZATION, 2004), (BAKER, 2004).

A nanofiltração (NF) e a Osmose inversa (RO) são exemplos de processos de membrana amplamente utilizados para remoção de poluentes e sais da água (BUENO et al., 2016; SOARES et al., 2006). Atualmente, encontram-se muitos trabalhos relatados na literatura com este fim, devido à crucialidade de obtenção de água potável. Liu et al. utilizou guanazol e piperazina em membranas de poliamidas à fim de remover sais e corantes da água, foi observado uma melhora significativa na filtragem em relação às membranas comuns de poliamida, onde a remoção dos corantes estudados foi de 97% a 99% (LIU et al., 2021). Membranas de PVDF modificadas com dissulfeto de molibdênio (MoS₂) (WANG et al., 2021) e alginato de cálcio (PVDF-CaAlg) (MENG et al., 2021) também mostraram-se como uma opção eficiente para o desenvolvimento de membranas com estabilidade estrutural. Além disso, modelos biomiméticos têm sido estudados e modificados à fim de melhorar o desempenho de membranas de separação, como é o caso do modelo modificado com aquaporina (TANG et al., 2013).

1.3 Filmes finos nanoestruturados

Filmes são camadas de matéria condensada inseridas em uma superfície, que podem ter diferentes espessuras e assim receber distintas classificações, como filmes nanométricos (de 0,1–100 nm), micrométricos (de 0,1–100 µm) e milimétricos (de 0,1–100 mm) (ACQUA, 2013). Dentre eles, os filmes nanométricos ou nanoestruturados acabam gerando grande interesse, já que possibilitam um rigoroso controle de espessura e propriedades moleculares (SANFELICE et al., 1985). Filmes nanoestruturados têm sido utilizados em diversas áreas e são empregados em situações como desenvolvimento de dispositivos moleculares, sensores, liberação de fármacos e caracterização de membranas de filtração (ACQUA, 2013), (LAU et al., 2015). M. Ang et al., por exemplo, modificou membranas de poliamida com diferentes surfactantes e observou uma melhora na rejeição cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (ANG et al., 2020). Relata-se também que substratos de poliamida modificados com nitreto de carbono grafítico e nanotubos de haloisita (mineral do grupo da caulinita que pode ter uma morfologia tubular) tiveram propriedades de permeabilidade de água e rejeição de sal melhoradas (LIU et al., 2020).

1.4 Modelos biomiméticos e Anfotericina B

A membrana plasmática é a via por onde os fármacos entram na célula. No entanto, a membrana celular possui uma alta complexidade na sua composição, o que dificulta a observação de processos biológicos que venham a ocorrer (EEMAN; DELEU, 2010). A fim de estudar os efeitos de determinadas substâncias no organismo, modelos biomiméticos são comumente utilizados, por serem considerados indicadores dos efeitos que ocorrem em sistemas biológicos reais (SARKIS; VIÉ, 2020). Dentre as diversas metodologias existentes para a obtenção de materiais biomiméticos, as técnicas de deposição de filmes de Langmuir e de Langmuir-Schaefer (LS) foram escolhidas para este projeto. Os filmes de Langmuir além de proporcionar nanoestruturas de alta qualidade possuem uma enorme vantagem devido à facilidade de alterar os parâmetros experimentais envolvidos, tais como a velocidade das barreiras (e, conseqüentemente, a estrutura da monocamada) (PAVINATTO, 2010), pH e composição da camada lipídica (OLŻYŃSKA et al., 2016).

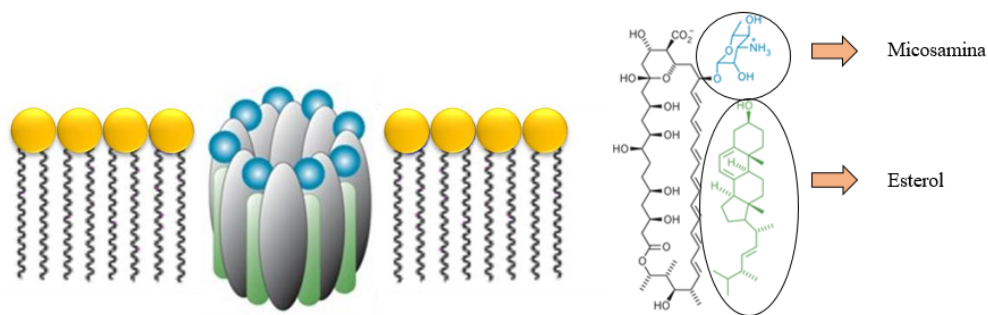
As aquaporinas são proteínas formadoras de poros, presentes na membrana plasmática, que servem como “canais seletivos de água” (YOOL; WEINSTEIN, 2002). Devido às suas propriedades de permeabilidade à água, as aquaporinas são bastante conhecidas como uma alternativa para aumentar o desempenho de membranas de

dessalinização (KUMAR et al., 2007), além de poderem ser utilizadas para filtrar outras substâncias, como contaminantes orgânicos (BPA, o metil parabeno, dentre outros) (ENGELHARDT; SADEK; DUIRK, 2018). No entanto, a aquaporina pode se tornar inviável devido ao seu alto custo e dificuldade de produção em larga escala (WU et al., 2018). Além disso, as membranas caracterizadas com aquaporina apresentam dificuldades de serem fabricadas em nível industrial, o que seria necessário para a aplicação proposta. As aquaporinas também não mantêm a estabilidade nas condições ambientais necessárias, o que faz com que as membranas fabricadas não sejam suficientemente estáveis e aumentem muito a dificuldade de produção e o seu custo (SEN GUPTA; PADMAVATHY; BOSE, 2021). Neste sentido, muitos materiais foram testados nos últimos anos como substitutos para a formação de canais em modelos biomiméticos, como é o caso dos nanotubos de carbono (BRUNET et al., 2008) e a gramicidina A (ROSENBERG; FINKELSTEIN, 1978).

Yang et al. estudou um método de caracterização de membrana nanofiltrante auxiliada por lipossomas, onde observou um desempenho de 96,6% (YANG et al., 2021). No trabalho de Guo et al., os autores utilizaram N, N- dietiletilenodiamina (DEEDA) e 1,3-propanossultona (1,3-PS) em uma membrana de poliamida, e obtiveram uma membrana de alta permeabilidade para filtração de sal e antibióticos da água (GUO et al., 2020). Membranas de poliamida com poros ajustáveis, formadas por eletropulverização, também mostraram ser uma boa opção para nanofiltração (ZHANG et al., 2022).

A AmB é um antifúngico que quando inserida em biomembranas compostas por fosfolipídios e esteróis forma uma estrutura similar à um canal iônico, sendo essa a razão da sua toxicidade (COHEN, 2010). Estudos indicam que os canais iônicos são formados na membrana após uma interação entre o grupo micosamina da AmB e os esteróis presentes na membrana plasmática, como ilustrado na Figura 1 (PALACIOS et al., 2011). Os poros formados são estáveis e bem estruturados, estimando-se que sejam formados por seis à oito moléculas de AmB e colesterol (BAGINSKI; RESAT; MCCAMMON, 1997). Um modelo simplificado do canal iônico em monocamadas lipídicas está apresentado na Figura 1. Estima-se que o diâmetro dos canais formados estejam na faixa de 7 a 10 Å (BAGINSKI; RESAT; BOROWSKI, 2002).

Figura 1: Modelo do canal no qual AmB (estrutura oval cinza) se combina com esterol (retângulo verde) para formar poros em uma bicamada lipídica.



Fonte: Adaptado de (STU BORMAN, 2011)

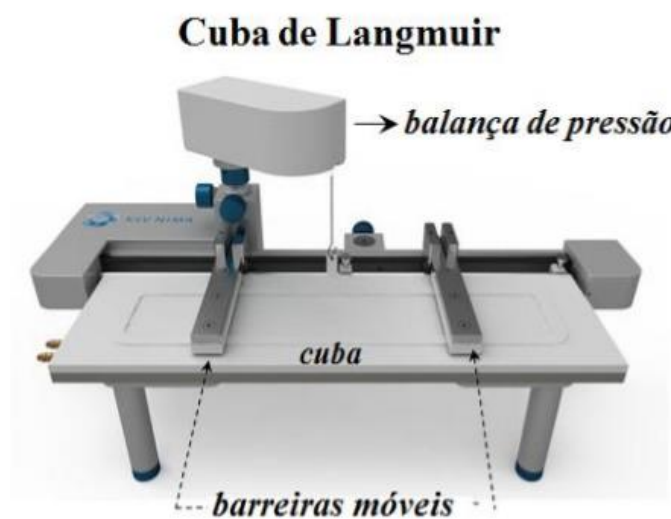
Essas estruturas têm sido utilizadas como modelo mimético para investigar processos de adsorção e difusão de íons e moléculas em biomembranas miméticas (SYKORA; NEELY; VODYANOY, 2004). Assim, o objetivo deste projeto foi investigar a rejeição ao BPA por meio de membranas de filtração funcionalizadas com biomembranas de fosfolipídios (DOPC), colesterol (Chol) e anfotericina B (AmB), formando canais iônicos miméticos. Neste trabalho, foi realizada uma tentativa de aplicar os canais iônicos formados por Anfotericina B (AmB) e Colesterol (Chol) para remoção de BPA da água. O objetivo seria funcionalizar membranas comerciais, diminuindo seus poros e aplicando para a remoção do poluente. Os canais iônicos e suas propriedades já têm sido previamente estudados, no entanto, aplicações desse sistema para purificação de água não foram encontrados na literatura. O fosfolipídio DOPC foi escolhido devido à alta proporção de fosfocolinas na membrana plasmática (VAN MEER; DE KROON, 2011). Desta forma, acredita-se que este estudo detalhado possa demonstrar o comportamento e discutir o papel da AmB em substituição a aquaporinas em biomembranas miméticas.

2. Conceitos teóricos

2.1 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaefer (LS)

Uma das formas mais simples e eficiente de se mimetizar a membrana celular são os filmes de Langmuir (DECHER, 1997). Para a fabricação das monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Schaefer utiliza-se a chamada cuba de Langmuir (Figura 2). O equipamento contém basicamente uma cuba onde é vertida a subfase líquida, um par de barreiras móveis que comprime as moléculas, com velocidade de compressão das barreiras controlada, e um sensor utilizado para medir a pressão de superfície.

Figura 2: Diagrama esquemático de uma cuba comercial com os dispositivos para compressão (barreiras móveis) e caracterização da monocamada (balança de pressão).



Fonte: adaptada do site: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima>.

A técnica de deposição de filmes de Langmuir consiste na formação de uma monocamada na superfície da água, empregando-se moléculas anfifílicas. Sobre a superfície da água ultrapura é espalhada a solução do composto escolhido usando uma microseringa. Após a evaporação do solvente, o fechamento das barreiras faz com que as moléculas na superfície da água se orientem preferencialmente de forma que seus eixos fiquem perpendiculares à superfície da água (PETTY, 1996). A monocamada formada sobre a superfície líquida após a evaporação do solvente é denominada “filme de Langmuir”, citada anteriormente. A transferência horizontal dessa monocamada a um substrato sólido resulta na formação de um filme LS. Além disso, a técnica de LS é caracterizada pelo alto controle de sua espessura, organização estrutural e uniformidade superficial. Nesse projeto de pesquisa utilizaremos a técnica de filmes LS para funcionalizar membranas para filtração de BPA.

2.2 Isotermas π -A

O processo de compressão de um filme na cuba de Langmuir é acompanhado pela isoterma π -A, que relaciona a pressão de superfície (π) vs a área média ocupada por molécula (A), sendo π calculada pela diferença entre a tensão superficial da subfase de água pura (γ_0) e a tensão superficial da subfase de água pura + monocamada (γ): $\pi = \gamma_0 - \gamma$. O valor da tensão superficial é obtido utilizando-se o método de Wilhelmy (BARNES; GENTLE, 2011), o qual permite calcular a variação de γ utilizando-se um sensor

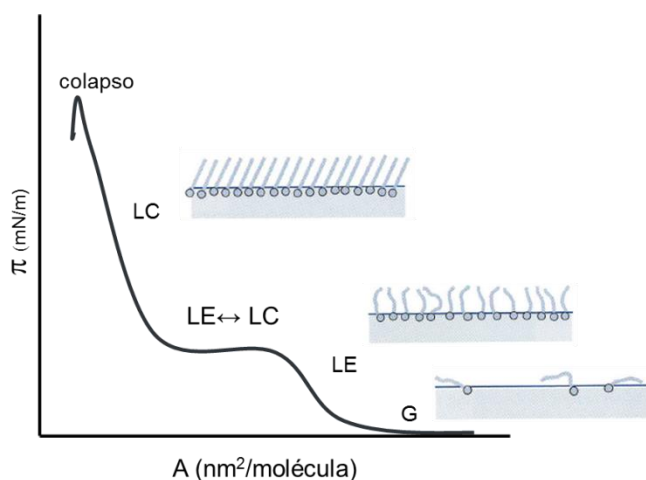
constituído por um papel filtro conectado a uma eletrobalança, de modo que a força resultante da imersão do papel de filtro na subfase seja diretamente proporcional à tensão superficial.

Através dos filmes de Langmuir pode-se obter informações sobre a estruturação/formação das monocamadas. Um exemplo de isoterma π -A está indicado na Figura 3. As transições de fase podem ser avaliadas e associadas às reorientações moleculares durante a compressão. Alterações no formato e área das isotermas são utilizadas para estudos de interação entre os compostos no filme e na subfase aquosa (ZASADZINSKI et al., 1994).

A compressão das monocamadas passa por três fases distintas: fase gasosa (G), na qual as moléculas praticamente não interagem entre si; fase líquido-expandido (LE), que surge quando a área disponível por molécula é diminuída e assim as interações intermoleculares entre as caudas hidrofóbicas tornam-se significativas e a fase líquido-condensado (LC), caracterizada pelo maior empacotamento das moléculas que provoca limitação do seu movimento translacional na interface. Nessa fase, π aumenta rapidamente como resultado da queda brusca de γ (ZANIQUELLI; BUENO; HOMEM, 1993).

Em alguns casos de moléculas anfifílicas simples, como os ácidos carboxílicos de cadeia longa, um estado de maior ordenamento, denominado estado sólido, pode ser observado. À medida que a monocamada é comprimida, as moléculas anfifílicas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras provocando o colapso do filme.

Figura 3: Isotherma $\pi \times A$ evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.



2.3 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

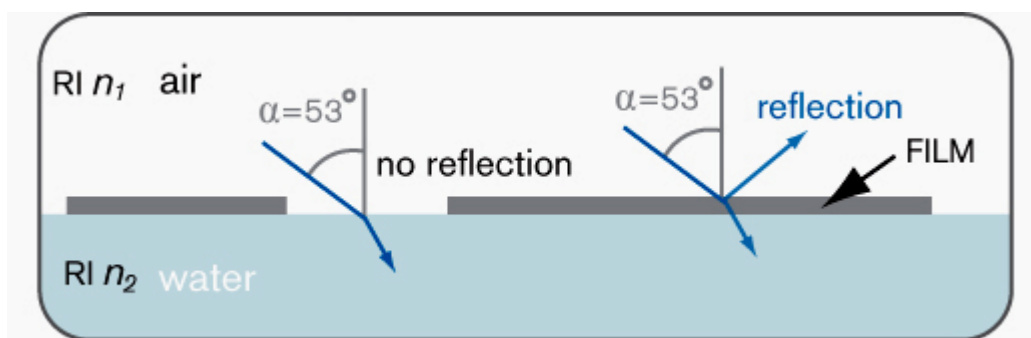
As medidas de BAM possibilitam o estudo da morfologia de monocamadas na interface ar/água utilizando uma cuba de Langmuir (“KSV NIMA - Brewster Angle Microscopes.”, [s.d.]). A técnica consiste na aplicação de uma fonte de radiação polarizada na direção paralela ao plano de incidência do feixe (*p*-polarizada), em um ângulo específico. Quando a soma dos ângulos de incidência e refração somam um ângulo reto, o ângulo de incidência é denominado ângulo de Brewster. No caso da interface ar-água, este valor é de 53° (ângulo de Brewster) (HÉNON; MEUNIER, 1991), e pode ser calculado pela equação 1:

$$\tan \theta_B = n_2 / n_1 \quad (1)$$

Sendo que n_2 é o índice de refração da água e n_1 o índice de refração do ar.

Quando tal situação é satisfeita não há a reflexão na superfície, somente a refração (Figura 4 (a)), e, portanto, não se detecta nenhum feixe refletido, deixando a imagem obtida toda escura. Entretanto, quando se adiciona sobre a superfície uma monocamada de um terceiro material com índice de refração diferente da água, o ângulo de Brewster muda, tanto para a interface ar-filme, quanto para a interface filme-água. Logo, o feixe passa a ser refletido e mensurado (Figura 4 (b)) (HÖNIG; MÖBIUS, 1991), sendo possível captar as informações sobre a morfologia da monocamada.

Figura 4: Diagrama da teoria do ângulo de Brewster para um feixe *p*-polarizado incidindo sobre a interface ar-água e um feixe *p*-polarizado incidindo sobre um filme.[



Fonte: Adaptado de (UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, 2012)

Além de mudança morfológicas, a técnica permite o estudo da formação de domínios, assim como a avaliação das diferentes fases de empacotamento. Em condições ideais, quando um feixe de luz polarizado incide em um material, a luz refletida será totalmente polarizada na direção *s* (perpendicular ao plano de incidência), e parte dessa componente também é refratada. Além disso, a luz *p*-polarizada é completamente refratada (Figura 4(c)).

2.4 PM-IRRAS

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de caracterização que mensura o momento de dipolo das moléculas, e é bastante utilizada na detecção e identificação de substâncias químicas. No entanto, essa técnica não é interessante em superfícies aquosas devido, principalmente, ao fato de que as bandas referentes à água da subfase e do vapor do ambiente acabam sobressaindo as bandas de interesse de estudo (HERZBERG, G.; CRAWFORD, 1946).

A técnica espectroscópica PM-IRRAS (do inglês *polarization-modulation infrared reflexão-absorption spectroscopy*) se baseia na alternância da polarização da luz incidente (*s*-perpendicular e *p*-paralelo ao plano de incidência) sobre uma monocamada de um filme de Langmuir (BLAUDEZ et al., 1993), onde estas frequências são da ordem de dezenas de kHz. Sendo assim, quando a frequência de oscilação de uma dada ligação coincide com a energia da radiação infravermelha incidente, sucede-se um fenômeno chamado ressonância, ocasionando assim a absorção da radiação. Ou seja, esta técnica é eficiente na identificação de mudanças na estrutura das moléculas (MENDELSON; FLACH, 2002), (MENDELSON; MAO; FLACH, 2010).

Desse modo as medidas dos espectros podem ser realizadas simultaneamente em ambas as polarizações, e a refletividade diferencial (*S*) pode ser observada na equação 2 a seguir:

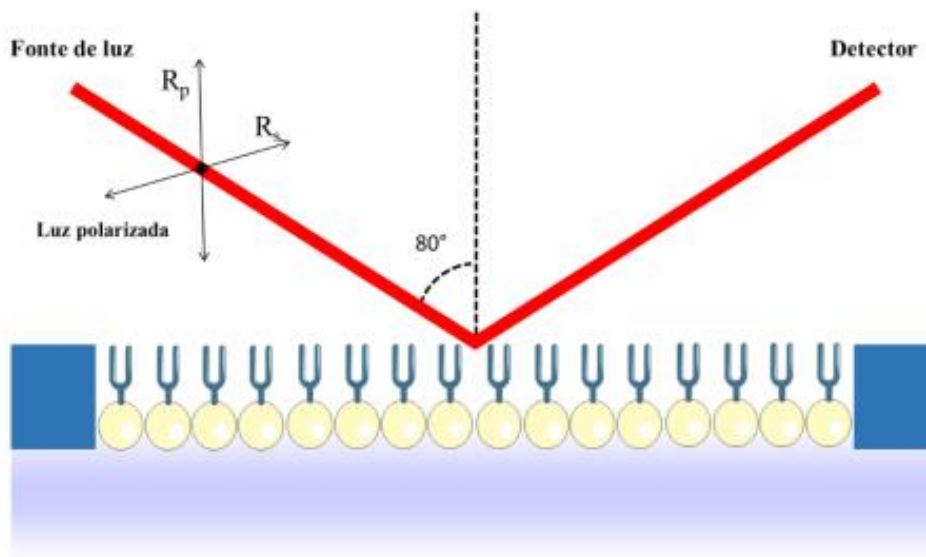
$$S = \frac{R_s - R_p}{R_p + R_s} \quad (2)$$

Onde R_s e R_p são as refletividades das polarizações do plano *s* e *p*, respectivamente.

No caso dos filmes de Langmuir, pode-se avaliar, utilizando a refletividade diferencial, a orientação de grupos químicos componentes das moléculas, como mostra a Figura 5. Quando o feixe polarizado é absorvido de forma paralela ao plano de incidência,

são evidenciados preferencialmente os dipolos orientados na vertical, no entanto, quando o feixe polarizado é absorvido perpendicularmente ao plano de incidência, os dipolos na horizontal são observados (GERALDO, 2013).

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

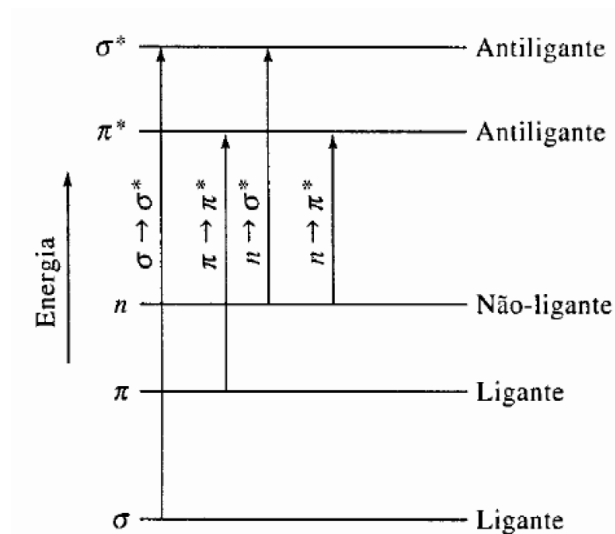


Fonte: (PEREIRA, 2019)

2.5 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia de absorção no UV-Vis utiliza fenômenos de absorção da radiação com energia na região do ultravioleta e visível. A radiação é absorvida por uma molécula quando a sua energia é igual à energia necessária para que ocorra uma transição eletrônica. A radiação UV ou visível corresponde, então, à energia de excitação dos elétrons mais externos dessas moléculas. A excitação promove a transição de um elétron de um orbital molecular ocupado para um orbital desocupado mais energético. As principais transições eletrônicas envolvem os elétrons π , σ e n das moléculas. A Figura 6 mostra uma ilustração do processo de absorção no UV-Vis em um diagrama de energia, com suas principais transições (DOUGLAS SKOOG, DONALD M. WEST, F. JAMES HOLLER, 2006).

Figura 6: ilustração do processo de absorção de energia na região do UV-Vis (transição eletrônica) em um diagrama de energias.



Fonte: (DOUGLAS SKOOG, DONALD M. WEST, F. JAMES HOLLER, 2006)

2.6 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica é um tipo de microscopia de varredura de sonda. Nesta técnica, uma sonda extremamente fina interage com a amostra em determinada área pré-definida. Desta forma, o equipamento consegue detectar as forças intermoleculares (atração e repulsão) entre a ponta da sonda e o material que está sendo estudado. A área varrida pela sonda é enviada para um computador onde um sistema complexo gera uma imagem topográfica desta amostra, permitindo assim estudar a sua morfologia minuciosamente, tendo informações sobre os materiais depositados e a rugosidade, por exemplo (PINTO; RAMOS; FONSECA FILHO, 2013).

2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura consiste em incidir um feixe de elétrons de pequeno diâmetro na superfície da amostra e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Elétrons com pequenos comprimentos de onda ($\lambda=0,005\text{\AA}$) são produzidos com alto poder de resolução. Os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos e eletromagnéticos e, conseqüentemente, são capazes de formular imagens de alta resolução, chegando a valores de 1 nm em instrumentos mais avançados. Desta forma, alguns aparelhos possuem a capacidade de aumentar em até 300.000 mil vezes ou mais

para a maior parte dos materiais sólidos. Esta técnica é utilizada principalmente para estudar características estruturais e morfológicas de superfícies e identificar elementos químicos em amostras sólidas. Além disso, o MEV permite a análise tridimensional das imagens geradas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a funcionalização de membranas comerciais de ultrafiltração pela técnica de LS utilizando biomembranas miméticas (modelos miméticos de membrana biológica) e avaliar sua permeabilidade do poluente emergente BPA. Os objetivos específicos são descritos a seguir:

1. Estudar a interação entre o fosfolipídio DOPC e o colesterol com a molécula Anfotericina B via isoterma π -A utilizando filmes de Langmuir;
2. Observar mudanças na morfologia via Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM) dos filmes de Langmuir do fosfolipídio DOPC e colesterol na presença de Anfotericina B e BPA;
3. Identificar via PM-IRRAS em filmes de Langmuir quais grupos químicos das moléculas do fosfolipídio DOPC estão envolvidos nas interações com o colesterol, a Anfotericina B e o BPA;
4. Funcionalizar as membranas de filtração pela técnica Langmuir-Schaefer;
5. Caracterizar as membranas funcionalizadas por meio de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
6. Avaliar a permeabilidade do BPA por meio da capacidade de retenção entre os poros da membrana funcionalizada.

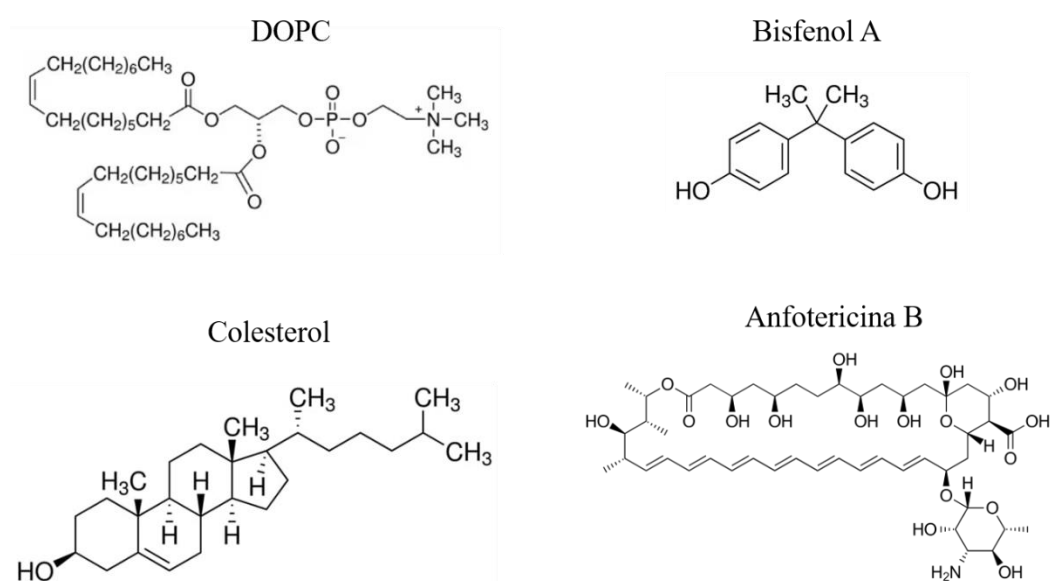
4. Experimental

4.1 Materiais e Reagentes

Inicialmente, foi utilizada uma membrana de poli(fluoreto de vinilideno-co-hexafluoropropileno) (PVDF-HFP), produzida por eletrofiliação com alta porosidade (87.6%) e uniformidade de diâmetro de poros. Todo o processo experimental para obtenção da membrana foi descrito por Dognani et al. (DOGNANI et al., 2019) e a membrana foi cedida pelos autores. As membranas comerciais foram adquiridas da Sigma-Aldrich. Foram utilizadas membranas de celulose regenerada 3 kDa, membranas de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) hidrofílico 0,22 μm e de Politetrafluoretileno

(PTFE) 0,22 μm . Todas as membranas foram utilizadas com 44,5 mm de diâmetro, por ser o diâmetro do suporte do sistema de filtração. O Bisfenol A (228,29 g/mol), a anfotericina B (924,079 g/mol), o NaCl (58,44 g/mol), o AgNO_3 (ACS; 99,0%; MM: 169,67 g/mol), o Na_2CO_3 (105,98 g/mol) e o Folin-Ciocalteu (reagente de fenol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O lipídio DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 785,593 g/mol) e o colesterol (386,65 g/mol) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids. As estruturas moleculares desses compostos estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Representação da estrutura molecular do fosfolipídio DOPC, colesterol e das substâncias Anfotericina B e Bisfenol A



Fonte: Sigma Aldrich

4.2 Filmes de Langmuir e Langmuir-Schaeffer

Os filmes de Langmuir foram estudados em uma cuba de Langmuir KSV Nima modelo 2000 de 200 mL. As isotermas foram obtidas em triplicata em subfase aquosa e em subfase de NaCl 3M. Os filmes de Langmuir foram produzidos espalhando DOPC, Colesterol e AmB na subfase, todos com concentração de 1 mM. As soluções de DOPC e Colesterol foram dissolvidas em clorofórmio, enquanto a solução de AmB foi solubilizada em DMF/HCl 3:1. Inicialmente, obteve-se as isotermas das substâncias isoladas. Posteriormente, também foram obtidas as curvas referentes as misturas DOPC/Chol 7:3, DOPC/AmB 1:1, Chol/AmB 1:1 e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4. A

proporção foi escolhida a partir de resultados experimentais. As isotermas π -A foram obtidas a 23 °C pelo método de Wilhelmy, utilizando o sensor de papel filtro. A monocamada foi comprimida simetricamente a uma taxa de compressão constante de 10 mm/min. Todas as isotermas foram todas obtidas em triplicata.

4.3 Módulo compressional

A análise do módulo compressional (C_s^{-1}) foi realizada a partir dos dados coletados das isotermas π -A dos lipídios, para todos os casos analisados. O processo para obtenção dos valores de C_s^{-1} é baseado na Equação 3. Por fim, os gráficos foram obtidos plotando C_s^{-1} em função da pressão de superfície, onde π é a pressão de superfície e A é a área molecular média.

$$C_s - 1 = -1A \frac{\partial \pi}{\partial A} \quad (3)$$

4.4. Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

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

Primeiramente a placa de vidro preta com dimensões de 30 mm x 40 mm x (2 até 0.5) mm é colocada sobre a cuba de forma que fique entre o laser e a objetiva, em seguida a cuba é preenchida com 120 mL da subfase de interesse. Antes da isoterma começar foi realizada a linha de base da superfície para reduzir a interferência e melhorar a qualidade de imagem, a partir desse ponto a isoterma π -A seguem da mesma forma dos filmes de Langmuir. A captura das imagens é feita de forma manual, sendo assim foram capturadas em praticamente as pressões de superfície até o colapso, dando ênfase na pressão de 30 mN/m, devido a membrana celular teoricamente possuir este valor pressão (RUIZ et al., 2020).

4.5 PM-IRRAS

Os espectros de PM-IRRAS foram adquiridos com o auxílio da Dra. Debora Balogh, no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física da USP – São Carlos no espectrofotômetro modelo PMI550 da KSV Instruments. O espectro foi coletado no intervalo de 800 a 4200 cm^{-1} , com cada espectro contendo 6000 varreduras a uma taxa de 10 varreduras/segundo, e com resolução espectral de 8 cm^{-1} . As medidas foram realizadas com o ângulo rasante de 80° em temperatura ambiente (23 °C), sendo os espectros obtidos na pressão superficial de 30 mN/m. Os espectros foram obtidos para o DOPC, DOPC/Chol e DOPC/Chol/AmB em subfase com NaCl 3M. A concentração de das soluções espalhadas era de 1 mM. O procedimento experimental se dá de forma similar ao dos filmes de Langmuir.

4.6 Espectroscopia UV-Vis

O filme e uma solução de AmB em DMF/HCl 3:1 de concentração $2,6 \times 10^{-5}$ M foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis. Duas camadas de filme foram depositadas em substrato de quartzo através da técnica LS, enquanto o espectro da solução foi obtido em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As medidas de absorção no UV-Vis foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, na região de 190 a 1100 nm.

4.7 Imagens de microscopia de força atômica (AFM)

As caracterizações de AFM nas amostras foram realizadas em uma área de 10x10 micrômetros, utilizando o microscópio Nanosurf, modelo EasyScan 2, ponta de silício acoplada a um cantiléver e modo de operação de contato. Foram feitas imagens do substrato de mica (dimensão de 15 mm x 15 mm e espessura de 0,15-0,2 mm) sem deposição de filme e dois substratos de mica modificado com 2 camadas de DOPC e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4.

4.8 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

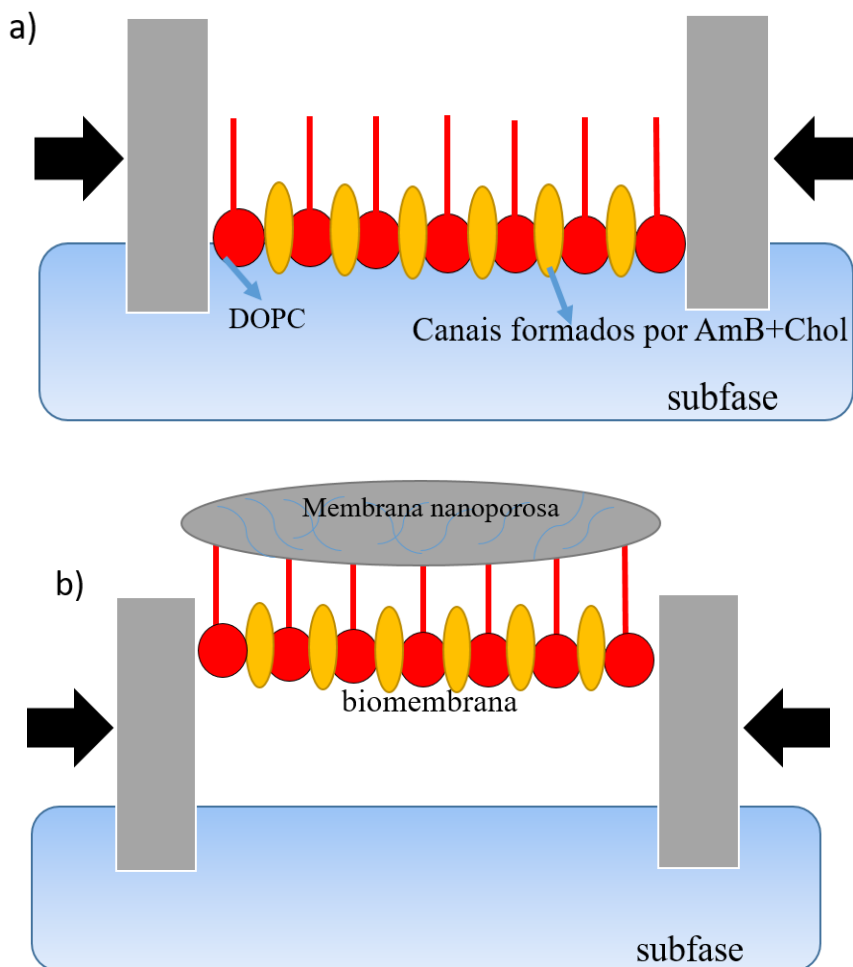
As caracterizações de MEV foram realizadas pelo Doutor Lucas Citolino. As análises foram realizadas utilizando um microscópio Carl Zeiss modelo EVO LS15, em alto vácuo e com uma tensão de aceleração de 5 kV. As amostras foram preparadas utilizando uma fita de carbono (condutora). A fita com o material foi colada sobre um

porta-amostra (stub) metálico, próprio para utilização no MEV. Como os materiais são isolantes, a interação do feixe de elétrons com a amostra faz com que o material absorva cargas. Este efeito interfere na medida dos elétrons espalhados, sendo necessária o escoamento dessas cargas absorvidas. Dessa forma, foi necessário depositar uma camada fina de ouro sobre a amostra utilizando *sputtering*. Foram feitas imagens do substrato de mica sem deposição de filme e dois substratos de mica modificados com 2 camadas de DOPC e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4.

4.9 Funcionalização da membrana

A primeira membrana utilizada para funcionalização foi cedida via colaboração com o Dr. Guilherme Dognani. O procedimento de caracterização da membrana está descrito na literatura ((DOGNANI et al., 2019) e foi brevemente comentado na seção 3.1. Em seguida, optou-se por utilizar membranas comerciais de celulose regenerada, PVDF hidrofílico e PTFE, devido a dificuldade de trabalhar com a membrana artesanal. As membranas foram funcionalizadas através da técnica LS, citada anteriormente. Uma monocamada composta por DOPC, AmB e Chol foi estruturada através da cuba de Langmuir. Após a evaporação do solvente (clorofórmio) e compressão, a monocamada foi transferida horizontalmente para as membranas. Para as caracterizações, duas camadas foram depositadas sobre as membranas. Já para a filtração, foram feitos testes com substratos que foram funcionalizados com 2, 4 e 10 camadas. Glutaraldeído (0,5 e 1%) foi utilizado em algumas análises como *crosslink*. A pressão utilizada na maioria dos testes foi de aproximadamente 3 bar. Um esquema para melhor compreensão da funcionalização da membrana pode ser observada na Figura 8.

Figura 8: diagrama esquemático representando (a) a formação do filme de Langmuir formado pela compressão dos lipídeos junto aos canais iônicos formados pela AmB e colesterol e (b) o filme LS depositado na superfície da membrana nanoporosa.



Fonte: Próprio autor

4.10 Caracterização da membrana funcionalizada

A fim de caracterizar e entender a estrutura morfológica das membranas antes e após sua funcionalização, análises de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia UV-Vis e microscopia de ângulo de Brewster (BAM) foram realizadas. A espectroscopia UV-Vis foi realizada para identificar a deposição e presença da AmB no filme e seu espectro em solução. Por sua vez, as análises de AFM, MEV e BAM possibilitaram a observação da morfologia dos filmes depositados.

4.11 Processo de filtração

Os experimentos de filtração foram realizados de acordo com a literatura (NAVARRO et al., 2018), (GADWAL et al., 2018). Para isso, foi utilizado um módulo de membrana sistema “dead-end” (Millipore Amicon® Stirrer Cell, modelo 8050), mostrado na Figura 9, em temperatura ambiente. As membranas nanoporosas funcionalizadas foram cortadas em discos com área efetiva de 15,5 cm² e posicionadas na parte inferior do módulo. O desempenho da membrana foi avaliado injetando-se soluções de BPA em água.

Figura 9: Sistema de filtração Millipore Amicon® Stirrer Cell, modelo 8050.



Fonte: (MERCK).

Para estes testes, as soluções de BPA foram difundidas através da membrana funcionalizada e, em seguida, alíquotas da solução permeada foram coletadas e analisadas. Para determinação da permeabilidade do BPA, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, utilizado para quantificar fenóis em uma amostra, como observado por Singleton et al. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Foram feitas 10 diluições diferentes da solução estoque de BPA em tubos de ensaio. Em cada tubo, foram acrescentados 25 µl do reagente Folin, com um tempo de pausa de 5 minutos. Após, foram acrescentados 1000 µl de Na₂CO₃, e os tubos serão aquecidos a 37°C por 20 minutos. Uma curva de calibração pôde ser elaborada através das absorbâncias obtidas por espectrofotometria UV-Vis.

4.12 Análises de fluxo de permeado e retenção

Após a filtração, a produção de fluxo de permeado das membranas também foi avaliada. O fluxo permeado foi determinado conforme indicado na Equação 4.

$$J0 = \frac{V}{A \times t} \quad (4)$$

onde:

$J0$ = fluxo de permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$);

V = volume coletado (L)

A = área efetiva da membrana (m^2);

t = tempo de coleta.

Em misturas aquosas diluídas consistindo em água e um soluto, a eficiência de uma membrana é geralmente expressa em termos do coeficiente de rejeição de soluto, calculado em porcentagem pela equação 5:

$$\%R = \left(1 - \frac{Cp}{Cf}\right) \times 100 \quad (5)$$

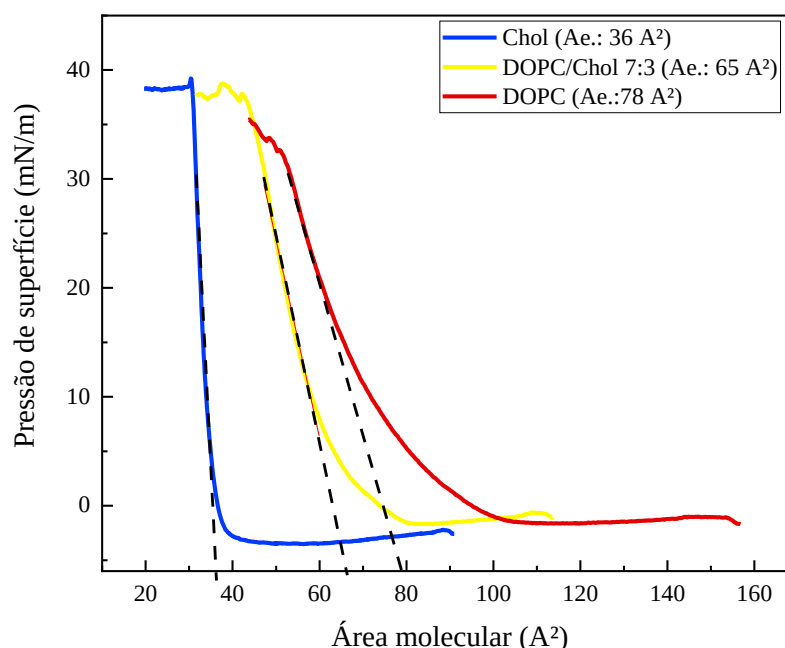
Onde Cp é a concentração da solução filtrada e Cf a concentração da solução estoque utilizada para alimentação. O percentual de rejeição foi calculado utilizando a concentração de BPA da solução de alimentação (solução estoque, de 1×10^{-5} M) e a concentração da solução de BPA permeada após a filtração.

5. Resultados e Discussão

5.1 Filmes de Langmuir

Os estudos da formação de filmes de Langmuir de DOPC, Chol e DOPC/Chol 7:3 (todas as soluções em concentração de 1 mM) são mostrados na Figura 10. A proporção de DOPC/Chol escolhida se baseia na proporção encontrada nas membranas plasmáticas de células de mamífero (RUIZ et al., 2020). As compressões foram realizadas em subfase aquosa para o estudo da atividade superficial das substâncias utilizadas e para o estudo das interações entre elas.

Figura 10: Isotermas π -A de DOPC, Chol, DOPC/Chol (7:3) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: indicação da área extrapolada da fase condensada.



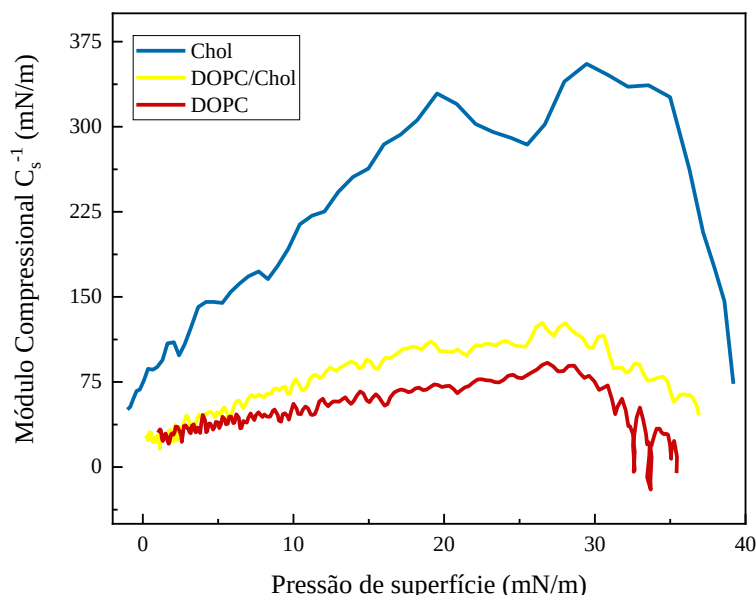
Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos para o fosfolípido DOPC e para o colesterol estão devidamente de acordo com os encontrados na literatura, com pressão de colapso próxima a 40 mN/m e área de colapso em 78 Å² (JR et al., 2009). Como esperado, nenhuma das isotermas apresentou transição de fase, devido às insaturações presentes na cauda hidrofóbica do fosfolípido (MATAR; BESSON, 2011). A isoterma de colesterol puro apresentou área extrapolada em 36 Å², valor próximo ao que é encontrado na literatura (RIES; SWIFT, 1978). Também foi possível notar um aumento direto de pressão conforme a área diminuía, característica de monocamadas rígidas (RUIZ et al., 2020). Como pode ser observado, a curva para a mistura DOPC/Chol 7:3 encontra-se entre as curvas obtidas para as duas substâncias, sendo mais próxima da curva de DOPC, o que já era esperado, uma vez que a proporção usada possui maior quantidade de moléculas de DOPC. Além disso, considerando as áreas extrapoladas e a média ponderada considerando a proporção DOPC/Chol 7:3, $(0,7 \cdot \text{AE DOPC} + 0,3 \cdot \text{AE chol}) = (54,6 + 10,8 = 65,4)$, o valor encontrado é exatamente a área extrapolada da mistura, indicando que a mistura formada é uma mistura ideal (JR et al., 2009). Na literatura, um

estudo com microscopia de força atômica mostra que regiões mais altas são mais ricas em colesterol, enquanto regiões mais baixas apresentam colesterol em menor proporção, mas não indicando separação completa de fases nesta proporção e mistura (BOTET-CARRERAS et al., 2019). Isso corrobora com o comportamento observado neste trabalho.

O gráfico do módulo compressional por pressão de superfície para o fosfolípido DOPC, Chol e para a mistura DOPC/Chol também foi estudado (Figura 11). Essa análise foi realizada com base nas isotermas da Figura 10.

Figura 11: Módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC, DOPC/Chol 1:1 e Chol em subfase aquosa.



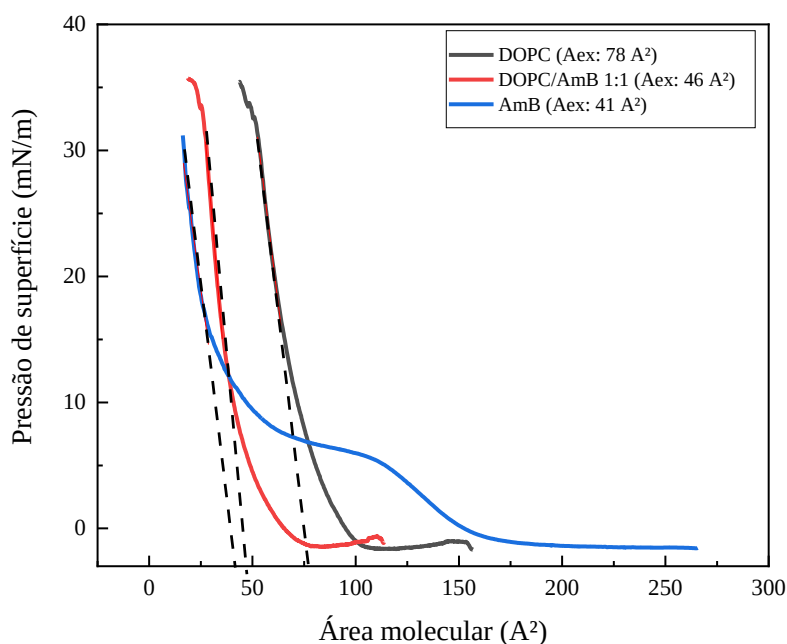
Fonte: próprio autor.

Na pressão superficial de 30 mN/m, o Chol apresenta módulo compressional em torno de 353 mN/m, valor próximo do que também foi observado por Jurak et al. na pressão superficial de 35 mN/m (JURAK, 2013). Para o DOPC, o resultado obtido foi próximo ao valor encontrado na literatura (HAC-WYDRO et al., 2007), com valores de C_s^{-1} em 80 mN/m. O módulo compressional indica o estado físico de filmes monomoleculares, onde valores acima de 250 mN/m sugerem a presença de um estado sólido, como observado para a isoterma de colesterol (MOCANU*; , ROXANA-DIANA PAŞCA; TOMOAIÁ-COTISEL, 2010). A exorbitante diferença entre os valores está relacionado ao fato do colesterol ser conhecido por formar monocamadas rígidas, enquanto o DOPC forma camadas mais fluídas e não apresenta transição de fase, devido

o fato de que a temperatura de transição do DOPC para a fase líquido-cristalina (fluida) se encontra na faixa dos $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (JURAK, 2013). Já para a mistura DOPC/Chol 7:3, é possível notar um aumento na compressibilidade em relação ao DOPC puro, indicando um aumento da rigidez da monocamada. Esse aumento provavelmente não é tão acentuado devido a maior proporção de moléculas de DOPC na monocamada.

Em seguida, foram realizadas compressões a fim de reconhecer o comportamento da AmB na ausência e presença do fosfolípido DOPC, em uma proporção de 1:1 em moléculas (Figura 12). A princípio foi espalhada uma solução de DOPC e, em seguida, o mesmo volume de AmB foi espalhado na subfase. Essa proporção foi escolhida a partir de resultados experimentais, que mostraram que esse volume seria o ideal para este trabalho, pois foi a isoterma que apresentou melhor perfil.

Figura 12: Isotermas π -A de DOPC, AmB, DOPC/AmB (1:1) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: área extrapolada.



Fonte: próprio autor.

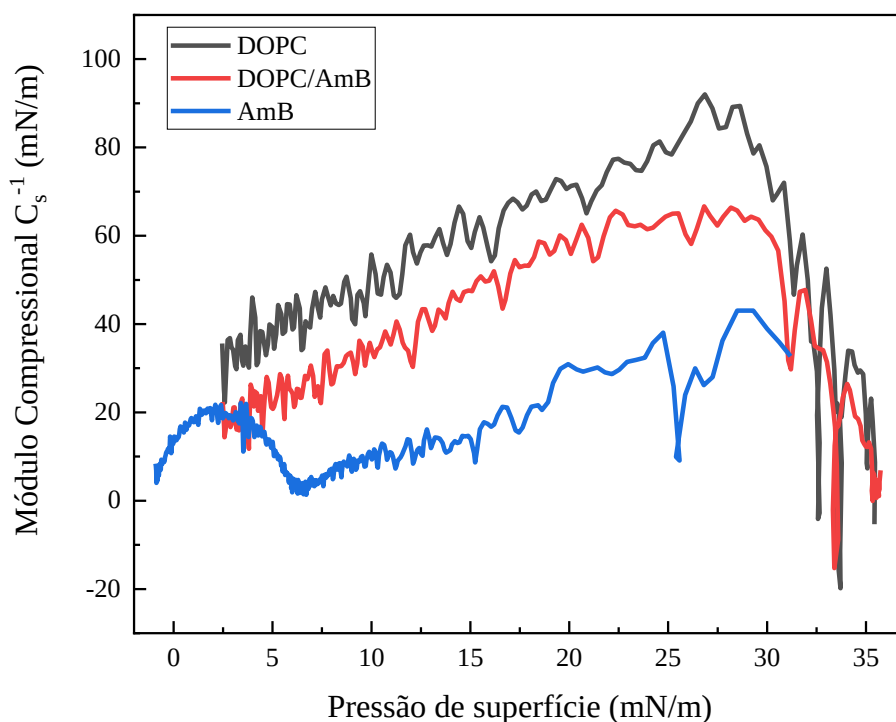
A curva referente a anfotericina B apresentou uma transição de fase bem definida, e esse platô pode ser atribuído com a reorganização das moléculas de AmB, que passam de uma organização na posição horizontal para a posição vertical conforme ocorre a compressão das barreiras, além de uma dessorção da anfotericina da superfície

(MIÑONES et al., 2004), (SAINT-PIERRE-CHAZALET et al., 1988). A isoterma apresenta um platô onde a pressão se mantém quase constante, que separa dois estados diferentes da AmB. Na primeira região, a AmB se apresenta na fase líquido-expandida, enquanto após o platô, encontra-se líquido-condensada. De acordo com a literatura, o intervalo de área do platô é notado entre 130 à 70 Å² (SEOANE et al., 1997), e a área extrapolada da fase condensada se encontra próximo aos 44 Å² (SYKORA; NEELY; VODYANOY, 2004), de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Estudos indicam que a presença de esteróis na subfase evita a dessorção da AmB da interface ar-água, justificando porque o platô não aparece quando se comprimem as duas substâncias misturadas (REY-GÓMEZ-SERRANILLOS et al., 2001). Ainda comparando a curva da mistura com as curvas das substâncias puras, podemos notar que a área extrapolada na fase condensada da mistura não é similar a área teórica esperada para uma mistura ideal $([AE_{AmB} + AE_{DOPC}]/2)$ que seria de 59,5 Å². Como a área obtida experimentalmente é menor do que a área teórica (46 Å²), podemos concluir que existe uma interação atrativa entre as substâncias, ou uma reorganização que favorece a compactação da monocamada.

A Figura 13 apresenta o módulo compressional das isotermas de DOPC, AmB e DOPC/AmB 1:1, discutidas na Figura 12 acima.

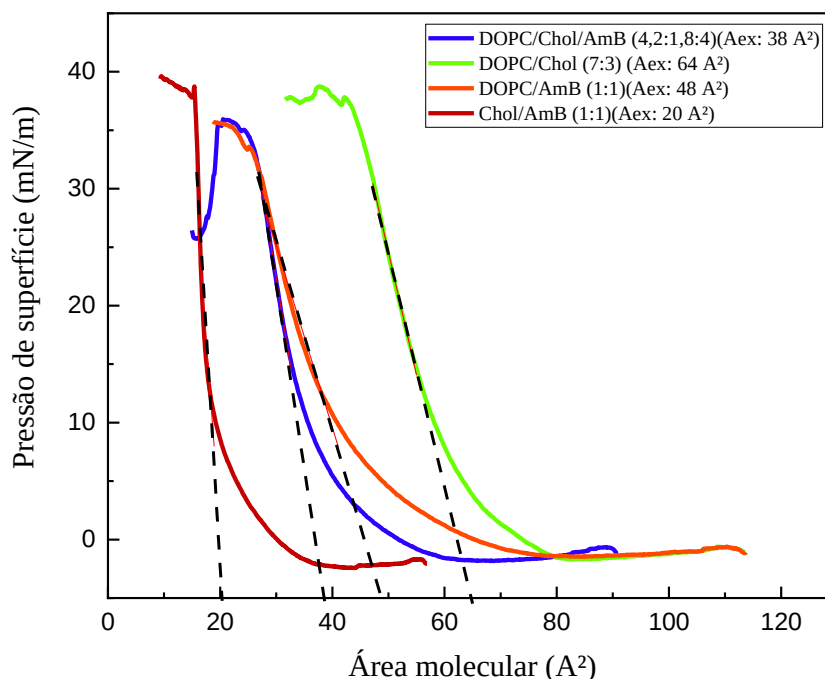
Figura 13: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície do lipídio DOPC, DOPC/AmB 1:1 e AmB em subfase aquosa.



Fonte: próprio autor.

Como já citado anteriormente, a monocamada de DOPC apresenta módulo compressional próximo de 80 mN/M na pressão superficial de 30 mN/m. Já a monocamada de AmB apresentou resultado em torno de 39 mN/m. A mistura DOPC/AmB 1:1 mostra um aumento no valor do módulo compressional, com C_s^{-1} de 61 mN/m. Esse aumento indica que, na presença de AmB, há uma diminuição na rigidez da monocamada em relação ao DOPC puro. A Figura 14 mostra as curvas obtidas para compressões com diferentes misturas, sendo a proporção de 7:3 para o DOPC/Chol, DOPC/AmB e Chol/AmB. Já a proporção para a mistura ternária de DOPC/Chol/AmB foi de 4,2:1,8:4. Essa proporção foi escolhida após diversos testes onde foram espalhadas maiores e menores quantidades de AmB. No entanto, a proporção de 4,2:1,8:4 foi a que apresentou melhor perfil.

Figura 14: Isotermas π -A de DOPC/Chol (7:3), DOPC/AmB (1:1) Chol/AmB (1:1) e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em subfase de água ultrapura. Linha tracejada: área extrapolada.



Fonte: próprio autor.

Comparando novamente a curva da mistura com as curvas das substâncias puras, podemos notar que a área extrapolada da mistura Chol/AmB e da mistura DOPC/Chol/AmB também não é similar a área teórica esperada para uma mistura ideal. Teoricamente, a área para as misturas Chol/AmB $([AE_{AmB} + AE_{Chol}]/2)$ e DOPC/Chol/AmB $(0,42 \cdot AE_{DOPC} + 0,18 \cdot AE_{col} + 0,4 \cdot AE_{AmB}) = (32,76 + 6,48 + 16,4 = 55,6)$ seria de $38,5 \text{ Å}^2$ e $55,6 \text{ Å}^2$, respectivamente. No entanto, as áreas obtidas experimentalmente são menores do que as áreas teóricas (20 Å^2 e 38 Å^2), indicando também uma interação atrativa ou uma reorganização que favorece a compactação das monocamadas.

Nota-se um deslocamento para menor área nas curvas referentes à todas as misturas na presença de AmB. Diversos estudos indicam que a presença de fosfolipídios na membrana possui grande influência na penetração da anfotericina B. Estima-se que os grupos polares de DOPC podem se ligar aos grupos carboxila e amônia da AmB, porém estas ligações não são tão fortes quanto as ligações da AmB com os esteróis, o que ocasiona uma menor penetração da AmB na monocamada lipídica em comparação com

os esteróis (MIÑONES et al., 2005). Dynarowicz-Łątka et al. estudou as interações da AmB com esteróis e com o fosfolipídio DPPC, e observou que o DPPC se liga a AmB através de ligações iônicas de maneira similar ao que ocorre com o DOPC, mais fracas do que as ligações de hidrogênio que formam os complexos AmB/esterol, gerando também menor penetração da AmB na monocamada lipídica (DYNAROWICZ-ŁĄTKA et al., 2003).

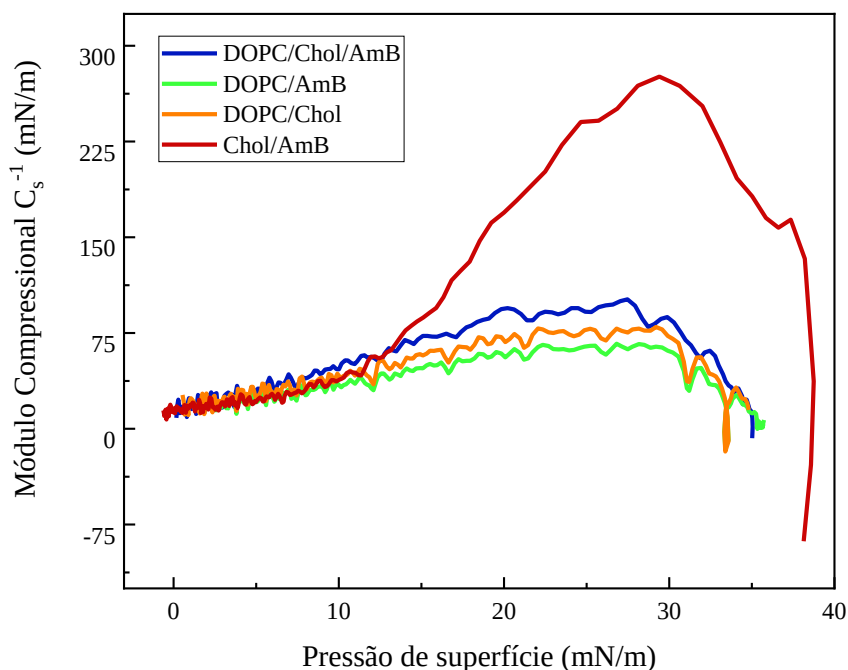
Estudos relatam que, na presença de anfotericina B, a monocamada lipídica se torna mais organizada, o que pode ser a causa da condensação observada na sua presença (WANG et al., 2020). Já em camadas mistas de DOPC/Chol, a AmB, quando em forma monomérica, apresenta comportamento similar em relação a penetração nas monocamadas independentes. As moléculas se organizam separadamente com o colesterol e com o DOPC. No entanto, quando na forma agregada, a penetração de anfotericina B na subfase é maior devido a interações fortes que ocorrem entre os seus agregados e as demais componentes da monocamada (MIÑONES et al., 2005).

Outro fator bem conhecido na literatura é a formação de canais iônicos pela AmB em membranas celulares após interagir com os fosfolipídios e esteróis da membrana, embora a formação de canais na ausência de colesterol não tenha sido descartada (DENNIS; STEAD; ANDREOLI, 1970), (WANG; ZHU, 2021). A anfotericina forma poros estáveis e bem estruturados devido às ligações de hidrogênio já discutidas. Estima-se que os canais sejam formados por seis à oito moléculas de AmB, com proporção 1:1 com o colesterol (BAGINSKI; RESAT; MCCAMMON, 1997).

A condensação da mistura DOPC/Chol para menor área, quando na presença de anfotericina B, também foi observada. Em fosfolipídios de cadeia insaturada, na presença de colesterol, indica-se que a AmB acaba tornando a organização molecular mais compacta (WANG et al., 2020).

A análise do módulo compressional das curvas apresentadas na Figura 14 foi realizada e está ilustrada na Figura 15, abaixo.

Figura 15: Gráfico do módulo compressional por pressão de superfície das misturas DOPC/Chol/AmB, DOPC/AmB, DOPC/Chol e Chol/AmB em subfase aquosa.

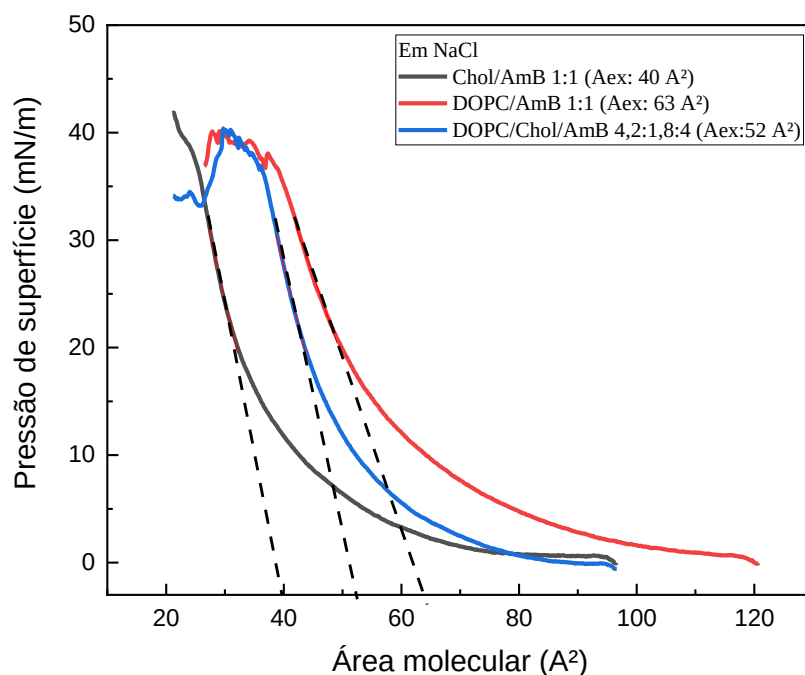


Fonte: próprio autor.

Os valores de C_s^{-1} para as misturas DOPC/Chol/AmB, DOPC/AmB e DOPC/Chol não apresentaram diferença significativa entre si na pressão superficial de 30 mN/m, indicando que a fluidez da monocamada era semelhante em todos os casos citados. Já na mistura Chol/AmB, é possível notar um aumento significativo no valor do módulo de compressão da monocamada em relação à monocamada somente de AmB, indicando que o Chol está tornando a monocamada de AmB mais rígida.

A fim de estudar um possível efeito “*salting out*” e consequentemente reorganizações das monocamadas na presença de sal, algumas curvas foram obtidas em subfase salina, com NaCl 3 M. De acordo com Gomez-Serranillos et al., a adição de NaCl na subfase diminui a solubilidade da AmB conforme a força iônica aumenta (GOMEZ-SERRANILLOS et al., 1999), devido ao efeito *salting out*. Os estudos das monocamadas DOPC/AmB (1:1) Chol/AmB (1:1) e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em subfase salina de NaCl 3M são mostrados na Figura 16.

Figura 16: Isotermas π -A de DOPC/AmB (1:1) Chol/AmB (1:1) e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em subfase salina de NaCl 3M. Linha tracejada: área extrapolada.



Fonte: próprio autor.

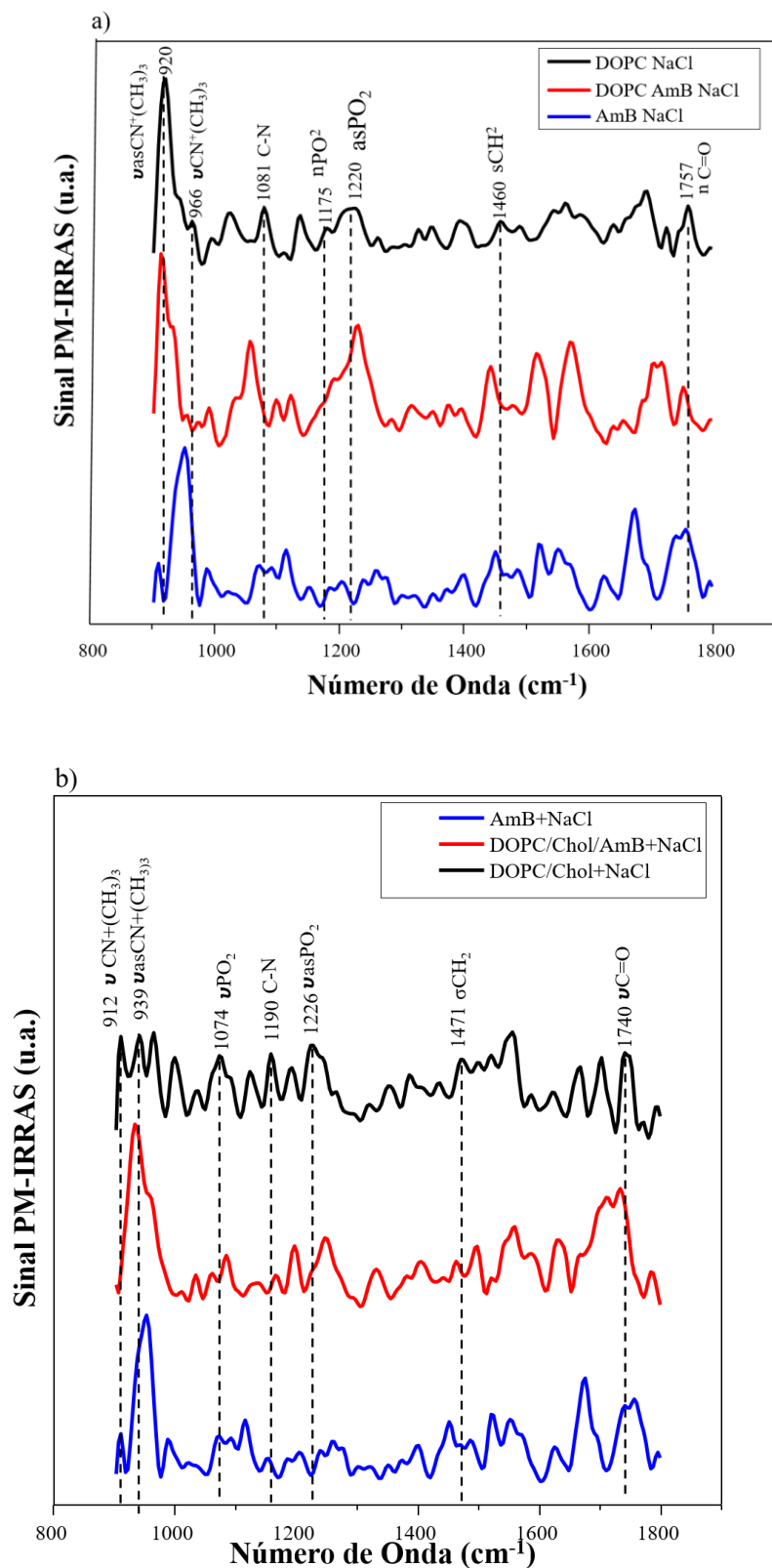
Na Figura 14, pode-se observar que as curvas são pouco mais inclinadas na presença de sal do que as obtidas em subfase aquosa (mostradas na Figura 12). Além disso, as três curvas apresentaram deslocamento para maior área em comparação com a subfase aquosa. Houve também diferença na área extrapolada para a mistura Chol/AmB (de 20 Å² para 40 Å²), DOPC/AmB (de 48 Å² para 63 Å²) e para DOPC/Chol/AmB (de 38 Å² para 52 Å²).

Conforme observado por De Mel et al. para vesículas de DOPC, a presença de NaCl pode ocasionar o aumento na rigidez da membrana lipídica, consequência de um aumento na espessura da membrana causada por desidratação (DE MEL et al., 2020). Jurkiewicz et al. citou que, em bicamadas de POPC/POPS, a presença dos íons da subfase salina ocasiona mudanças estruturais, devido à adsorção dos cátions (JURKIEWICZ et al., 2012). A adsorção dos íons na superfície pode estar relacionada com a mudança para maior área observada em relação as mesmas curvas obtidas em subfase de água ultrapura.

5.2 PM-IRRAS

Os espectros PM-IRRAS para os sistemas DOPC, DOPC/AmB, AmB e DOPC/Chol/AmB a 30 mN/m, em temperatura ambiente (23°C) em subfase de NaCl 3 M são apresentados na Figura 17 a) e b). O intervalo analisado está entre 900 e 1800 cm⁻¹, pois é a região espectral relacionada às vibrações dos grupos orgânicos que compõem a cabeça do fosfolipídio.

Figura 17: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC, AmB e DOPC/AmB e (b) AmB, DOPC/Chol e DOPC/Chol/AmB em subfase salina NaCl 3M, na região da cabeça do fosfolipídio. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.



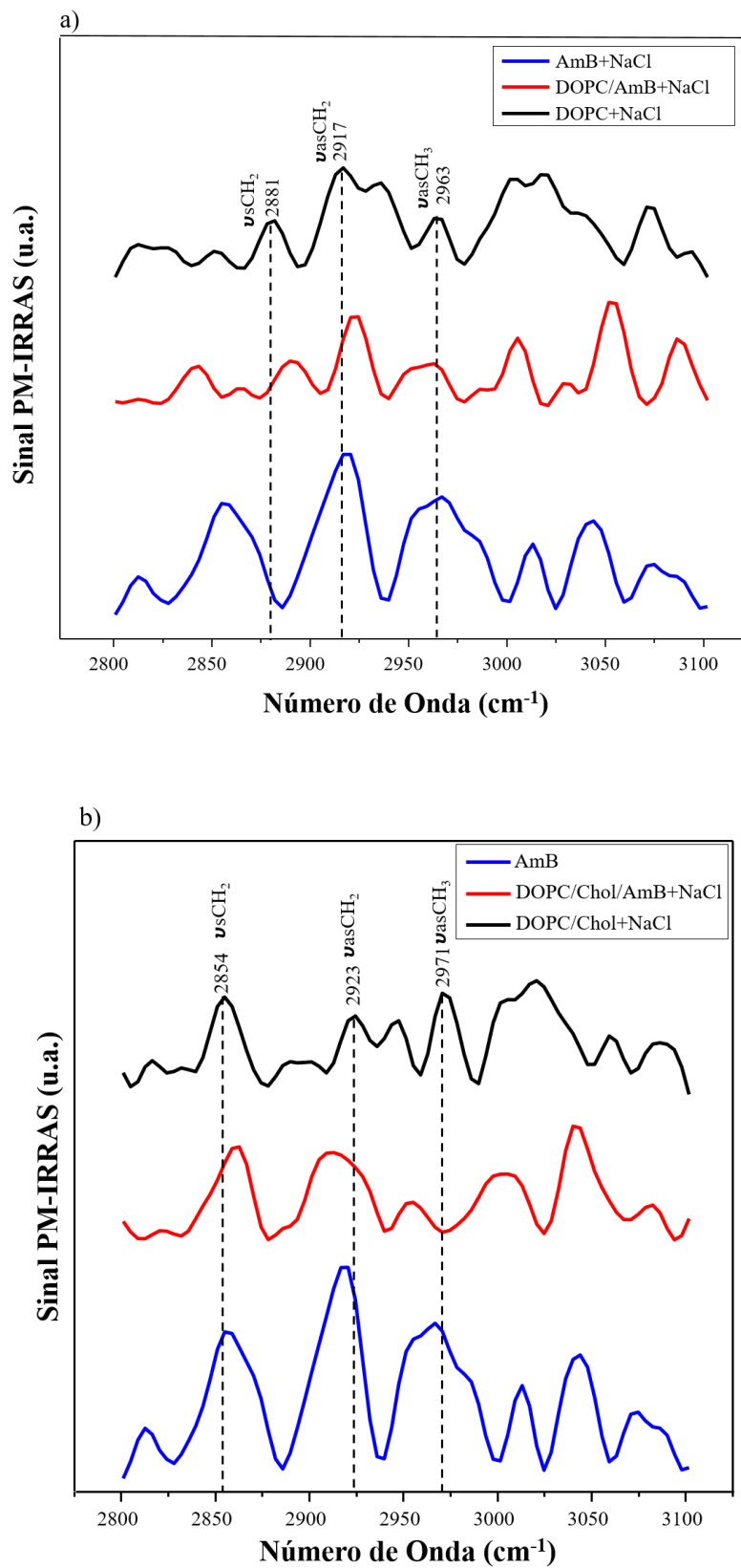
Fonte: próprio autor.

O espectro PM-IRRAS para o DOPC apresenta as bandas relacionadas aos grupos mais importantes da cabeça do fosfolípido e estão de acordo com o que foi relatado na literatura (SCHMIDT et al., 2015). Observando a Figura 18, é possível visualizar bandas como os estiramentos simétrico e assimétrico do grupo colina $\nu_{as}(\text{CN}+(\text{CH}_3)_3)$ ($\nu_s = 920$ e $\nu_{as} = 966 \text{ cm}^{-1}$), os estiramentos simétrico e assimétrico de fosfato PO_2 ($\nu_s = 1081 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{as} = 1220 \text{ cm}^{-1}$), a deformação angular de CH_2 (1460 cm^{-1}) e o estiramento $\text{C}=\text{O}$ (1757 cm^{-1}). No espectro com 30% de colesterol, é possível notar a presença das bandas mais importantes relacionadas aos grupos da cabeça do DOPC. De acordo com Arrondo et al., a presença de colesterol não deve afetar as bandas atribuídas ao fosfolípido (ARRONDO; GOÑI; MACARULLA, 1984).

De maneira geral, foram observadas mudanças consideráveis nas vibrações dos grupos moleculares relacionados à cabeça do DOPC na presença de AmB. Essas mudanças indicam que estão ocorrendo interações entre grupos das duas moléculas. As mudanças observadas no grupo colina (de 920 para 916 cm^{-1}) podem ter sido causadas por uma interação eletrostática entre o oxigênio do grupo carboxila da AmB e a parte positiva do grupo colina do DOPC, enquanto as mudanças observadas nos grupos fosfatos $\nu_{\text{C-O-PO}_2}$ (1081 para 1070 cm^{-1}), $\nu_{\text{asC-O-PO}_2}$ (1220 para 1204 cm^{-1}) e carbonila (1757 para 1754 cm^{-1}) podem ser atribuídas às interações entre os hidrogênios dos grupos OH da AmB e os fosfatos e oxigênios da cabeça do lipídio (MAXIMINO et al., 2019). Entende-se que a formação de canais iônicos pela AmB em camadas contendo fosfolípidios e esteróis se deem por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que corrobora com a diferença vista nos espectros (SILBERSTEIN, 1998).

As Figuras 18 a) e b) apresentam os espectros de PM-IRRAS obtidos no intervalo de 2800 a 3100 cm^{-1} para o DOPC, DOPC/AmB, AmB e DOPC/Chol/AmB referente as vibrações relacionadas à cauda do fosfolípido, na subfase de NaCl 3M em pressão superficial de 30 mN/m .

Figura 18: (a) Espectro PM-IRRAS do DOPC, DOPC/AmB e AmB e (b) DOPC/Chol, DOPC/Chol/AmB e AmB em subfase salina NaCl 3M, na região da cauda do fosfolípido obtidos em temperatura ambiente (23 °C) e na pressão superficial de 30 mN/m.

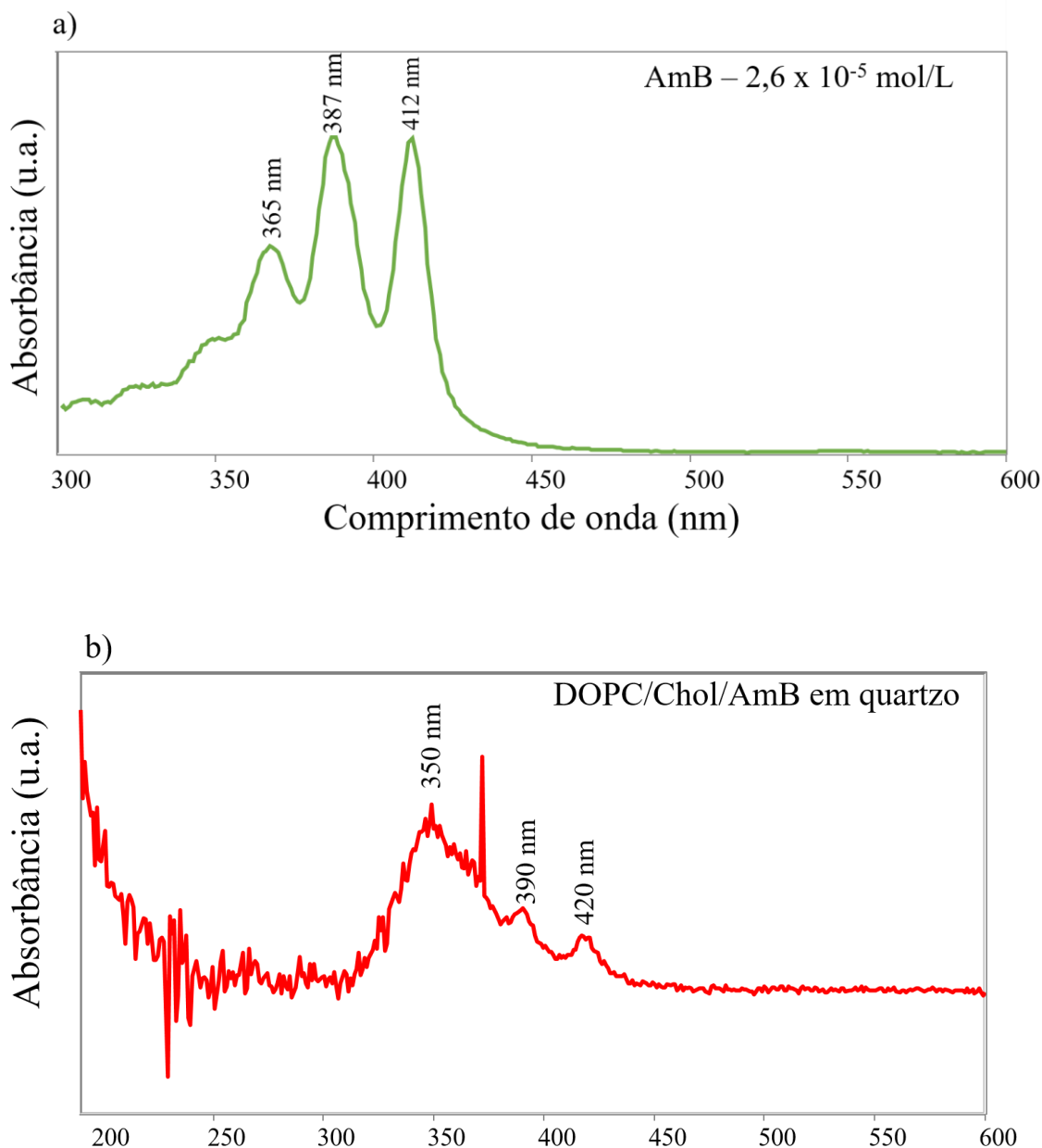


Pode-se avaliar o nível de ordem/desordem na região da cauda do lipídio, analisando a variação na intensidade relativa entre as bandas do CH₂ (simétrica e assimétrica). Segundo Levin et al. (LEVIN et al., 1985), quanto maior a variação da intensidade relativa (ΔIR), maior será o grau de alteração. Caso os valores de ΔIR sejam positivos, isso indica um aumento da desordem, caso os valores de ΔIR sejam negativos, isso indica um aumento da ordem nas caudas dos fosfolipídios na interface ar-água (GOTO; CASELI, 2014). Com a inserção do colesterol a razão entre as bandas aumentou, apresentou assim valores positivos, o que indica um aumento da desordem das cadeias lipídicas após incorporação de colesterol (AOKI et al., 2016). Essa desordem pode estar relacionada com a presença do Chol entre as cadeias lipídicas do DOPC, assim como foi observado em estudos contendo DPPC-Chol de Ruiz et al. (RUIZ et al., 2020). Além disso, as vibrações dos grupos presentes na região da cauda do DOPC quando na presença de AmB foram notáveis. Foi observado um deslocamento no grupo CH₂ simétrico (2881 para 2890 cm⁻¹) e assimétrico (2917 para 2922 cm⁻¹). Também foi possível notar um aumento entre as diferenças de intensidade nos picos desses dois grupos moleculares. Este aumento na diferença de intensidade pode estar indicando um aumento da ordem na região da cauda do fosfolipídio na presença de AmB (GOTO; CASELI, 2014), resultado que coincide com o que foi observado nos estudos de Langmuir neste trabalho.

5.3 UV-Vis

A espectroscopia de absorção no UV-Vis foi utilizada para verificar a presença de AmB na camada de DOPC/Chol, uma vez que o fosfolipídio DOPC e o colesterol não possuem absorção nessa faixa de comprimento de onda da luz. Inicialmente foram obtidos espectros de uma solução de AmB em DMF/HCl (3:1) cuja concentração era de $2,6 \times 10^{-5}$ M e, posteriormente, de duas camadas de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) depositadas em substrato de quartzo. Os espectros obtidos podem ser encontrados nas Figuras 19 (a e b), respectivamente.

Figura 19: Espectros de absorção no UV-Vis para (a) solução de anfotericina B em DMF/HCl 3:1, em uma concentração de $2,7 \times 10^{-5}$ M e (b) filme de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) depositado por LS (2 camadas) em quartzo.



Fonte: próprio autor.

O espectro da AmB em solução apresentou bandas de absorção em 365, 387 e 412 nm. Já o espectro obtido para o filme composto pelas três componentes apresentou bandas em 350, 390 e 420 nm. Os dois espectros apresentam as principais bandas da AmB, referentes à transições $\pi-\pi^*$ (ERNST; GRANGE; DE, 2000). As bandas centradas em 365, 387 e 412 nm são atribuídas as transições vibracionais da AmB na sua forma

monomérica, enquanto as bandas em 350, 390 e 420 nm provavelmente estão relacionados às bandas de excitação correspondentes a AmB no estado agregado. Além disso, o deslocamento das bandas observado para maiores comprimentos de onda entre os dois espectros pode ser atribuído as transições de baixa energia dos agregados de AmB, como descrito por Gagós et al. (GAGÓS; KOPER; GRUSZECKI, 2001)

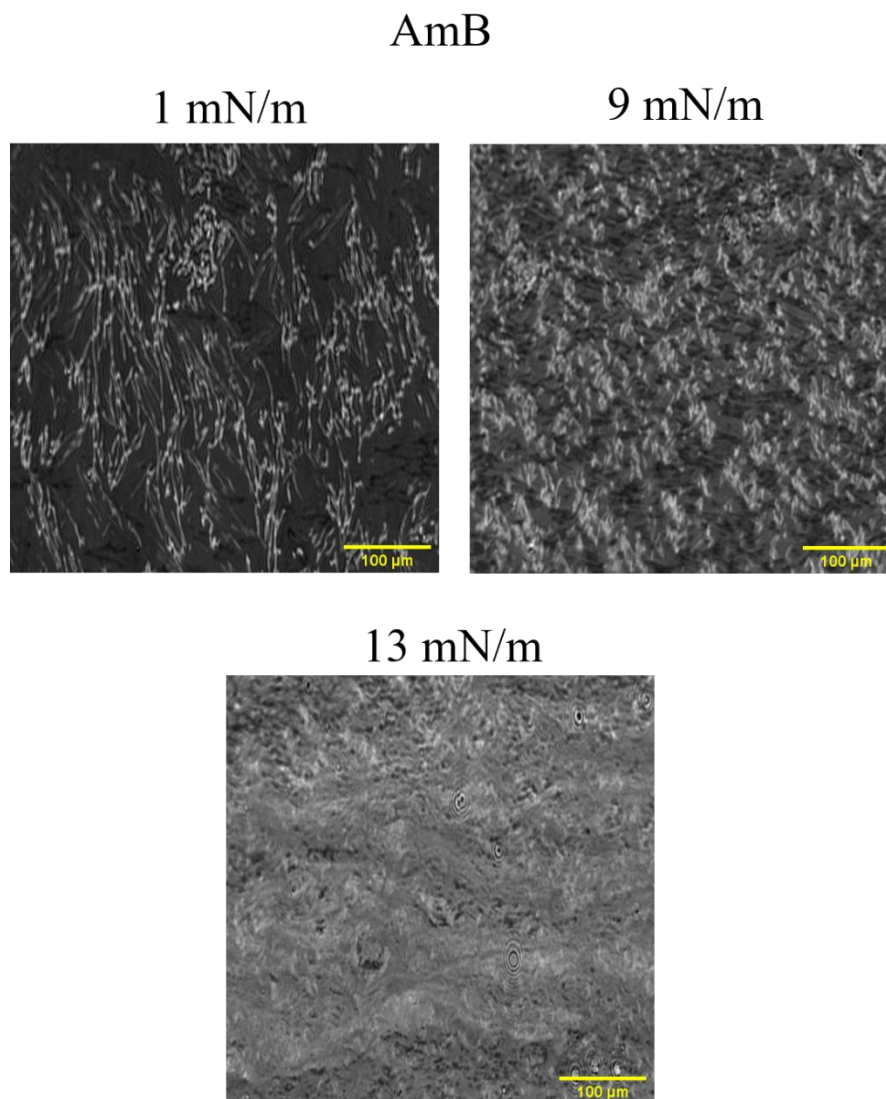
Em concentrações mais altas, a AmB se apresenta em sua forma agregada, enquanto em concentrações mais baixas, acaba se mantendo em sua forma monomérica (BOLARD; SEIGNEURET; BOUDET, 1980). O estado molecular da AmB também depende de fatores como pH, temperatura, força iônica e deslocamento de solvente, além de também ser influenciado pela presença dos fosfolipídios (LARABI et al., 2004). A concentração da AmB também influencia na sua interação com lipídios (KAWABATA; ONDA; MITA, 2001). Nos estudos realizados por Larabi et al., em proporções de 10% a 50%, a interação entre a AmB em seu estado agregado e os fosfolipídios DMPC/DMPG foi bastante estável (LARABI et al., 2004). A banda que aparece em torno de 350 nm indica que a AmB se encontra na sua forma agregada (EGITO et al., 2004), enquanto a banda em 420 nm está relacionada à sua forma monomérica (LAKSHMINARAYANAN et al., 2014), (ERNST; GRANGE; DE, 2000).

Nota-se uma diferença no espectro da AmB pura em solução e a AmB junto à mistura DOPC/Chol. Comparando com os estudos de Les et al (LES et al., 2014), observa-se que o espectro da solução de AmB de $2,6 \times 10^{-5}$ M apresenta um perfil semelhante ao obtido para a forma monomérica, enquanto os picos visualizados para o sistema ternário é semelhante aos associados ao estado agregado. Com o aumento da concentração, espera-se que o estado de agregação aumente ainda mais. É importante enfatizar que o estado da AmB não impede a formação dos canais iônicos na presença de ergosterol, mas é necessário que esteja na forma agregada para formar poros na presença de colesterol, como explicado por Huang et al. (HUANG et al., 2002). Os resultados aqui obtidos estão de acordo com o que foi observado em um trabalho publicado por Fujii et al., em que ouve um deslocamento de bandas, características da agregação da AmB na presença de uma bicamada lipídica (FUJII et al., 1997). Muito provavelmente, o deslocamento observado é uma consequência da forma agregada da AmB no sistema ternário.

5.4 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

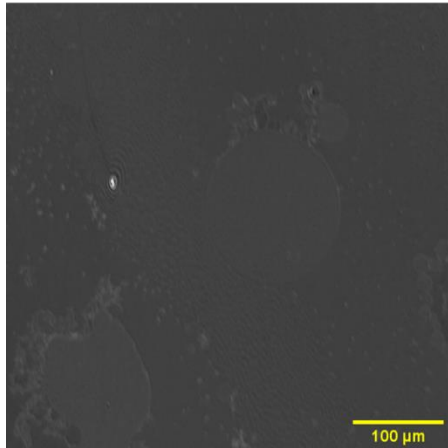
A Figura 20 apresenta as imagens obtidas pela microscopia BAM em temperatura ambiente (23 °C), para as monocamadas de AmB e DOPC/Chol (7:3) em água ultrapura e DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) em ambas subfases, de água ultrapura e BPA (1×10^{-5} M) próximo às pressões de 0, 15 e 25 mN/m.

Figura 20: Imagens de BAM para a AmB, DOPC/Chol 7:3, DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 em subfase contendo BPA 1×10^{-5} M.

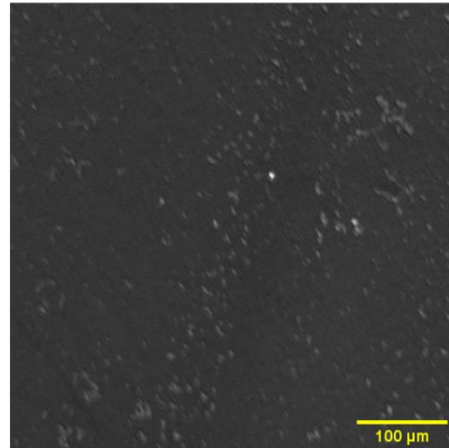


DOPC/Chol

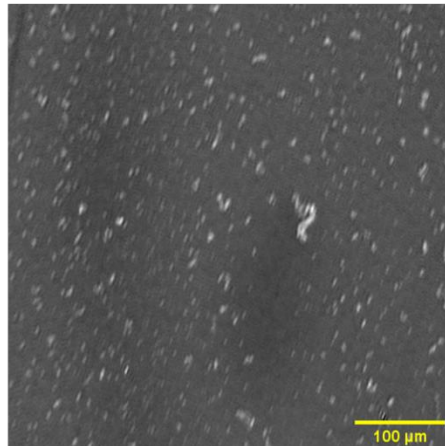
3 mN/m



13 mN/m

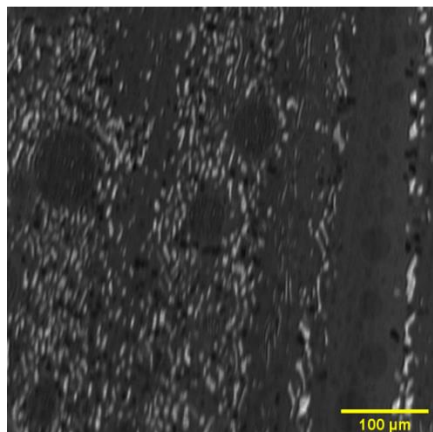


25 mN/m

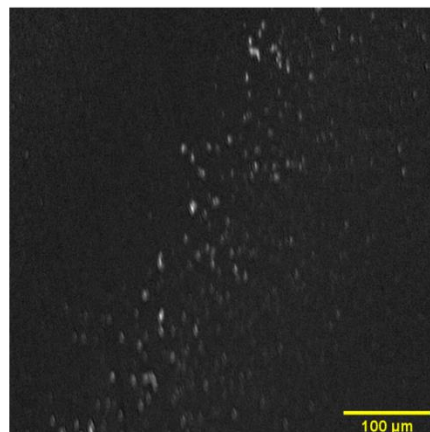


DOPC/Chol/AmB

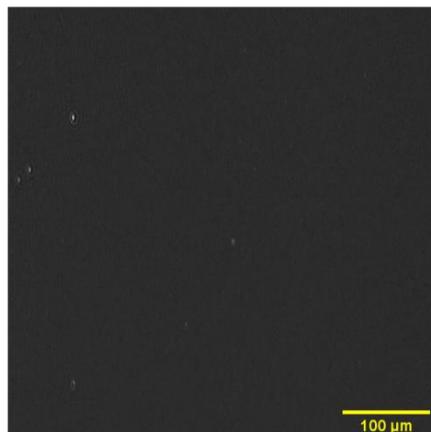
3 mN/m



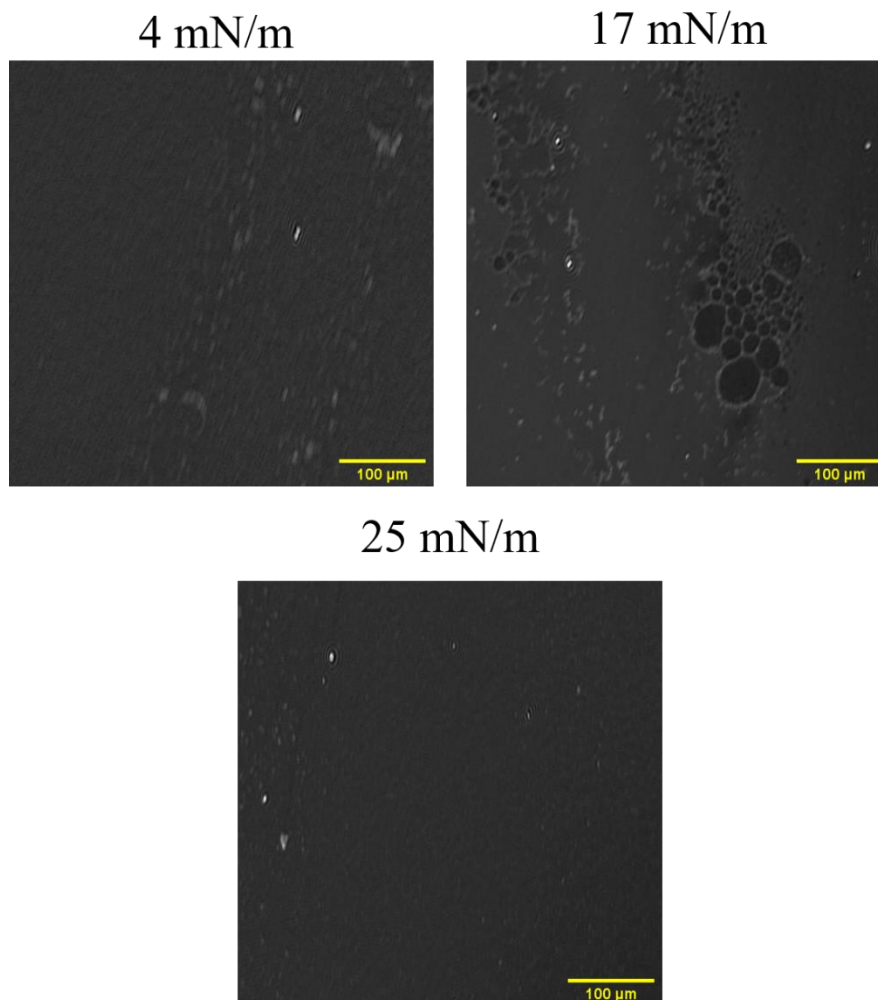
10 mN/m



25 mN/m



DOPC/Chol/AmB na presença de BPA



Fonte: próprio autor.

Nas primeiras três figuras, observa-se as imagens de BAM para a anfotericina B em DMF/HCl 4:3 em subfase aquosa. Os resultados observados para a AmB estão consistentes com o que foi discutido em literatura (MIÑONES et al., 2001). Na pressão próxima de 0 mN/m nota-se amplas áreas escuras, refletindo a fase gasosa, coexistindo com domínios mais claros que podem ser atribuídos a estruturas da fase condensada da AmB. Conforme aumenta-se a pressão por consequência da compressão das barreiras, os domínios mais claros aumentam. Na pressão de 10 mN/m, a fase condensada já se torna homogênea, e não é possível notar a presença de áreas escuras da fase gasosa na imagem.

Os resultados de microscopia observados para a mistura DOPC/Chol também foram apresentados. É possível notar a presença de agregados, que aumenta conforme a

compressão das barreiras. Estudos muito similares relatam que, na pressão próxima de 13 e 25 mN/m, a mistura apresenta superfície plana e na fase ordenada (WANG et al., 2020). Novamente, as regiões mais claras representam as fases condensadas do filme misto de DOPC/Chol (WYDRO; KNAPCZYK; ŁAPCZYŃSKA, 2011). A condensação da monocamada ocasionada pela presença de colesterol é conhecida e já foi discutida neste trabalho.

A presença de AmB mudou a morfologia da monocamada mista de fosfolípido/esterol na interface ar-água. De acordo com a literatura, a presença de AmB em camadas insaturada torna a agregação das moléculas mais compactas, quando na presença de colesterol (WANG et al., 2020). Nas imagens obtidas para a mistura DOPC/Chol/AmB, é possível notar a presença de domínios após inserção da AmB na monocamada, que vão diminuindo conforme a pressão aumenta. Resultados similares foram observados por Foglia et al. (FOGLIA et al., 2014). A penetração da AmB na monocamada lipídio/esterol depende da concentração de estero na mistura e é maior para o colesterol do que para o ergosterol. Dynarowicz-Łatka et al. dissertou que a monocamada é composta por complexos lipídio-esterol, além de possuir lipídios que acabam não formando complexos e ficando em excesso no filme, o que dificulta a penetração da AmB (DYNAROWICZ-ŁATKA et al., 2005).

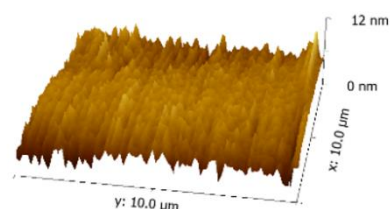
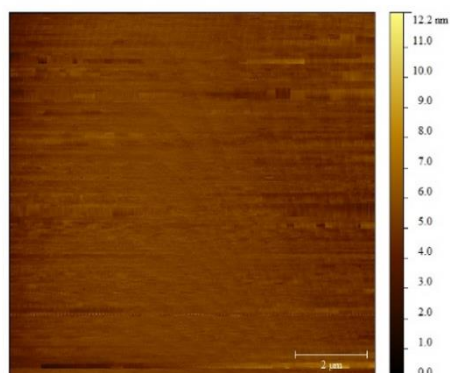
Por fim, a mistura ternária DOPC/Chol/AmB (4,2; 1,8; 4) foi analisada em subfase contendo BPA em concentração de 1×10^{-5} M. É possível notar a diferença para o filme depositado somente em subfase aquosa e na subfase contendo BPA, principalmente nas duas pressões mais baixas, o que indica que a presença de BPA afetou a morfologia da monocamada. É discutido que o BPA possui a capacidade de diminuir a condensação e rigidez de monocamadas biomiméticas, além de enfraquecer as interações entre as moléculas que formam o filme (HĄC-WYDRO; POŁEĆ; BRONIATOWSKI, 2019).

5.5 Microscopia de força atômica (AFM)

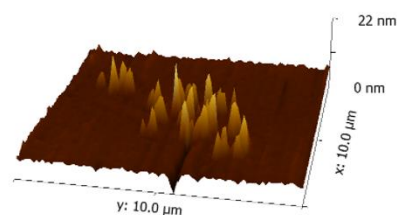
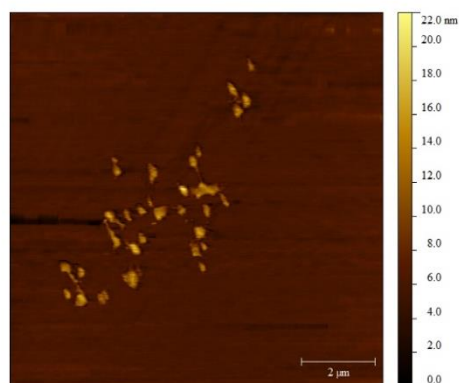
Para estudar a morfologia da superfície das monocamadas, imagens AFM de duas camadas de DOPC e DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 a 25 mN/m em substrato de mica foram realizadas. As imagens obtidas por AFM podem ser vistas nas Figura 21 abaixo.

Figura 21: Imagens de AFM obtidas para (a) substrato de mica; e mica contendo duas camadas de filmes depositados por LS de b) DOPC e c) DOPC/Chol/AmB.

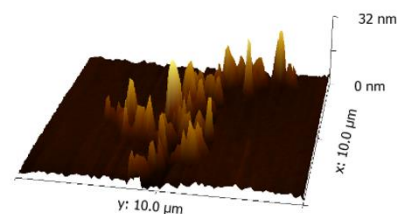
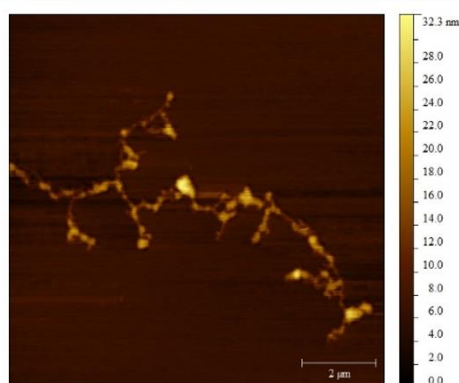
a)



b)



c)



Fonte: próprio autor.

As imagens obtidas somente do substrato de mica estão ilustradas na Figura 21 a) e possuem rugosidade igual a 0,51 nm. O substrato de mica é bastante utilizado no estudo de imagens topográficas de biofilmes devido ao fato de uma superfície plana e ao seu caráter hidrofílico (BOLTSHAUSER, 2012). Nas imagens de AFM obtidas para o DOPC, o filme apresentou rugosidade igual a 1,03 nm (Figura 21-b). É possível observar domínios e/ou agregados, indicando a presença do fosfolípido. Yang et al.(YANG et al., 1994) observou algo similar para o DPPC, onde o aumento da pressão influenciava no aumento de tamanho desses domínios circulares, devido ao arranjo das moléculas de DPPC. Esses domínios também foram observados em misturas de DPPE/DOPE, dois lipídios não miscíveis, que apresentaram duas fases (SOLLETTI, 1996). Domínios lipídicos também foram observados em monocamadas de DPPC e DOPC por microscopia de ângulo de Brewster (BAM) (MAXIMINO et al., 2019), (MAXIMINO et al., 2021),(MAXIMINO; MARTIN; ALÉSSIO, 2022).

A Figura 21 c) mostra as imagens obtidas para o filme de DOPC/Chol/AmB depositados na mica, cujo a rugosidade foi de 2,19 nm. Neste caso, os agregados de DOPC não são tão nítidos como na Figura 21 b). Yuan *et al.* estudou a influência de colesterol e ergosterol em uma bicamada de DPPC, e constatou que a presença de ambos esteróis geraram separação da fase gel e da líquida ordenada da bicamada (YUAN; JOHNSTON, 2002). Em um trabalho que relata estudos com monocamadas DPPC/Chol, Wang (WANG, 2022) atribuiu os domínios mais claros à segregação de colesterol, enquanto as partes mais escuras indicavam regiões onde o colesterol estava em menor proporção. Além disso, o colesterol é capaz de aumentar a fluidez de domínios ordenados (RINIA; DE KRUIJFF, 2001).

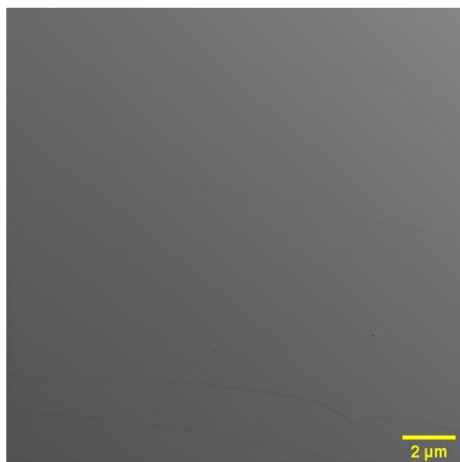
Estudos indicam que a AmB gera um efeito de empacotamento nas camadas lipídicas contendo 30% de esterol, sendo este efeito dependente da saturação da cadeia lipídica (WANG et al., 2020). De acordo com Milhaud et al., a presença de esterol é o que permite a incorporação dos agregados de AmB em bicamadas lipídicas (MILHAUD et al., 2002). Na literatura, relata-se que as áreas escuras observadas na monocamada DOPC/esterol na presença de AmB sugerem interação entre a AmB e esterol, indicando um dano na monocamada (WANG et al., 2020). A capacidade dos políenos, como a AmB, de gerar domínios de fase estão relacionados com a capacidade de permeabilidade da membrana (HARO-REYES et al., 2022).

5.6 Microscopia Eletrônica de varredura

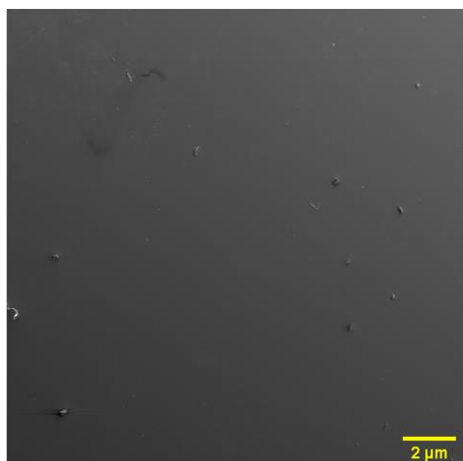
Para avaliar a morfologia dos filmes depositados sobre a membranas de filtração, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura em substratos de mica modificados. As imagens foram obtidas para o substrato de mica sem filme depositado (Figura 22 a), para o substrato de mica com duas camadas de um filme de DOPC (Figura 22 b e c), por fim, com duas camadas de DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 (Figura 22 d e e).

Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de a) mica, b) e c) DOPC depositado na mica d) e e) DOPC/Chol/AmB depositados na mica.

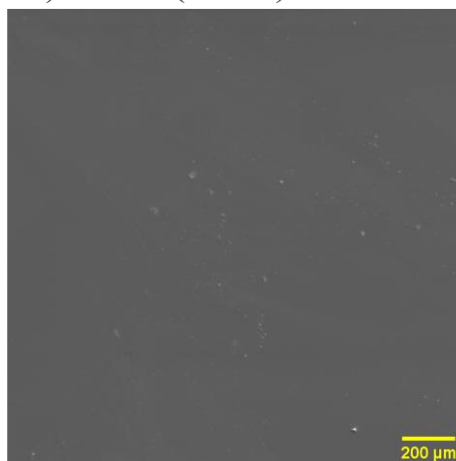
a) Mica (100x)



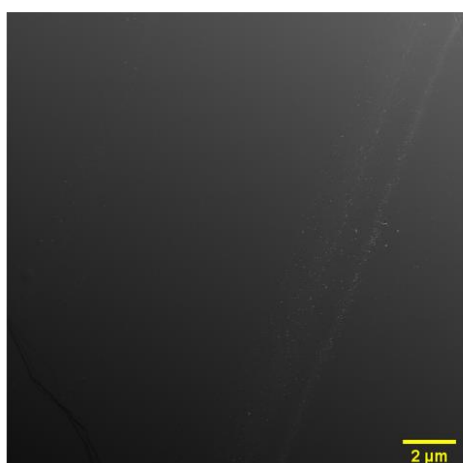
b) DOPC (100x)



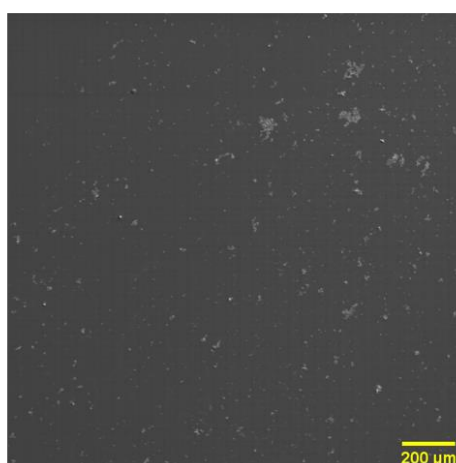
c) DOPC (1000x)



d) DOPC/Chol/AmB (100x)



e) DOPC/Chol/AmB (1000x)



Fonte: próprio autor.

A Figura 22 a) representa a imagem MEV do substrato de mica, sem deposição de filme. É possível observar que não há nada depositado sob o substrato. As Figuras 22 b) e c) mostram a imagem MEV de duas camadas de DOPC sob a mica. É possível notar a presença de um filme recobrindo a superfície, além da presença de agregados, que possivelmente são os agregados do fosfolipídio DOPC, observados também em outros trabalhos (LI et al., 2019). Esses agregados em monocamadas de DOPC são observados também nas medidas de AFM e *in-situ* na cuba de Langmuir para o DOPC em subfase aquosa, via imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) (MAXIMINO et al., 2019). Nas Figuras 22 d) e e), observa-se as imagens do substrato de mica recoberto com DOPC/Chol/AmB. As imagens obtidas no MEV podem ser correlacionadas com os resultados já discutido para o AFM e para os filmes de Langmuir. Em relação com o AFM, foi possível notar que a cobertura do substrato foi mais completa conforme se aumentavam as componentes da mistura, e este fato pode estar relacionado às interações atrativas entre as substâncias observadas na compressão das isotermas.

5.7 Determinação da concentração das amostras de BPA

A Tabela 1 apresenta todas as diluições analisadas pelo método Folin-Ciocalteu. Esta metodologia é utilizada na literatura para a determinação da concentração de BPA. Neste trabalho, o método foi empregado após o processo de filtração para encontrar a concentração da solução permeada.

Tabela 1: Diluições de BPA para a curva de calibração realizada por espectrofotometria UV-VIS.

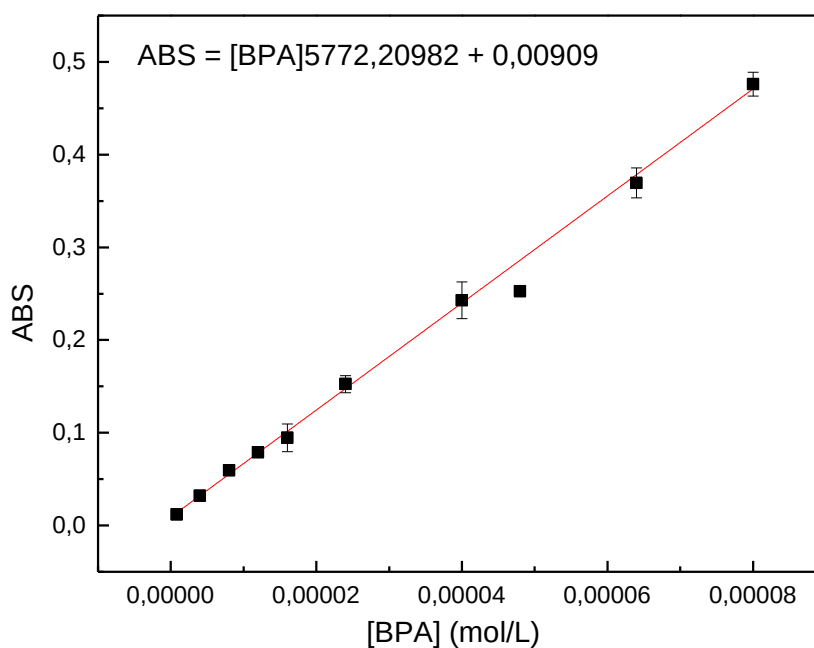
Concentração (M)	Volume BPA (μ l)	Volume H ₂ O (μ l)	Folin (μ l)	Na ₂ CO ₃ (μ l)
8×10^{-7}	50	5000	25	1000
$3,8 \times 10^{-6}$	250	4750	25	1000
8×10^{-6}	500	4500	25	1000
$1,1 \times 10^{-5}$	750	4250	25	1000
$1,5 \times 10^{-5}$	1000	4000	25	1000

$2,3 \times 10^{-5}$	1500	3500	25	1000
4×10^{-5}	2500	2500	25	1000
$4,6 \times 10^{-5}$	3000	2000	25	1000
$6,1 \times 10^{-5}$	4000	1000	25	1000
8×10^{-5}	5000	0	25	1000

Fonte: próprio autor.

A Figura 23 mostra a curva de calibração construída para o BPA a partir dos valores de absorvância obtidos no comprimento de onda 769,5 nm para todas as diluições feitas, a partir da relação de proporcionalidade entre a absorvância e a concentração. A concentração de BPA pós filtragem foi calculada utilizando a equação da reta, descrita também na Figura 23.

Figura 23: Curva de calibração para determinação do BPA elaborada através do estudo da relação entre absorvância e concentração da substância, realizada para uma faixa de concentração de 8×10^{-5} M a 8×10^{-7} M.



Fonte: próprio autor.

5.8 Filtração de BPA

Os primeiros testes com a membrana de filtração foram realizados, em triplicata, para a membrana de PVDF-HFP não modificada (Tabela 2) e modificada com duas camadas de DOPC/Chol/AmB 4,2:1,8:4 (Tabela 3). Em todas as análises, o volume filtrado foi de 5 mL de uma solução de 1×10^{-5} M de BPA, em temperatura ambiente (23 °C) utilizando o sistema “dead-end” (Millipore Amicon® Stirrer Cell, modelo 8050) em temperatura ambiente. As Tabelas também apresentam a média e o desvio padrão (erro) das soluções analisadas.

Tabela 2: Dados da filtração realizada em triplicata para três membranas de PVDF-HFP (Não modificadas) diferentes, para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente).

	Membrana 1	Membrana 2	Membrana 3	Média	Erro
1ª Filtração (mol/L)	$1,7 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$	1,8	0,36
2ª Filtração (mol/L)	$1,7 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	1,9	0,36
3ª Filtração (mol/L)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	1,77	0,25

Fonte: próprio autor.

Tabela 3: Dados da filtração realizada em triplicata para três membranas de PVDF-HFP (modificadas com duas camadas de DOPC/Chol/AmB em proporção 4,2:1,8:4) diferentes para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente).

	Membrana 1	Membrana 2	Membrana 3	Média	Erro
1ª Filtração (mol/L)	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-6}$	2,73	0,21
2ª Filtração (mol/L)	$1,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	2,17	0,58
3ª Filtração	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	1,67	0,29

(mol/L)					
---------	--	--	--	--	--

Fonte: próprio autor.

Para os testes iniciais, pode-se notar que não houve diferença significativa na capacidade de filtração da membrana antes e após sua modificação com apenas duas camadas de DOPC/Chol/AmB. No entanto, o aumento significativo do tempo necessário para a filtração de 5 mL das soluções de BPA comprovam a existência do efeito de *fouling* nas membranas avaliadas, onde o BPA causa entupimentos dos canais iônicos dificultando a passagem da água presente na solução filtrada. Buscando a otimização da membrana produzida, novos testes foram realizados ao longo do trabalho.

Posteriormente, os testes deixaram de ser realizados na membrana eletrofiada e foram realizados em membranas comerciais, devido ao fato de que as fibras da membrana estavam rompendo durante a filtração. Três membranas diferentes foram testadas, sendo uma de Celulose regenerada, PVDF hidrofílico e PTFE. A rejeição pela membrana de celulose foi testada com 2, 4 e 10 camadas de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4).

Para os testes realizados com a membrana de celulose foi aplicada uma pressão de aproximadamente 3 bar. Inicialmente, os testes foram realizados com a membrana de celulose não funcionalizada e funcionalizada com 2 camadas de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4). Em seguida, o teste foi realizado com a membrana funcionalizada com 10 camadas em conjunto com uma membrana não modificada. Por fim, a membrana de celulose funcionalizada com 4 camadas de DOPC/Chol/AmB (4,2:1,8:4) foi testada, desta vez utilizando glutaraldeído 0,5% e 1% como *crosslink*. Para fins de comparação, dois rápidos testes foram realizados para membranas de PTFE e PVDF hidrofílico modificadas com 2 camadas de DOPC/Chol/AmB nas mesmas condições dos demais testes. Os resultados obtidos estão organizados nas tabelas abaixo.

Tabela 4: dados referente as análises de filtração realizadas com a membrana de celulose regenerada não modificada para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.

	Concentração pós filtração (M)	Fluxo (L. m ⁻² .h ⁻¹)	Rejeição (%)
Membrana 1	2,9 x 10 ⁻⁶	20	71 %
Membrana 2	3,1 x 10 ⁻⁶	22	69 %

Membrana 3	$3,8 \times 10^{-6}$	20	62 %
------------	----------------------	----	------

Fonte: próprio autor.

Tabela 5: dados referente as análises de filtração realizadas com a membrana de celulose regenerada modificada com diferentes quantidades de camadas, para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.

	Concentração pós filtração (M)	Fluxo (L. m ⁻² .h ⁻¹)	Rejeição (%)
Membrana 1 (2 camadas)	$4,5 \times 10^{-6}$	20	55%
Membrana 2 (2 camadas)	$2,7 \times 10^{-6}$	18	73%
Membrana 3 (2 camadas)	$3,1 \times 10^{-6}$	20	69%
Membrana 1 (10 camadas)	$3,8 \times 10^{-6}$	104	62%
Membrana 2 (10 camadas)	$3,4 \times 10^{-6}$	71	66%
Membrana 3 (10 camadas)	$3,7 \times 10^{-6}$	52	63%
GA 0,5%			
Membrana 1 (4 camadas)	$3,1 \times 10^{-6}$	67	69%
Membrana 2 (4 camadas)	$1,3 \times 10^{-6}$	62	87%
Membrana 3 (4 camadas)	$7,5 \times 10^{-6}$	67	75%
GA 1%			
Membrana 4 (4 camadas)	$3,8 \times 10^{-6}$	26	62%
Membrana 5 (4 camadas)	$6,2 \times 10^{-6}$	20	38%

Membrana 6 (4 camadas)	$5,2 \times 10^{-6}$	19	48%
------------------------	----------------------	----	-----

Fonte: próprio autor.

Tabela 6: dados referente as análises de filtração realizadas com as membranas de PVDF hidrofílico e PTFE para a solução de BPA permeada a 23°C (temperatura ambiente) e pressão de 3 bar.

	Concentração pós filtração (M)	Fluxo (L. m ⁻² .h ⁻¹)	Rejeição (%)
Membrana PVDF Hidrofílico	$3,4 \times 10^{-6}$	9	66%
Membrana PTFE	$3,9 \times 10^{-6}$	53	61%

Fonte: próprio autor.

Em relação a concentração da solução de alimentação e concentração da solução pós filtração, todas as membranas obtiveram o mesmo desempenho. A concentração diminui uma ordem de magnitude em todas as análises, incluindo membranas não modificadas, modificadas com diferentes números de camadas e membranas fabricadas com diferentes materiais. Por consequência, o percentual de rejeição foi semelhante em todos os testes realizados, independente da composição da membrana ou da funcionalização.

A análise de fluxo de permeado também foi realizada. Para as membranas de celulose, os valores oscilaram entre 18 a 104 L. m⁻².h⁻¹. Pelo que se pode observar nas Tabelas, as membranas modificadas com 10 camadas e com 4 camadas junto com 0,5% de GA foram as que apresentaram maior fluxo de permeado. A membrana de celulose é uma membrana hidrofílica e, comparando-se os dados, pode-se suspeitar que nas análises onde o fluxo foi maior, algo afetou ainda mais a sua hidrofobicidade.

Observando os dados obtidos pode-se cogitar que a modificação, independente do número de camadas, não foi eficaz para ocasionar a diminuição dos poros da membrana comercial. Suspeitamos que, ao aplicar a pressão no sistema, o fluxo de água esteja removendo o filme que está depositado sob os poros da membrana, removendo a funcionalização realizada.

6. Conclusão

As isotermas π - A mostraram que há uma possível interação atrativa entre as componentes DOPC/Chol/AmB após a compressão das barreiras. O método LS foi

aplicado com êxito na modificação da membrana eletrofiada de PVDF-HFP para posterior aplicação para remoção de sais e poluentes da água. A caracterização da membrana foi realizada utilizando as técnicas espectroscópicas de MEV, AFM, UV-Vis e PM-IRRAS e constatou a presença do filme, depositado em duas camadas, na superfície da membrana. Nas imagens de MEV foi possível observar a cobertura da membrana em comparação com a membrana não modificada, sendo possível diferenciar os agregados lipídicos presentes principalmente na membrana modificada somente com DOPC. As imagens de AFM mostram um aumento de rugosidade nas membranas modificadas somente com DOPC, DOPC/Chol e DOPC/Chol/AmB, respectivamente. Esse aumento na rugosidade pode estar relacionado com a cobertura do filme, onde filmes distribuídos mais uniformemente tendem a apresentar menos rugosidade. Além disso, também foi possível observar via AFM a presença dos agregados lipídicos, resultado que está de acordo com o que foi observado no MEV. Os espectros PM-IRRAS revelaram que houve mudanças consideráveis nas vibrações dos grupos moleculares relacionados à cabeça e cauda do DOPC na presença de AmB, indicando que estão ocorrendo interações entre as duas moléculas. As mudanças espectrais observadas para a região da cabeça podem estar relacionadas a uma interação eletrostática entre o oxigênio do grupo carboxila da AmB e a parte positiva do grupo colina do DOPC e às interações entre os hidrogênios dos grupos OH da AmB e os fosfatos e oxigênios da cabeça do lipídio. Já na região da cauda, foi observada uma desordem na presença somente de Chol, e uma maior organização da cauda quando na presença de AmB, que coincidem com os resultados observados nas isotermas π -A. Por fim as análises de filtração não apresentaram diferença significativa entre si na concentração calculada após a filtração e, conseqüentemente, no percentual de rejeição. Estima-se que há a possibilidade de o filme depositado para a funcionalização estar saindo dos poros da membrana após a aplicação da pressão.

Referências

ACQUA, N. D. Preparação e Caracterização de Filmes Nanoestruturados Suportados em Membrana de Celulose contendo Nanopartículas de Au e TiO₂ para Produção de H₂. p. 76, 2013.

ANG, M. B. M. Y. et al. Improved performance of thin-film nanofiltration membranes fabricated with the intervention of surfactants having different structures for water

treatment. **Desalination**, v. 481, n. November 2019, 2020.

AOKI, P. H. B. et al. Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. **Langmuir**, v. 32, n. 15, p. 3766–3773, 2016.

ARRONDO, J. L. R.; GOÑI, F. M.; MACARULLA, J. M. Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 794, n. 1, p. 165–168, 1984.

BACHEGA, T. A. S. S. et al. Os interferentes endócrinos ambientais precisam receber a atenção dos endocrinologistas brasileiros. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 175–176, 2011.

BAGINSKI, M.; RESAT, H.; BOROWSKI, E. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1567, n. SUPPL., p. 63–78, 2002.

BAGINSKI, M.; RESAT, H.; MCCAMMON, J. A. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dynamics simulation. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 560–570, 1997.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2. ed. [s.l: s.n.].

BARNES, G. T.; GENTLE, I. R. **Interfacial Science: an introduction**. 2. ed. New York: [s.n.].

BESERRA, M. R. et al. O Bisfenol A : Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 5, n. 1, p. 37–46, 2012.

BLAUDEZ, D. et al. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, 1993.

BOLARD, J.; SEIGNEURET, M.; BOUDET, G. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. Lipid state and cholesterol content dependence. **BBA - Biomembranes**, v. 599, n. 1, p. 280–293, 1980.

BOLTSHAUSER, M. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Antonio**

Aparecido Pupim Ferreira Hideko Yamanaka, v. 29, n. 2, p. 67, 2012.

BOTET-CARRERAS, A. et al. Effect of cholesterol on monolayer structure of different acyl chained phospholipids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, n. June 2018, p. 374–383, 2019.

BRUNET, L. et al. Properties of membranes containing semi-dispersed carbon nanotubes. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 4, p. 565–575, 2008.

BUENO, M. Z. et al. Avaliação da nanofiltração e da osmose inversa na remoção de carbofurano em águas de abastecimento. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 447–458, 2016.

CARDOSO, P. R. AGROTÓXICOS PESADOS NOS EFLUENTES TRATADOS. 2019.

COHEN, B. E. Amphotericin B membrane action: Role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. **Journal of Membrane Biology**, v. 238, n. 1–3, p. 1–20, 2010.

DE MEL, J. U. et al. Influence of External NaCl Salt on Membrane Rigidity of Neutral DOPC Vesicles. **Langmuir**, v. 36, n. 32, p. 9356–9367, 2020.

DECHER, G. Langmuir-Blodgett films: An introduction. By M. C. Petty , xviii, 234 pp., Cambridge University Press, Cambridge 1996, Softcover, £16.95, ISBN 0-521-42450-X . **Advanced Materials**, 1997.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**, p. 60, 2007.

DENNIS, V. W.; STEAD, N. W.; ANDREOLI, T. E. Molecular aspects of polyene- and sterol-dependent pore formation in thin lipid membranes. **Journal of General Physiology**, v. 55, n. 3, p. 375–400, 1970.

DOGNANI, G. et al. Morphology of Electrospun Non-Woven Membranes of Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene): Porous and Fibers. **Fibers and Polymers**, v. 20, n. 3, p. 512–519, 2019.

DOUGLAS SKOOG, DONALD M. WEST, F. JAMES HOLLER, S. R. C. **Principles of Instrumental Analysis**. Toronto: [s.n.].

DRIOLI, E.; CRISCUOLI, A.; CURCIO, E. Integrated membrane operations for seawater desalination. **Desalination**, v. 147, n. 1–3, p. 77–81, 2002.

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. et al. Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27 /3, n. 2–3, p. 249–263, 2003.

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. et al. BAM studies on the penetration of amphotericin B into lipid mixed monolayers of cellular membranes. **Applied Surface Science**, v. 246, n. 4, p. 334–341, 2005.

EEMAN, M.; DELEU, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 14, n. 4, p. 719–736, 2010.

EGITO, L. C. M. et al. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 6, p. 1557–1565, 2004.

ENGELHARDT, S.; SADEK, A.; DUIRK, S. Rejection of trace organic water contaminants by an Aquaporin-based biomimetic hollow fiber membrane. **Separation and Purification Technology**, v. 197, n. December 2017, p. 170–177, 2018.

ERNST, C.; GRANGE, J.; DE, L. D. S. Structure of Amphotericin B Aggregates as Revealed by UV and CD Spectroscopies. **Changes**, v. 20, n. 1981, p. 1575–1588, 2000.

FOGLIA, F. et al. Interaction of amphotericin B with lipid monolayers. **Langmuir**, v. 30, n. 30, p. 9147–9156, 2014.

FUJII, G. et al. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers. **Biochemistry**, v. 36, n. 16, p. 4959–4968, 1997.

GADWAL, I. et al. Synthesis of Sub-10 nm Two-Dimensional Covalent Organic Thin Film with Sharp Molecular Sieving Nanofiltration. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 15, p. 12295–12299, 2018.

- GAGOŚ, M.; KOPER, R.; GRUSZECKI, W. Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1511, n. 1, p. 90–98, 2001.
- GERALDO, V. P. N. Interação do ibuprofeno e capsaicinóides com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídeos. p. 113, 2013.
- GOMEZ-SERRANILLOS, I. R. et al. A study of the stability of amphotericin B monolayers. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 112, p. 29, 1999.
- GOTO, T. E.; CASELI, L. The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air-water interface is modulated by the monolayer lipid composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 431, p. 24–30, 2014.
- GUO, Y. S. et al. High-flux zwitterionic nanofiltration membrane constructed by in-situ introduction method for monovalent salt/antibiotics separation. **Journal of Membrane Science**, v. 593, n. June 2019, p. 117441, 2020.
- HAC-WYDRO, K. et al. The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 150, n. 1, p. 22–34, 2007.
- HĄC-WYDRO, K.; POŁEĆ, K.; BRONIATOWSKI, M. The comparative analysis of the effect of environmental toxicants: Bisphenol A, S and F on model plant, fungi and bacteria membranes. The studies on multicomponent systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 289, 2019.
- HARO-REYES, T. et al. Polyene Antibiotics Physical Chemistry and Their Effect on Lipid Membranes ; Impacting Biological Processes and Medical Applications. 2022.
- HÉNON, S.; MEUNIER, J. Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. **Review of Scientific Instruments**, v. 62, n. 4, p. 936–939, 1991.
- HERZBERG, G.; CRAWFORD, B. L. I. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules. 1946.
- HÖNIG, D.; MÖBIUS, D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 4590–

4592, 1991.

HUANG, W. et al. Ion channel behavior of Amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 6, p. 3245–3255, 2002.

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

JURAK, M. Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and langmuir-blodgett monolayer study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 13, p. 3496–3502, 2013.

JURKIEWICZ, P. et al. Structure, dynamics, and hydration of POPC/POPS bilayers suspended in NaCl, KCl, and CsCl solutions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 3, p. 609–616, 2012.

KAWABATA, M.; ONDA, M.; MITA, T. Effect of aggregation of amphotericin B on lysophosphatidylcholine micelles as related to its complex formation with cholesterol or ergosterol. **Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 5, p. 725–732, 2001.

KSV NIMA - Brewster Angle Microscopes. Disponível em: <http://www.asi-team.com/asi_team/ksv_nima/ksvnima_file/Brewster_Angle_Microscope.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2020.

KUMAR, M. et al. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 52, p. 20719–20724, 2007.

LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Interaction of gelatin with polyenes modulates antifungal activity and biocompatibility of electrospun fiber mats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2439–2458, 2014.

LARABI, M. et al. New lipid formulation of amphotericin B: Spectral and microscopic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1664, n. 2, p. 172–181, 2004.

- LAU, W. J. et al. Characterization methods of thin film composite nanofiltration membranes. **Separation and Purification Reviews**, v. 44, n. 2, p. 135–156, 2015.
- LES, K. A. et al. Poly(methacrylic acid) complexation of amphotericin B to treat neglected diseases. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 1037–1048, 2014.
- LEVIN, I. W. et al. Two Types of Hydrocarbon Chain Interdigitation in Sphingomyelin Bilayers. **Biochemistry**, v. 24, n. 22, p. 6282–6286, 1985.
- LI, B. et al. Use of magnoflorine-phospholipid complex to permeate blood-brain barrier and treat depression in the CUMS animal model. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 566–574, 2019.
- LIU, C. et al. Novel highly stable Guanazole-incorporated ultrathin loose nanofiltration membrane with superior permeability for water desalination and purification. **Desalination**, v. 520, n. August, p. 115335, 2021.
- LIU, Y. et al. High-performance thin film nanocomposite membranes enabled by nanomaterials with different dimensions for nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 596, n. November 2019, p. 117717, 2020.
- MAIA, D.; DEZOTTI, M. DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE: EFEITOS E CONSEQÜÊNCIAS. v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- MARCEL MULDER. Basic principles of membrane technology. **Kluwer Academic Publishers**, v. 2, 1996.
- MATAR, G.; BESSON, F. Influence of the lipid composition of biomimetic monolayers on the structure and orientation of the gp41 tryptophan-rich peptide from HIV-1. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 10, p. 2534–2543, 2011.
- MAXIMINO, M. D. et al. Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. **Applied Surface Science**, v. 476, n. January, p. 493–500, 2019.
- MAXIMINO, M. D. et al. Consequences of the exposure to bisphenol A in cell membrane models at the molecular level and hamster ovary cells viability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, n. April, 2021.
- MAXIMINO, M. D.; MARTIN, C. S.; ALÉSSIO, P. Bisphenol A exposure induces

multiple effects in DOPC membrane models. **Journal of Molecular Liquids**, v. 359, p. 119253, 2022.

MENDELSON, R.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy of lipids, peptides, and proteins in aqueous monolayers. **Current Topics in Membranes**, v. 52, p. 57–88, 2002.

MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 4, p. 788–800, 2010.

MENG, J. et al. PVDF-CaAlg nanofiltration membranes with dual thin-film-composite (TFC) structure and high permeation flux for dye removal. **Separation and Purification Technology**, v. 255, n. September 2020, p. 117739, 2021.

MERCK. **Amicon® Stirred Cells**. Disponível em:
<https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Stirred-Cells,MM_NF-C3259>.

MILHAUD, J. et al. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: New insight into the role of ergosterol. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1558, n. 2, p. 95–108, 2002.

MIÑONES, J. et al. Orientational changes of amphotericin B in Langmuir monolayers observed by Brewster angle microscopy. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1477–1482, 2001.

MIÑONES, J. et al. Interactions of amphotericin B with phospholipids in Langmuir monolayers. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 126, p. 55–59, 2004.

MIÑONES, J. et al. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270–271, n. 1–3, p. 129–137, 2005.

MOCANU*, A.; , ROXANA-DIANA PAȘCA, O. H.; TOMOAI-COTISEL, M. BEHAVIOR OF MIXED DMPC-CHOLESTEROL MONOLAYERS AT THE AIR/WATER INTERFACE. **STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI**, 2010.

NAVARRO, M. et al. Thin-Film Nanocomposite Membrane with the Minimum Amount of MOF by the Langmuir-Schaefer Technique for Nanofiltration. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 1, p. 1278–1287, 2018.

- O'REILLY, A. O. et al. Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human Cardiac Sodium channel. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- OLŻYŃSKA, A. et al. Mixed DPPC/POPC Monolayers: All-atom Molecular Dynamics Simulations and Langmuir Monolayer Experiments. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 12, p. 3120–3130, 2016.
- ORGANIZATION, W. H. **The world health report 2004 – Changing history**. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2004/en/report04_en.pdf>.
- PALACIOS, D. S. et al. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 6733–6738, 2011.
- PAVINATTO, F. J. Interação entre quitosana e modelos de membrana celular : filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). 2010.
- PEREIRA, M. S. Biossensores baseados em filmes de Langmuir-Blodgett e Langmuir-Schaefer de lipídios, bisftalocianina de lutécio e tirosinase. 2019.
- PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett films**. [s.l.: s.n.].
- PINTO, E. P. .; RAMOS, Q. P. .; FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, p. 41–50, 2013.
- REY-GÓMEZ-SERRANILLOS, I. et al. Desorption of amphotericin B from mixed monolayers with cholesterol at the air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 234, n. 2, p. 351–355, 2001.
- RIES, H. E.; SWIFT, H. S. Monolayers of valinomycin and its equimolar mixtures with cholesterol and with stearic acid. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 64, n. 1, p. 111–119, 1978.
- RINIA, H. A.; DE KRUIJFF, B. Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. **FEBS Letters**, v. 504, n. 3, p. 194–199, 2001.
- ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 132–155, 2013.

ROSENBERG, P. A.; FINKELSTEIN, A. Water permeability of gramicidin a-treated lipid bilayer membranes. **Journal of General Physiology**, v. 72, n. 3, p. 341–350, 1978.

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

SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. et al. Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine: a monolayer study. **BBA - Biomembranes**, v. 944, n. 3, p. 477–486, 1988.

SANFELICE, R. C. et al. INTRODUÇÃO À NANOTECNOLOGIA. 1985.

SARKIS, J.; VIÉ, V. Biomimetic Models to Investigate Membrane Biophysics Affecting Lipid–Protein Interaction. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–16, 2020.

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

SEN GUPTA, R.; PADMAVATHY, N.; BOSE, S. The Journey of Water Remediation through Biomimetic Strategies: A Mechanistic Insight. **Advanced Sustainable Systems**, v. 2100213, p. 1–23, 2021.

SEOANE, J. R. et al. The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water interface. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 105, p. 173–179, 1997.

SILBERSTEIN, A. Conformational analysis of amphotericin B - Cholesterol channel complex. **Journal of Membrane Biology**, v. 162, n. 2, p. 117–126, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SOARES, A. F. S.; SOUZA E SOUZA, L. P. **Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde**. [s.l.: s.n.]. v. 20

SOARES, T. M. et al. Destinação de águas residuárias provenientes do processo de

dessalinização por osmose reversa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 730–737, 2006.

SOLLETTI, J. M. Characterization of mixed miscible and nonmiscible phospholipid Langmuir–Blodgett films by atomic force microscopy. **Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures**, v. 14, n. 2, p. 1492, 1996.

STU BORMAN. **Anfotericina B mistério resolvido**. Disponível em: <<https://cen.acs.org/articles/89/i12/Amphotericin-B-Mystery-Solved.html>>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SYKORA, J. C.; NEELY, W. C.; VODYANOY, V. Thermodynamic characteristics of mixed monolayers of amphotericin B and cholesterol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 1, p. 60–67, 2004.

TANG, C. Y. et al. Desalination by biomimetic aquaporin membranes: Review of status and prospects. **Desalination**, v. 308, p. 34–40, 2013.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. **Microscopía de ángulo de Brewster**. Disponível em: <http://materias.df.uba.ar/f2bygaa2016c1/files/2012/07/POLARIZACION_MICROSCOPIAS.pdf>.

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5–8, 2011.

WANG, J. et al. Interaction of amphotericin B and saturated or unsaturated phospholipid monolayers containing cholesterol or ergosterol at the air-water interface. **Biophysical Chemistry**, v. 258, n. September 2019, p. 106317, 2020.

WANG, J. Influence of Potassium Ions on Act of Amphotericin B to the DPPC/Chol Mixed Monolayer at Different Surface Pressures. **Membranes**, v. 12, n. 1, 2022.

WANG, J.; ZHU, H. Influence of amphotericin B on the thermodynamic properties and surface morphology of saturated phospholipid monolayer with different polar head at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 617, n. December 2020, p. 126298, 2021.

WANG, X. et al. Fabrication of nanofiltration membrane on MoS₂ modified PVDF

substrate for excellent permeability , salt rejection , and structural stability. **Chemical Engineering Journal**, v. 416, n. December 2020, p. 129154, 2021.

WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 178–198, 2007.

WU, H. C. et al. Preparation of Amphotericin B-Ergosterol structures and molecular simulation of water adsorption and diffusion. **Journal of Membrane Science**, v. 545, n. June 2017, p. 229–239, 2018.

WYDRO, P.; KNAPCZYK, S.; ŁAPCZYŃSKA, M. Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5433–5444, 2011.

YANG, X. M. et al. Domain structures of phospholipid monolayer Langmuir-Blodgett films determined by atomic force microscopy. **Applied Physics A Solids and Surfaces**, v. 59, n. 2, p. 139–143, 1994.

YANG, Y. et al. Liposomes-assisted fabrication of high performance thin film composite nanofiltration membrane. 2021.

YOOL, A. J.; WEINSTEIN, A. M. New roles for old holes: Ion channel function in aquaporin-1. **News in Physiological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 68–72, 2002.

YUAN, C.; JOHNSTON, L. J. Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: Atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies. **Journal of Microscopy**, v. 205, n. 2, p. 136–146, 2002.

ZANIQUELLI, M. E. D.; BUENO, W. A.; HOMEM, A. J. M. **Construção de uma Cuba de Langmuir para preparação e estudo de monocamadas líquidas** Química Nova, 1993.

ZASADZINSKI, J. A. et al. Langmuir-Blodgett Films. v. 263, n. March, 1994.

ZHANG, W. et al. Electrospayed polyamide nanofiltration membrane with uniform and tunable pores for sub-nm precision molecule separation. **Separation and Purification Technology**, v. 282, n. PB, p. 120131, 2022.

ZHANG, Y. et al. Removal of bisphenol A by a nanofiltration membrane in view of drinking water production. **Water Research**, v. 40, n. 20, p. 3793–3799, 2006.

